



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GESTIÓN

**Influencia de diferentes tratamientos de polinización sobre
características físicas y fisiológicas de semillas de *Oreocallis
grandiflora* (Lam) R. Br. (Proteaceae).**

Trabajo de Graduación previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN

Autor:

FRANCISCO JAVIER NEIRA GARCÍA

Director:

ANTONIO CRESPO AMPUDIA, PHD

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A Cuquita, Jorge, Julio E. y J. David
por ser mi fuente de inspiración constante y estar siempre ahí para mí.

A las personas que como yo, no encajamos en el molde,
ni en el cliché que deberíamos.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Antonio Crespo, por recibirme en tu laboratorio y confiar en mi capacidad. Siempre estuviste pendiente de darme las directrices adecuadas, las ideas concretas y correctas para ayudarme a llevar a cabo este trabajo.

A Boris Tinoco por estar pendiente del desarrollo de mis actividades, tu constante ayuda y aporte a la apropiada realización de mi trabajo.

A mis amigas y compañeras de laboratorio Karlita Pintado y Dianita Inga, por siempre darme sus mejores ánimos y contagiarme de sus inmensas ganas de reír, hicieron llevadera la realización de este trabajo. También por ayudarme en el trabajo de campo, la fase en laboratorio con el conteo de germinantes (¡mil gracias!) y sus aportes a este documento.

A la dura del pacífico, Juanita Ochoa, y ahora... ¿Cómo será de escribir? (Ríase a discreción) Gracias por tu apoyo siempre a cada paso que doy; y especialmente porque aún estando lejos me diste una mano con la pasada de los cientos de datos (¡Que Viva Shárug!).

A Ale Álvarez Jaya, Marce Sánchez y Karla (Suca) Crespo por su invaluable y desinteresada colaboración en las salidas de campo. Se ganaron mi certificación de excelentes asistentes de campo.

Boris Landázuri, Gaby Mogrovejo, Santi Cárdenas, Nils Breitbach, Omar Delgado, Diego Pacheco y Andre Urgilés por la ayuda brindada con sus trabajos, conocimientos, soporte técnico y acolite para la estructuración de este trabajo.

A Isa Chumi, Liss Qhispi y Nube Loyola, mis pasantes, por su valiosa e irremplazable ayuda en la toma y sistematización de datos de laboratorio.

A Rosita Aguilar, guarda llaves de la estación “El Gullán”, por contribuir al correcto cumplimiento de mi calendario de trabajo.

A todas esas otras personas que prefieren permanecer en el anonimato o se me van de la mente y contribuyeron directa o indirectamente para empezar y culminar mi formación universitaria y este escrito.

A la Vida, a Dios, al “Multiverso”, y todas esas fuerzas más allá de lo evidente y sensorial, que con destino o sin él, me han llevado hasta donde estoy ahora.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MATERIALES Y MÉTODOS	4
1.1 Área de Estudio.....	4
1.2 Especie de Estudio	6
1.3 Metodología	8
1.3.1 Diseño Experimental.....	8
1.3.2 Recolección de Frutos.....	10
1.3.3 Procesamiento de frutos y semillas en laboratorio.....	11
1.3.4 Número de Semillas.....	12
1.3.5 Tamaño de Semillas.....	15
1.3.6 Peso de Semillas.	16
1.3.7 Prueba de Imbibición.	17
1.3.8 Prueba de Germinación.....	18
1.4 Análisis de Datos y Estadística.	18

CAPÍTULO II: RESULTADOS	21
2.1 Número de semillas totales por folículo y Número de semillas desarrolladas por folículo..	22
2.2 Largo y Ancho de semillas.....	23
2.3 Peso de Semillas	24
2.4 Imbibición	25
2.5 Germinación.....	26
CAPÍTULO III: DISCUSIONES	28
3.1 Número de semillas por folículo (totales y desarrolladas).....	28
3.2 Tamaño de semillas.....	30
3.3 Peso de semillas	30
3.4 Imbibición y Germinación	31
3.5 Consideraciones Finales.....	32
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa de ubicación de la Estación Científica “El Gullán” y de los árboles de <i>O. grandiflora</i> en el sitio de estudio	5
Figura 1.2 Esquema de disposición de los tratamientos en los árboles pareados. Se presentan los tratamientos Visitador Nocturno (NV), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL).	9
Figura 1.3 Procesamiento de frutos y semillas en el laboratorio.	12
Figura 1.4 Vista de Semillas Desarrolladas y Semillas No Desarrolladas en acercamiento frontal y lateral.....	13
Figura 1.5 Resultado de la Prueba de TZ en Semillas Desarrolladas.	15
Figura 1.6 Esquema de representación del eje y dimensiones usadas para las semillas de <i>O. grandiflora</i>	16
Figura 2.1 Desglose comparativo del número total de semillas versus el número de semillas desarrolladas entre los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL).	21
Figura 2.2 Promedio de Número de Semillas Totales por Folículo y Número de Semillas Desarrolladas por Folículo comparando los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL).	22
Figura 2.3 Promedio de largo y ancho de semillas expresado en centímetros (cm) de los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL)	23
Figura 2.4 Comparación del peso promedio, expresado en gramos (g), de semillas los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL).	25
Figura 2.5 Comportamiento de las curvas de incremento promedio de masa (peso) sometiendo a comparación los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL) en las pruebas de imbibición durante las 72 horas.	26

Figura 2.6 Probabilidad de Ausencia de Germinación para las semillas de los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL) en un periodo de 25 días (Método Kaplan-Meier).....27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Prueba ANOVA aplicado a Semillas Totales por Folículo y Semillas Desarrolladas por Folículo.	23
Tabla 2.2 Prueba ANOVA aplicado a Largo y Ancho de Semillas.	24

ÍNDICE DE ANEXOS

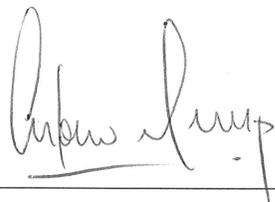
Anexo 1. Código bi-modal asignado a los tratamientos respecto al árbol en donde estaban instalados	55
Anexo 2. Inicio del estado de dehiscencia frutal.....	55
Anexo 3. Fundas plásticas con cierre hermético usadas para el transporte de los frutos del campo al laboratorio.	56
Anexo 4. Frutos devorados por larva lepidóptera (<i>Lepidoptera spp 1</i>)	56
Anexo 5. Frutos de <i>O. grandiflora</i> secuestrados presuntamente por especímenes del Orden Rodentia.....	57
Anexo 6. Semillas pertenecientes a la misma identidad unidas en una sola caja Petri.....	57
Anexo 7. Medición de largo y ancho de semillas en la prueba de tamaños.....	58
Anexo 8. Balanza utilizada para pesar las semillas de <i>O. grandiflora</i>	58
Anexo 9. Semillas en inmersión durante pruebas de imbibición con su respectiva etiqueta de estatus.....	59
Anexo 10. Hoja de registro donde constan semillas de distinto estatus sometidas a pruebas de imbibición en distinto día.....	59
Anexo 11. Hoja de registro donde constan semillas de distinto estatus que fueron puestas a prueba en el mismo día pero con una diferencia de 30 minutos	60
Anexo 12. Hoja de registro usada para las pruebas de imbibición	60
Anexo 13. Caja Petri con germinantes del mismo estatus.	61
Anexo 14. Hoja de registro de germinación	61
Anexo 15. Tabla de registro de campo de los frutos que permanecían en los árboles hasta su completa extracción	66

**INFLUENCIA DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE POLINIZACIÓN
SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y FISIOLÓGICAS DE SEMILLAS DE
Oreocallis grandiflora (LAM) R. BR. (PROTEACEAE).**

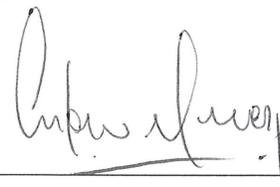
RESUMEN

El estudio comparó la producción y calidad de semillas de *Oreocallis grandiflora* entre cuatro tratamientos de polinización. Las variables de respuesta fueron: El número de semillas por fruto (analizado con Modelos Lineales Mixtos); el tamaño y peso de semillas frescas, y el incremento en masa luego de la imbibición (test ANOVA); y los patrones temporales de germinación (prueba Log-Rank). Ninguna prueba estadística tuvo diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados sugieren que la calidad física y fisiológica de las semillas de esta especie no está relacionada con el agente polinizador. La especie es autocompatible y produce semillas con alta capacidad germinativa (97% entre 7 y 9 días) sin importar su origen polínico. Estas características calificarían a la especie como generalista.

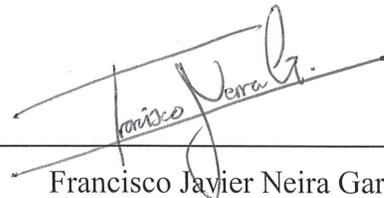
Palabras Clave: Polinización, germinación, *Oreocallis grandiflora*, especie generalista, matorral húmedo montano.



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Director del trabajo de Titulación



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Director de Escuela



Francisco Javier Neira García

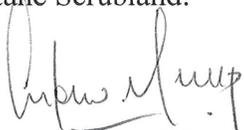
Autor

**INFLUENCE OF DIFFERENT POLLINATION TREATMENTS ON PHYSICAL AND
PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *Oreocallis grandiflora* (LAM) R. BR.
(PROTEACEAE) SEEDS**

ABSTRACT

This study compared the production and quality of *Oreocallis grandiflora* seed among four pollination treatments. The response variables were: number of seeds per fruit (analyzed with Mixed Linear Models); size and weight of fresh seeds; increase in mass after imbibition (ANOVA test); and temporary germination patterns (Log-Rank test). None of the statistical tests had significant differences between treatments. The results suggest that the physical and physiological quality of the seeds of this species is not related to the pollinating agent. The species is self-compatible and produces seeds with high germination capacity (97% between 7 and 9 days) regardless of their pollen origin. These characteristics would qualify the species as generalist.

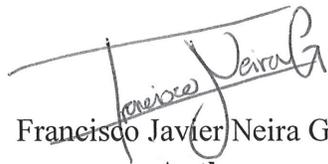
Keywords: Pollination, Germination, *Oreocallis grandiflora*, Generalist Species, Humid Montane Scrubland.



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Thesis Director



Antonio Manuel Crespo Ampudia
School Director



Francisco Javier Neira García
Author

Neira García Francisco Javier

Trabajo de Titulación

Antonio Manuel. Crespo Ampudia

Diciembre, 2016

**INFLUENCIA DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE POLINIZACIÓN
SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y FISIOLÓGICAS DE SEMILLAS DE
Oreocallis Grandiflora (Lam) R. Br. (PROTEACEAE)**

INTRODUCCIÓN

Las angiospermas co-evolucionaron con organismos capaces de brindar una polinización exitosa desarrollando estructuras atractivas donde ofrecen recompensas (néctar y polen, calor, sexo) por la labor del polinizador (Friis et al., 2010; Lunau, 2004; Neiland y Wilcock, 1998; Thien et al., 2000). Desde el Cretácico, donde los insectos eran los polinizadores por excelencia (Dilcher, 1979; Friis, 2000), hasta hoy en día donde el radio de polinizadores se ha ampliado hasta abarcar diversidad de taxas de vertebrados como mamíferos (Carthew y Goldingay, 1997; Cocucci y Sérsic, 1998; Wester, 2015; Zoeller et al., 2016) y reptiles (Olesen y Valido, 2003; Ortega-Olivencia et al., 2012; Traveset y Sáez, 1997) la misión de los polinizadores para con las plantas es asegurar la entrega de gametos masculinos en el estigma (polinización).

La polinización depende de muchos factores intrínsecos de las plantas como disponibilidad suficiente de nutrientes (Burkle y Irwin, 2009; Cardoza et al., 2012; Gudade et al., 2016; Tamburini et al., 2016), o, tasas de producción fotosintética altas (Kudo et al., 2008; Willmer, 2011; S. Zhang et al., 2005); pero también, depende de la intervención y desempeño del factor externo que permite la unión de gametos de distinta

procedencia parental, la efectividad del polinizador (Carr y Davidar, 2015; Giannini et al., 2015; Lázaro et al., 2015).

La efectividad del polinizador o efectividad de polinización se puede medir a través del número de frutos formados (Albano et al., 2009; Huda et al., 2015; Jacobs et al., 2010), el número de semillas obtenidas de una flor (set de semillas) (Dieringer, 1992; Rafferty y Ives, 2012) o en base a su calidad física y fisiológica (Gómez, 2000; King et al., 2013; Rianti et al., 2010). En muchos casos el número de frutos que se obtienen a partir de una polinización exitosa, no se traduce precisamente en semillas fértiles y puede existir un porcentaje de semillas abortadas (Calviño, 2014; Collevatti et al., 2009; Kärkkäinen et al., 1999; Morales et al., 2013). Hablar de la efectividad de polinización, o de un polinizador al reducirla a la producción de frutos o semillas es tocar el tema de manera muy somera, pues la polinización es un fenómeno de comunidad en los ecosistemas y se conforma de muchos factores y componentes (Knut y Van der Pijil, 1979), y tratan de develarse a través de lo que han denominado Síndrome de Polinización, conjunto de características de la flor, que atraen a polinizadores específicos hacia flores particulares que permiten que se alimenten y excluyen a otros visitantes que podrían usurpar los recursos florales (Fenster et al., 2004; Ollerton et al., 2009).

El síndrome de polinización, en muchos casos no explica definitivamente el grupo polinizador objetivo que tiene un aparato floral, como es el caso de la subfamilia Grevilleoideae (Fam. Proteaceae), donde a pesar de mostrar rasgos morfológicos florales aptos para murciélagos (Fleming et al., 2009), son visitados por más grupos taxonómicos reportando casos exitosos de polinización (Landázuri-Paredes et al., 2015; Schmid et al., 2015; Whelan y Burbidge, 1980; Zoeller et al., 2016) y existe frecuentemente autopolinización con reportes de producción altos de frutos y semillas (Ayre et al., 1994; Forrest et al., 2011).

Para Proteaceae de manera general, independientemente del origen polínico, las tasas de aborto en flores y frutos son elevadas (Ayre y Whelan, 1989; Collins y Rebelo, 1987;

Goldingay y Carthew, 1998). Las semillas supervivientes a eventos abortivos son pocas (Ayre y Whelan, 1989) y sus cualidades y cantidades varían entre géneros y especies lo que indica la existencia de especies autocompatibles (Ayre et al., 1994; Steenhuisen y Johnson, 2012) y no autocompatibles (Cadzow y Carthew, 2000; Heliyanto et al., 2005).

Oreocallis grandiflora es una especie Proteaceae (sub. Fam. Grevilleoideae), que no es la excepción. Ha reportado altas tasas de autofecundación que generan exitosamente frutos y que no difieren de las obtenidas con los visitantes florales (animales) en la zona sur de Azuay (Ecuador) (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016). Mientras que en una población de Perú se descartó influencia de la autopolinización sobre la producción de frutos, sin embargo, se encontró una influencia negativa de la autopolinización en la masa de las semillas (Hazlehursts et al., 2016). Pese a ello, las dos poblaciones, *O. grandiflora* invierten recursos y energía en la formación de cuantiosos aparatos florales vistosos, con producción variante durante todo el día (mañana-tarde y noche) de néctar, para atraer polinizadores diurnos y nocturnos en la población de Ecuador (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016) y con producción variante mayoritariamente diurna en la población de Perú (Hazlehursts et al., 2016).

Ante la información obtenida localmente sobre la ecología reproductiva y polinización, hasta la instancia de fruto, fue pertinente el recabar información en la producción y calidad de las semillas, para de esta manera conocer las semejanzas y diferencias a nivel de población y conocer la estrategia reproductiva de *O. grandiflora* frente a los diversos polinizadores y origen polínico. En este trabajo, se realizaron pruebas de laboratorio como: número de semillas por folículo, peso de semillas, tamaño de semillas, imbibición y germinación sobre las semillas de frutos que tuvieron como origen cuatro tipos de polinización (Visitador Nocturno, Visitador Diurno, Control y Exclusión Total).

CAPÍTULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Área de Estudio

La presente investigación se realizó en la Estación científica “El Gullán” perteneciente a la Universidad del Azuay ubicada en la comunidad de Virgen de La Paz, parroquia El Progreso del cantón Nabón, de la provincia del Azuay en las coordenadas 3°20'17"Sur y 79°10'17"Oeste (Figura 1.1).

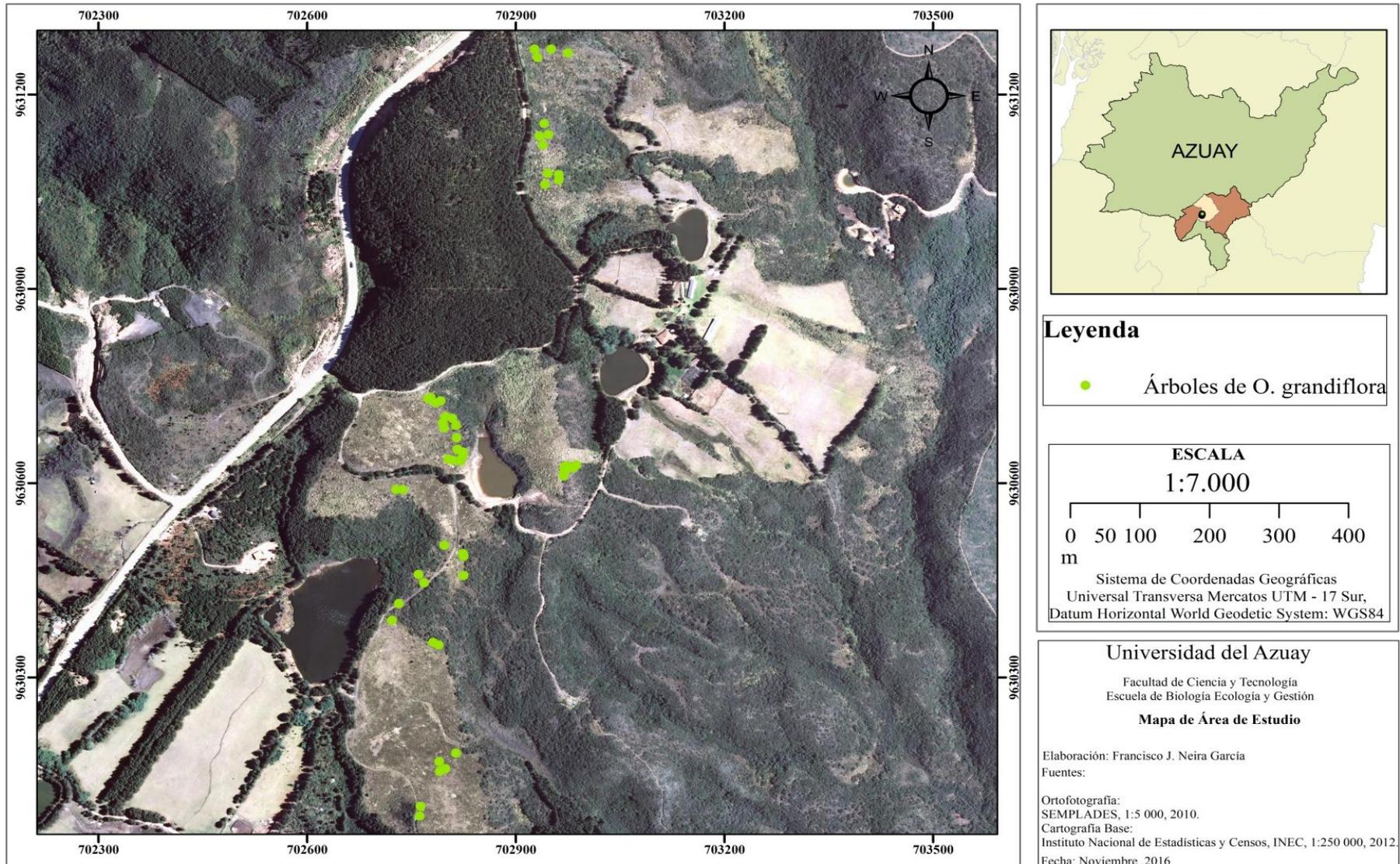


Figura 1.1 Mapa de ubicación de la estación científica “El Gullán” y los árboles en el sitio de estudio.

La extensión aproximada de la estación es de 136 hectáreas destinadas a diversos usos de suelo. Destacan las plantaciones de pino, zona de pastoreo, chaparro y bosque montano. La topografía del terreno es irregular, con pronunciadas pendientes y pequeños valles presentando varios micro-hábitat. En cuanto a su estado de conservación, se trata de una zona intervenida en recuperación, que soporta una carga de uso mediana con actividades científicas, recreacionales y de subsistencia (pastoreo de ovejas y alpacas) (IERSE, 2003; Municipalidad de Nabón y Universidad de Cuenca, 2010).

Se encuentra en una altitud entre los 2900 y 3100 m.s.n.m. y posee una temperatura que oscila entre los 6° y 18° Celsius. Tiene un régimen hídrico de dos picos anuales (febrero-mayo y noviembre-diciembre) con una precipitación anual media de 500mm (INAMHI, 2012; MAE, 2013).

Los experimentos previos que sirvieron de base para este estudio fueron realizados también en la Estación científica “El Gullán” y tuvieron como objetivo determinar la contribución de visitantes florales en la polinización de *O. grandiflora*, mediante tratamientos de exclusión planta-polinizador. Estos experimentos estuvieron ubicados en las zonas de matorral abierto donde *O. grandiflora* es abundante y conspicuo.

1.2 Especie de Estudio

Oreocallis grandiflora (Lam.) R.Br. 1810 pertenece al orden de las Proteales, familia Proteaceae, subfamilia Grevilleoideae Engl., tribu Embothrieae Reichb., subtribu Embothriinae Endl. Es una especie nativa de los Andes de la Sierra Norte del Perú y Centro-Sur del Ecuador (Jorgensen y León-Yáñez, 1999; Muriel, 2008; Pretell et al., 1985; Weston y Barker, 2006).

En Ecuador, esta especie se encuentra en Bosque Nublado Montano, Bosque Nublado Montano Bajo y Matorral Húmedo Montano (Muriel, 2008) incluso Páramo (Mena

Vásconez y Hofstede, 2006). Crece entre los 1000 y 4000 msnm (Gonzales et al., 2011; Jorgensen y León-Yáñez, 1999; Pretell et al., 1985; Reynel y Marcelo, 2009).

O. grandiflora es un Arbolito que alcanza una altura entre los 3 a 7 metros. Presenta hojas simples, coriáceas, sin estípulas, elípticas, que en sus etapas de retoño las recubre una pubescencia rojiza en el haz y el envés, mientras que en la madurez el haz se presenta liso en el envés la pubescencia está presente en las venas principales. Presenta inflorescencias en cimbras, conspicuas y color que puede variar entre el blanco y blanco-rojizas o blanco-rosado, con ejes pruinosos o ferrugineo-puberulentos en promedio 21 inflorescencias por individuo (Pretell et al., 1985; Serrano, 1996; Ulloa y Jorgensen, 1995). Muestra flores bisexuales de 4 a 5 centímetros de longitud en promedio 56 por inflorescencia. Los tépalos están unidos formando un tubo estrecho y largo que se abre en un costado en la antesis. Estambre fusionado basalmente con los tépalos, cuyas anteras son ovadas; glándula hipógina solitaria formando un disco semilunar, carnoso, escasamente lobulado; ovario estipitado con numerosos óvulos superpuestos parcialmente en dos series y carpelo ubicado diagonalmente (Ulloa y Jorgensen, 1995; Weston, 2007; Weston y Barker, 2006).

Los frutos, son folículos coriáceos alargados con cascara lisa, cilíndricos, de 10 a 15 centímetros de longitud y 1,5 a 3 centímetros de diámetro. En su interior contienen numerosas semillas dispuestas en dos hileras. Las semillas son aladas, aplanadas y elípticas con un tamaño que oscila entre 0,5 y 0,6 centímetros. Los frutos están disponibles a lo largo del año (Reynel y Marcelo, 2009; Serrano, 1996; Ulloa y Jorgensen, 1995; Weston y Barker, 2006). Tanto flores como frutos tienen un gran número de abscisiones (abortos) presentando una baja tasa de fructificación respecto a las flores generadas (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016; Landázuri-Paredes et al., 2015). Pese a ello, *O. grandiflora* forma parte de un complejo sistema de redes gracias a sus flores, frutos y semillas que son recursos requeridos y preferidos por micro-mamíferos (Cricetidae spp.), mamíferos voladores (*Anoura geoffroyi*), aves, como colibríes (*Aglaeactis cupripennis*, *Metallura tyrianthina*,

Ramphomicron michrorhynchum, *Heliangelus viola*, *Lesbia victoriae*, *Eriocnemis luciani*, *Lafresnaya lafresnayi*, *Coeligena iris*) y matorraleros como *Atlapetes latinuchus*, también se pueden notar otros grupos animales alimentándose de los recursos (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016; Landázuri-Paredes et al., 2015; Nieto y Silva, 2012; Serrano, 1996).

En cuanto a requerimiento de hábitat, *O. grandiflora* es una especie que no requiere suelos ricos en nutrientes por lo que crece normalmente en suelos en formación, con pH ácido y muy delgados (Pretell et al., 1985). Estas características favorecen su uso en cercas vivas, para proteger laderas y generar hábitat para fauna (Crespo, 2014; Fernández et al., 2009; Pretell et al., 1985).

Finalmente, para *O. grandiflora* el desempeño germinativo de las semillas en laboratorio, es elevado, presentando patrones de germinación relativamente rápidos: entre 6 y 12 días con una germinación de 98% del total de semillas (Crespo, 2014). Pretell et al. (1985) señala que tiene un tiempo de germinación máximo de 15 días y con semillas frescas alcanza un porcentaje de germinación de hasta el 97%, mientras que Reynel y Marcelo (2009) señalan un tratamiento pre germinativo con remoción del ala y remojo en agua por 48 horas, con un tiempo de germinación máximo entre 14 y 25 días, que reporta el 90 a 97% de germinación.

1.3 Metodología

1.3.1 Diseño Experimental

El diseño experimental del presente estudio se basó en el usado por Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera (2016) para probar la contribución de visitadores nocturno y diurnos en la polinización de *O. grandiflora* mediante el uso de cuatro tratamientos de polinización; 1) Control (CTRL), inflorescencias marcadas a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento. 2) Visitador Nocturno (VN), inflorescencias aisladas en la mañana y abiertas completamente desde horas crepusculares hasta antes del amanecer. 3) Visitador

Diurno (VD), inflorescencias aisladas completamente en la noche y que permanecían abiertas desde la mañana hasta horas crepusculares. 4) Exclusión Total (FULL), inflorescencias en asilamiento completo durante todo el tiempo del experimento, es decir durante el tiempo de formación de los frutos (ovarios o gineceos engrosados).

Los tratamientos a su vez, eran dispuestos en el espacio en Bloques (dobletes) que estuvieron montados entre 1 par de árboles próximos entre ellos, de máximo 10 metros de distancia. Un par de tratamientos, en un par de inflorescencias en cada árbol: VN/VD y CTRL/FULL; es decir, un par de inflorescencias de visitantes nocturnos y diurnos, para un árbol; y otro par de inflorescencias de control-exclusión para otro árbol (Figura 1.2).

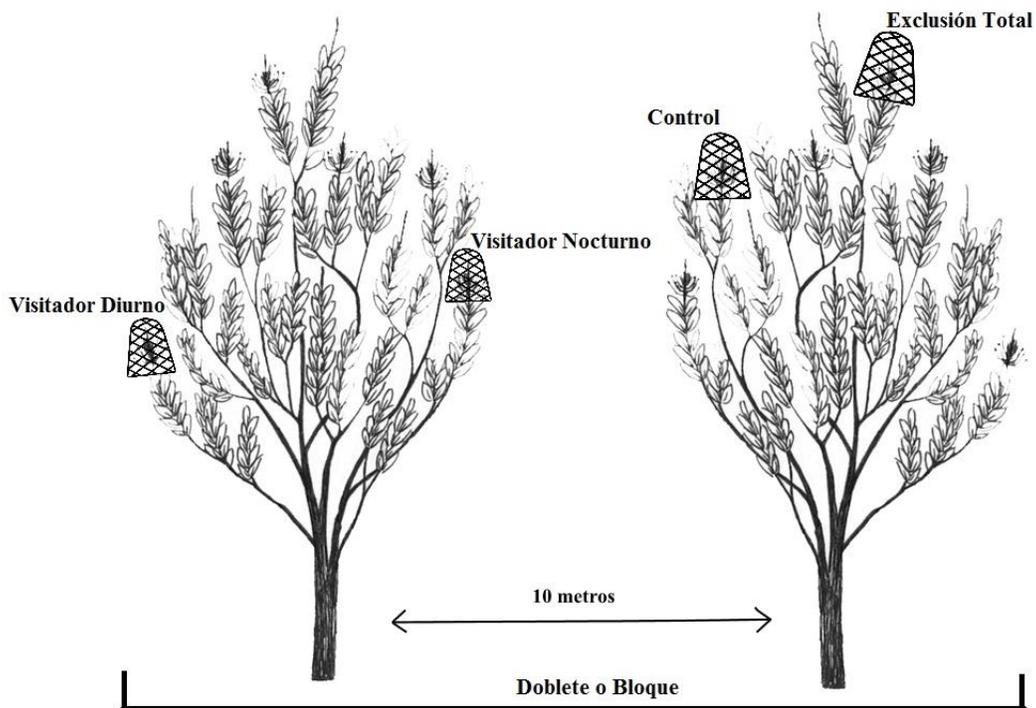


Figura 1.2. Esquema de disposición de los tratamientos en los árboles pareados. Se presentan los tratamientos Visitador Nocturno (NV), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL). Los árboles de un mismo Bloque tuvieron una distancia máxima de 10 metros entre ellos.

A los árboles dentro de sus respectivos Dobletes se les asignó una numeración del 1 al 54 ocupando una nomenclatura bimodal (Texto-numérica) respecto al número del punto

que el árbol representaba en el gps, por ejemplo: VN01, VD01, CTRL02, FULL02, así sucesivamente hasta el punto 54.

En el campo fueron otorgados los números impares a los tratamientos Visitador Nocturno (VN) y Visitador Diurno (VD) y los números pares a (Control CTRL) y Exclusión Total (FULL), teniendo al final repeticiones de los tratamientos VN y VD de dos en dos del 1 al 53, y repeticiones de dos en dos del 2 al 54 de los tratamientos CTRL y FULL, cubriendo así los 27 Dobletes establecidos en un inicio, (Anexo 1).

En el presente trabajo se utilizaron los niveles de Doblete/Bloque, Planta-Tratamiento, Tratamiento y Folículo. Para el análisis de número de semillas se utilizaron todos estos niveles. Para el análisis de tamaño, peso, imbibición y germinación se utilizaron los niveles de Doblete/Bloque, Planta-Tratamiento y Tratamiento; la discriminación del nivel de Folículo hizo factible el ejercicio de estas pruebas.

1.3.2 Recolección de Frutos

Los árboles de *O. grandiflora* fueron visitados una vez por semana durante 28 semanas desde Diciembre del 2015, con el afán de evitar la pérdida de las semillas al momento de la dehiscencia (apertura natural del folículo en la sutura). La recolección fue entre los meses de abril y julio del 2016, es decir 14 semanas.

La remoción de los frutos fue manual en el inicio del estado dehiscente (Anexo 2) y, para su traslado, fueron depositados en fundas plásticas con cierre hermético las cuales fueron etiquetadas con el código Planta/Tratamiento, el número de frutos colectados y la fecha de colección (Anexo 3). En total fueron colectados 285 frutos de 44 árboles, más 18 frutos perdidos por herbivoría, enfermedad, aborto, desecamiento (Anexo 4) o secuestro (Anexo 5) en el tiempo del monitoreo. Después de cada campaña de colección,

los frutos fueron ingresados al Laboratorio de Ecología y Manejo de Plantas Nativas de la Universidad del Azuay, donde fueron procesados para las pruebas posteriores.

1.3.3 Procesamiento de frutos y semillas en laboratorio

Los frutos colectados fueron puestos a disecar en estructuras adaptadas a manera de tendedores con un orificio por donde se ensartaban los pedúnculos y permanecían en ese estado, colgados, como máximo 4 días (fig. 1.3A). Así se les otorgaba el tiempo suficiente para completar la dehiscencia. Los folículos se colgaron separados según su procedencia (Planta/Tratamiento), cada grupo de frutos del mismo árbol se suspendía sobre fundas de papel, las cuales actuaron como receptores de las semillas en caso de desprendimiento del material (fig. 1.3B). Cuando los frutos se mostraban enteramente abiertos al término de secados, se removía las semillas manualmente con ayuda de pinzas entomológicas y bisturí, removiendo el ala y cualquier estructura de naturaleza membranosa que estuviera adherida (fig. 1.3C). Se las disponía en cajas Petri conservando su estatus en el etiquetado que constaba del número de lote, es decir, la fecha de colección de las semillas y el código Planta/Tratamiento (fig. 1.3D).



Figura 1.3. Procesamiento de frutos y semillas en el laboratorio. A) Fruto colgado por su pedúnculo en el tendedero para secado al ambiente. Los frutos dehiscentes se secaron por 4 días para evitar cualquier interferencia del tiempo post-cosecha sobre el rendimiento de las semillas. B) Fundas de papel usadas como captadores de semillas. C) Semilla íntegra, después de la remoción de la escama ovular (membrana color café oscuro) y del ala (membrana en el mismo color de la semilla). D) Semillas clasificadas con respecto a su folículo de origen.

1.3.4 Número de Semillas

Se contaron el número de semillas por folículo por Planta/Tratamiento de cada Lote obtenido. Los folículos fueron abiertos con un bisturí o a mano, mientras que las semillas fueron removidas con pinzas entomológicas y depositadas en cajas Petri.

Las semillas de folículos que tuvieran un mismo origen (Planta/Tratamiento) compartían la misma caja una vez que eran contadas por separado y se etiquetaron con el mismo estatus que compartían (Lote y Planta/Tratamiento) (Anexo 6).

A las semillas se las separó en tres grupos según sus características morfológicas: **Semillas Desarrolladas**, semillas con características que podían dar indicios de viabilidad, como las semillas hinchadas, semillas que presentaban turgencia (fig. 1.4A-1.4D) y aquellas que presentaban una aparente hinchazón en la zona embrionaria (fig. 1.4B-1.4E) (De Luca, 2010; Sánchez, 1991; Schmidt, 2000). **Semillas No Desarrolladas**, semillas planas o secas (fig. 1.4C-1.4F). **Semillas Totales**, la cantidad total de semillas que tuviera un folículo (sumatoria de Semillas desarrolladas y no desarrolladas).

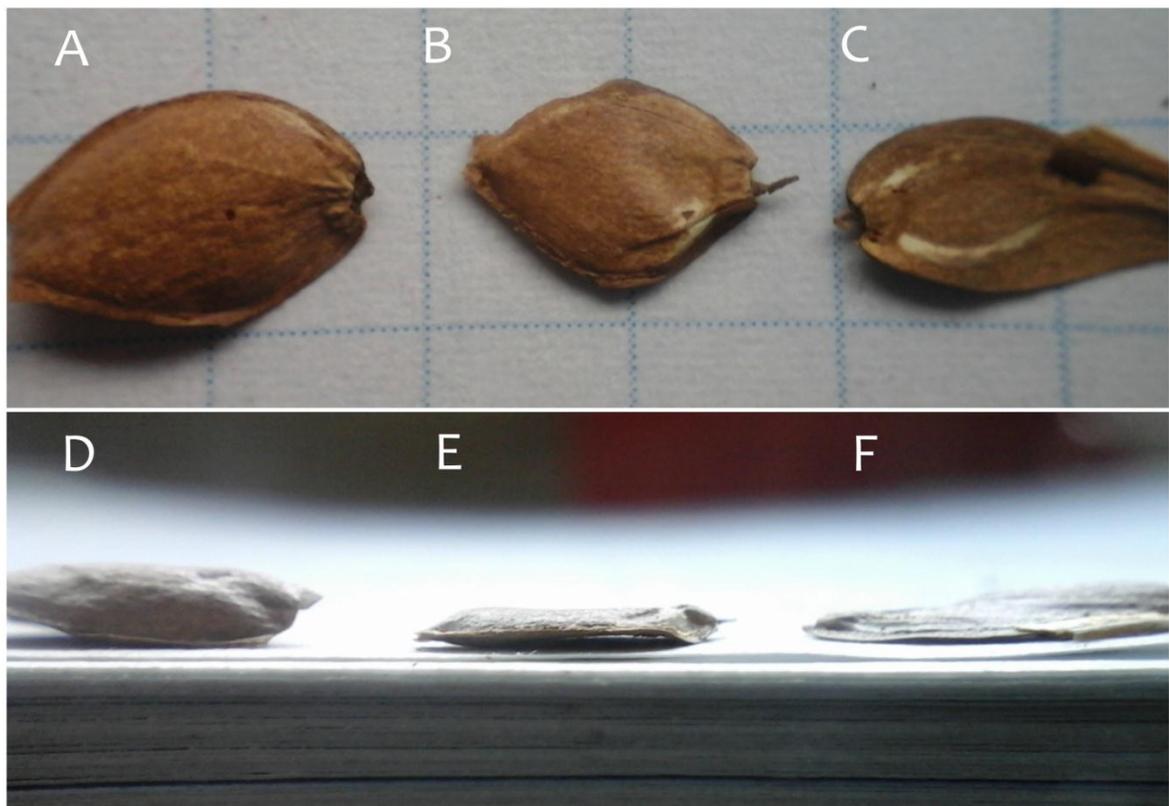


Figura 1.4. Vista de Semillas Desarrolladas y Semillas No Desarrolladas en acercamiento frontal (A, B, C) y lateral (D, E, F). Se aprecia: la vista de una semilla turgente o hinchada (A-D), una semilla que tiene un pequeño hinchazón en la zona embrionaria (B-E), consideradas Semillas Desarrolladas, y una semilla plana, considerada Semilla No Desarrollada (C-F).

Para dar soporte a esta clasificación y al uso de la característica “mínima hinchazón en la zona embrionaria” como característica de semilla desarrollada, se realizaron pruebas complementarias de Tetrazolio con el afán de comprobar que las semillas casi planas que presentan una mínima hinchazón en la zona embrionaria, demuestran igual viabilidad que las semillas hinchadas y turgentes. La Prueba de Tetrazolio (TZ), también llamada, Prueba Topográfica de Tetrazolio (TTZ) es la más usada para examinar la viabilidad de semillas. Se basa en la actividad de las des-hidrogenasas, enzimas típicas de los tejidos vivos. El Tetrazolio de color amarillo en condiciones estables, reacciona ante la presencia de la des-hidrogenasa del tejido vivo y lo pinta de color rojo (Schmidt, 2000).

Para efectos de la prueba, se colectaron al azar 12 frutos dehiscentes de *O. grandiflora* en el mismo sitio de muestreo pero de inflorescencias no marcadas y se extrajo las semillas. Se ocuparon las semillas desarrolladas ocupando los criterios expuestos anteriormente. En total 117 semillas con esas características se sumergieron en 30ml de solución de Tetrazolio al 15%. La inmersión fue durante 24 horas, en un sitio resguardado de la luz. Al completar la inmersión, se lavaron en agua destilada como sugiere Schmidt (2000). Se sustrajeron las semillas, se secaron en papel filtro y se las desprendió el tegumento para comprobar la tinción. Selectivamente se ocuparon seis semillas como evidencia de posibles escenarios en las semillas desarrolladas (Figura 1.5).



Figura 1.5. Resultado de la Prueba de TZ en Semillas Desarrolladas. Se observan 4 tipos de escenarios: A) Semilla hinchada que presentaba hidrólisis de tejido (tejido muerto). B) Semilla con un mínimo crecimiento de la parte embrionaria viable. C) Semillas hinchadas de tejido normal viables. D) Semillas hinchadas de tejido normal no viables.

1.3.5 Tamaño de Semillas.

Para realizar las mediciones de tamaño se consideró el eje frontal (respecto a la disposición en los folículos, siendo la cara frontal la que estaba expuesta a la sutura) donde se tomó las medidas de ancho y largo (Figura 1.6) (Mendizábal-Hernández et al., 2006; Muñoz et al., 2001).

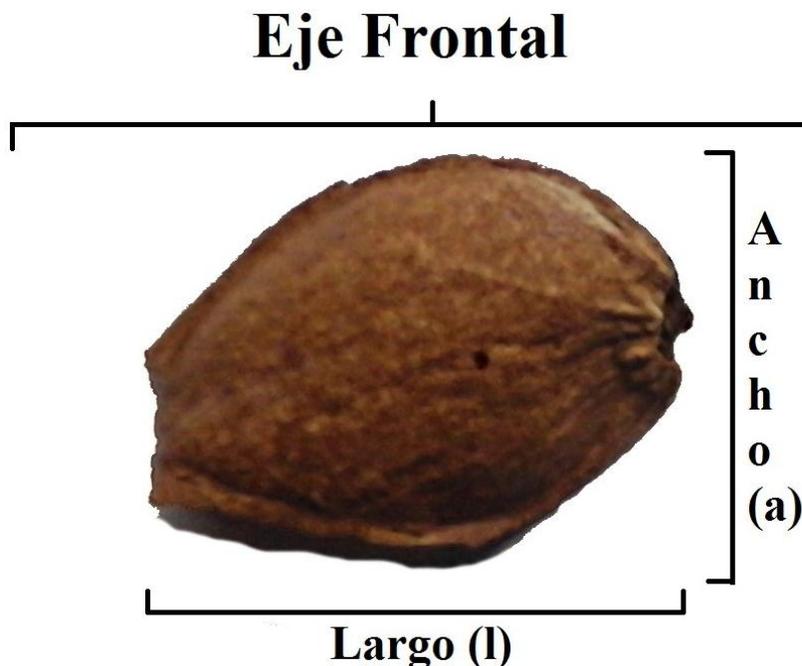


Figura 1.6. Esquema de representación del eje y dimensiones usadas para las semillas de *O. grandiflora*.

Se midieron diez semillas por grupo de Planta/Tratamiento/Lote. La medición se realizó con un calibrador manual. Los datos fueron expresados en centímetros y tuvieron una precisión de dos decimales (Anexo 7). En el análisis de datos fueron comparados a nivel de Tratamiento.

1.3.6 Peso de Semillas.

Para el peso se utilizó los datos de las mediciones del peso en seco de la prueba de imbibición, que fueron obtenidos por medio del pesaje de las semillas individualmente en una balanza digital de quilate marca Pesola, modelo PJS020 (20g x 0,001g/100ct x 0,01ct), como una opción óptima al no requerir una balanza de alta precisión, por el tamaño de la semilla. El peso obtenido fue expresado en gramos (g) con una precisión de 10^{-3} (Anexo 8). Los pesos se compararon a nivel de Tratamiento.

1.3.7 Prueba de Imbibición.

Para determinar los patrones de imbibición de las semillas se midió el incremento de masa fresca en cada hora y los datos fueron convertidos a coeficiente de incremento de masa a partir de la siguiente fórmula de porcentaje de incremento de masa de Turner et al. (2006):

% Incremento de masa= $[(W_i - W_s) / W_s] * 100$, en la que se elimina el factor de multiplicación, para quedar:

Coeficiente de Incremento de masa= $[(W_i - W_s) / W_s]$, donde W_i es el peso imbibido y W_s es el peso seco de las semillas.

Para proceder con la prueba, las semillas se pesaron en seco en una balanza digital. Luego fueron inmersas en 25ml de agua destilada y puestas a temperatura ambiente (Cook et al., 2008; Turner et al., 2009) (Anexo 9). La temperatura dentro del laboratorio varió entre los 14° y 25° Celsius. Los pesajes se hicieron en intervalos de 1 hora a partir de la hora 0 (inicio de la inmersión) hasta la hora 8, y luego a las 12, 24, 48 y 72 horas (Cook et al., 2008; Ehiagbonare y Onyebi, 2009; Turner et al., 2009). Para pesarlas luego de cada inmersión, fueron sacadas del agua, luego secadas suavemente con papel filtro asegurando el retiro del agua adherida a la superficie y finalmente puestas en la balanza (Ehiagbonare y Onyebi, 2009).

En casos donde los grupos de semillas eran numerosos, se los dividió en dos subgrupos para realizar la prueba en dos días, a su vez (Anexo 10), a su vez los subgrupos se los dividió en dos subgrupos más para realizar el pesaje con una diferencia de media hora (Anexo 11) para realizar un adecuado pesaje de semillas durante las pruebas. Jamás se repartía un grupo de semillas perteneciente a un mismo estatus entre dos horas diferentes o dos días diferentes, el grupo del mismo estatus era hecho en la misma hora o en el mismo día. Los datos fueron puestos en hojas diseñadas para el propósito, con una

ordenada disposición de los datos para los posteriores análisis (Anexo 12). La comparación se realizó a nivel de Tratamiento.

1.3.8 Prueba de Germinación.

Acabadas las 72 horas de imbibición y conservando su estatus, las semillas fueron puestas en cajas Petri con papel filtro y 5ml de agua destilada. En cada caja se sembraron entre 10 y 16 semillas. Las cajas fueron puestas en condiciones de laboratorio en una temperatura promedio de 20° y luz permanente 12 horas al día. Los registros de germinación fueron diarios, hasta un máximo de 25 días, pues *O. grandiflora* es una especie sin dormancia y de patrones germinativos rápidos (Crespo, 2014; Reynel y Marcelo, 2009).

Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula se hizo visible por fuera de la testa. Los germinantes fueron puestos aparte en cajas Petri con agua destilada y papel filtro (Anexo 13) para evitar contaminación con patógenos a las semillas no germinantes (Schmidt, 2000). Al término de los 25 días, todas las semillas que no presentaban signos de germinación eran descartadas. Los registros se realizaron en una ficha de germinación adaptada a los requerimientos del trabajo (Anexo 14). Los datos fueron comparados a nivel de Tratamiento.

1.4 Análisis de Datos y Estadística.

Los análisis estadísticos se realizaron en los programas R (versión 3.3.1, R Core Team, 2016) y SigmaPlot (versión 12.5, Systat Software, Inc. 2011). Previo al análisis, para los datos de las pruebas de imbibición, peso, largo, ancho y número de semillas por folículo (desarrolladas y totales) se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las figuras y gráficos descriptivos también fueron obtenidos en SigmaPlot y las tablas simples en Excel.

Para explorar el efecto de los tratamientos en número de semillas (totales y desarrolladas), largo-ancho de semillas y peso de semillas se utilizaron Modelos Lineales Mixtos (LMM). El nivel de Tratamiento se usó como variable fija, y el efecto de Bloque y Planta/Tratamiento se trataron de manera anidada, como variable aleatoria (Bates, Mächler, Bolker, y Walker, 2015). El paquete estadístico utilizado para analizar los datos, fue lmerTest v.2.0-32 (Kuznetsova et al., 2016), función lmer, que ejecutó pruebas ANOVA con aproximación de Kenward-Roger, auxiliar que estima efectos fijos (Bates et al., 2015).

Para los datos de imbibición se realizó una Prueba de Varianza por Rangos o Prueba H de Kruskal-Wallis, que permite el análisis de más de dos muestras independientes que presentan datos no paramétricos y establece si estas muestras son o no diferentes (Ailín Masini et al., 2014; Hernandez-Jaramillo et al., 2012; Ramos-Font et al., 2015). Se utilizó los datos crudos de imbibición a la hora 72 de los tratamientos VN, VD, CTRL y FULL, para conocer si existían diferencias entre los grupos en los valores alcanzados en esa hora con un intervalo de confianza (α) de 0,05.

Finalmente, para germinación se usó el Método Kaplan-Meier y la prueba estadística de Log-Rank. Este tipo de análisis son conocidos como Análisis de Supervivencia o “Tiempo hasta el evento” (Bland y Altman, 1998, 2004; McNair, Sunkara, y Frobish, 2012). El Método Kaplan-Meier, estima valores probables de cambio de estado hasta el final de un tiempo determinado (Bland y Altman, 1998; Manish et al., 2010; McNair et al., 2012; Sedgwick y Joeke, 2013). Presenta una facilidad interpretativa sobre otros métodos usados para graficar datos germinativos porque permite relacionar simultáneamente el tiempo y la población reclutada, presentando los puntos en el tiempo donde ocurren los cambios de estado (cero a uno) (Crespo, 2014; Pérez y Kettner, 2013; Pintado, 2016). En este caso, arroja la probabilidad de que las semillas en un estado ausente de germinación (cero) permanezcan así hasta el final del tiempo establecido de 25 días; por consiguiente estima la probabilidad de ausencia de germinación. La prueba Log-Rank permite comparar dos o más grupos de supervivientes

(germinantes) al probar la hipótesis de que no existe diferencia entre las curvas en la probabilidad de un evento. No requiere conocer la distribución de los tiempos de supervivencia (eventos), ni conocer de antemano la forma de la curva de supervivencia, lo que se traduce en una ventaja para el análisis de datos. (Bland y Altman, 2004; McNair et al., 2012). Con esto se probó si los tratamientos tuvieron o no un efecto sobre la emergencia de semillas.

CAPÍTULO II

RESULTADOS

En general se obtuvieron 3201 semillas provenientes de 285 folículos repartidas de la siguiente forma entre los tratamientos: Visitador Nocturno (782 semillas), Visitador Diurno (505 semillas), Control (1285 semillas) y Exclusión Total (629 semillas) (Figura 2.1). Del total de semillas obtenidas, 2223 semillas se encontraban desarrolladas y 978 semillas no desarrolladas (abortadas). Un total de 2000 semillas desarrolladas fueron empleadas en las pruebas de imbibición y peso, 1308 semillas desarrolladas para los datos de tamaño y las 2223 semillas desarrolladas en las pruebas de germinación.

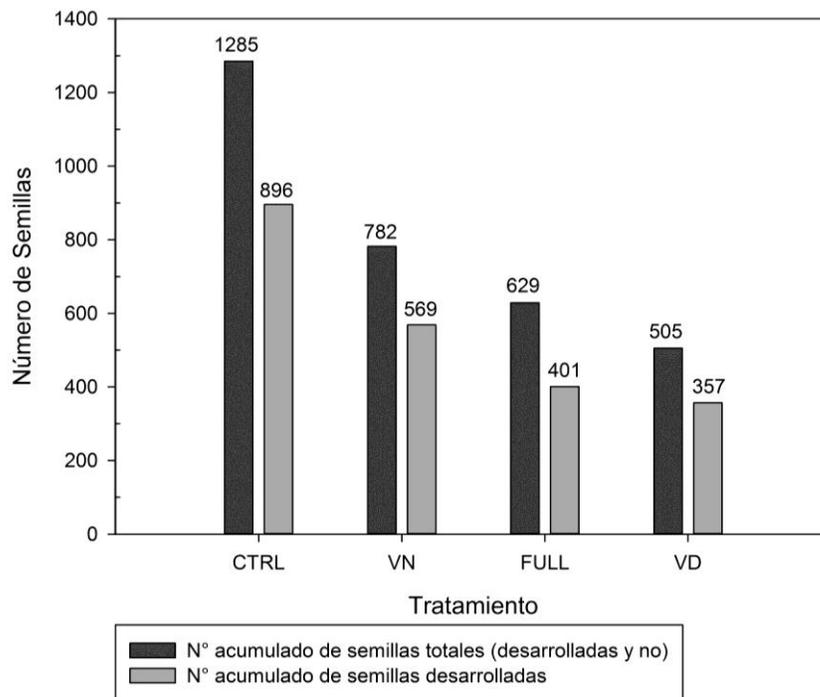


Figura 2.1. Desglose comparativo del número total de semillas versus el número de semillas desarrolladas entre los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL). La diferencia entre las columnas del mismo tratamiento evidencia la cantidad de semillas abortadas (no desarrolladas) de ese tratamiento.

2.1 Número de semillas totales por folículo y Número de semillas desarrolladas por folículo

El promedio general entre tratamientos de semillas totales por folículo fue igual a 11,232 semillas/folículo con un error estándar $\sigma=0,069$ (Figura 2.2); mientras que el promedio general entre tratamientos de semillas desarrolladas por folículo fue de 7,8 semillas/folículo con un error estándar $\sigma=0,159$ (Figura 2.2).

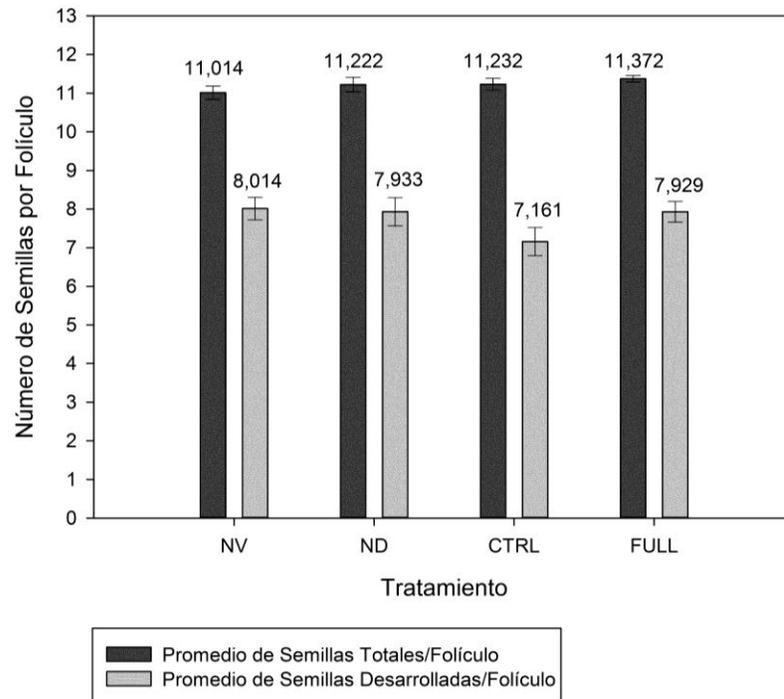


Figura 2.2. Promedio de Número de Semillas Totales por Folículo y Número de Semillas Desarrolladas por Folículo comparando los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL). Se observan las barras de error estándar dentro de cada grupo.

Los dos sets de datos en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, fallaron con un $p < 0,001$ y al aplicar la prueba de ANOVA en los análisis de LMM (Modelos Lineales Mixtos) no existió diferencia significativa entre los tratamientos para número de semillas totales y número de semillas desarrolladas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Prueba ANOVA aplicado a Semillas Totales por Folículo y Semillas Desarrolladas por Folículo.

ANOVA	df (grados de libertad)	χ^2	p
Semillas Totales	3	1,1309	0,7696
Semillas Desarrolladas	3	1,5088	0,6802

2.2 Largo y Ancho de semillas

Los promedios de largo para VN y VD fueron 0,68 y 0,67 centímetros mientras que para CTRL y FULL fue de 0,69cm, el promedio más grande de entre los tratamientos. En cuanto al promedio en ancho VN y VD presentaron el promedio más bajo: 0,48cm, mientras que FULL y CTRL tuvieron en promedio de 0,49 y 0,50 centímetros, respectivamente (Figura 2.3).

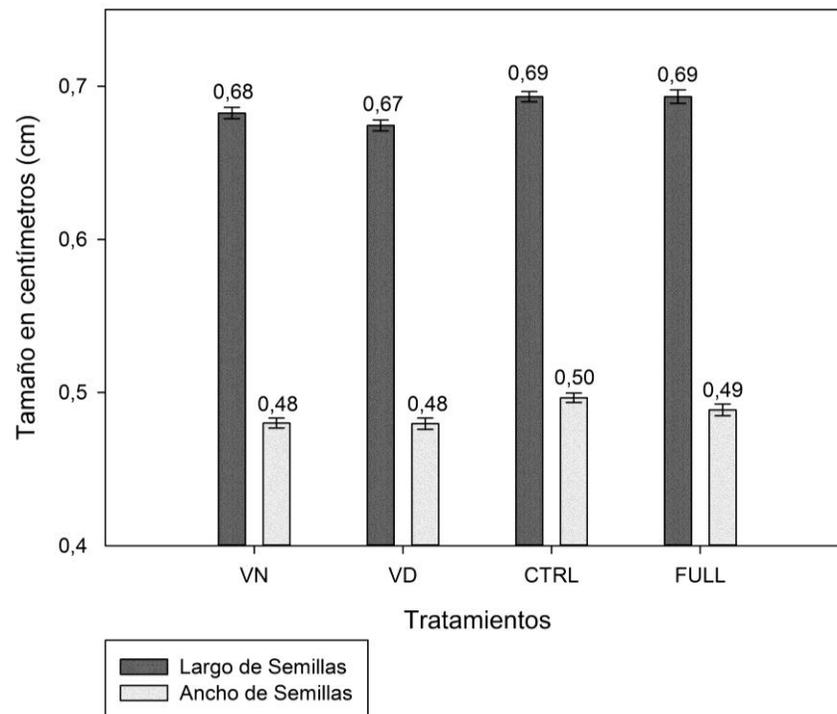


Figura 2.3. Promedio de largo y ancho de semillas de los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) and Exclusión Total (FULL). La magnitud en la que se encuentran expresados es centímetros (cm). La escala fue recortada para facilitar la observación de las barras error estándar cuyos valores son muy bajos. No existe diferencia significativa entre tratamientos.

El promedio global entre tratamientos de largo es 0,69cm, mientras que para ancho es 0,49cm con un error estándar $\sigma= 0,002$. En la prueba de normalidad de Kruskal-Wallis fallaron con un $p < 0,001$ y en la prueba ANOVA de los análisis LMM no existió diferencia significativa entre los tratamientos para largo y ancho de semillas (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Prueba ANOVA aplicado a Largo y Ancho de Semillas.

ANOVA	df (grados de libertad)	x^2	p
Largo	3	3,9702	0,2647
Ancho	3	5,6545	0,1297

2.3 Peso de Semillas

El peso promedio de los tratamientos VN y VD fue 0,019g, en contraste el tratamiento FULL presentó un promedio de 0,020g y el promedio de peso más alto fue para el tratamiento de CTRL con 0,021g. El peso promedio global entre tratamientos fue de 0,020g, presentando una medida máxima de peso de 0,049g y una mínima de 0,005g, con un $\sigma < 0,001$. La prueba ANOVA, dentro de los análisis LMM, no evidenció una diferencia significativa entre los tratamientos. ($p=0,1644$; $gl=3$; $x^2=5,1025$) (Figura 2.4).

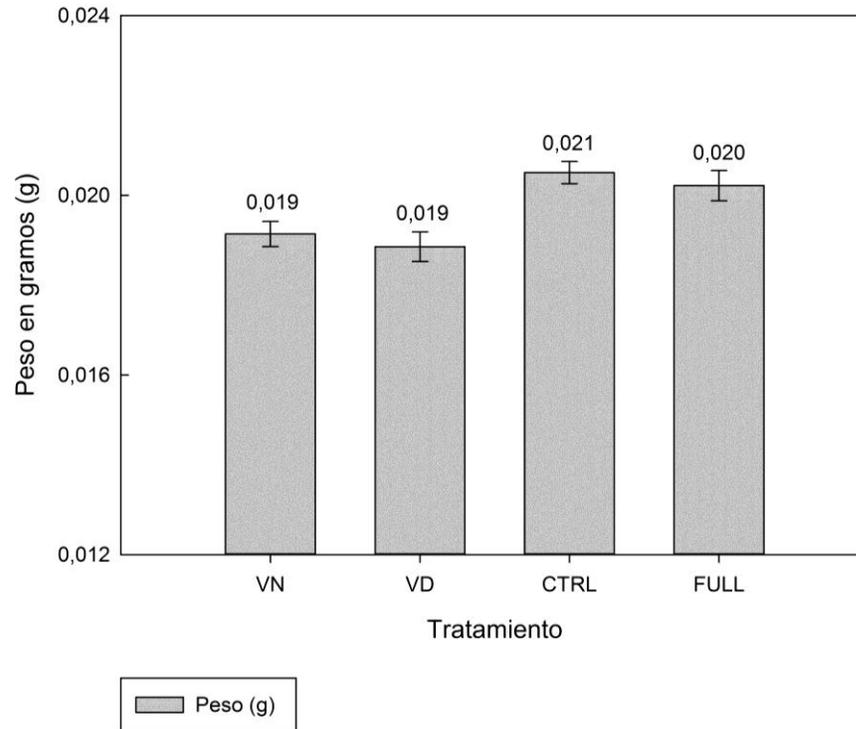


Figura 2.4 Comparación del peso promedio, expresado en gramos (g), de semillas los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL). La escala fue recortada para apreciar las barras de error estándar cuyos valores fueron muy bajos. No existieron diferencias significativas entre tratamientos.

2.4 Imbibición

El comportamiento de la curva a lo largo de la prueba presenta patrones similares (Figura 2.5), de igual forma, en base a la prueba ANOVA, el análisis de imbibición que compara los tratamientos a la hora 72 no presenta diferencia significativa entre los pesos ($p=0,259$ y $df=3$).

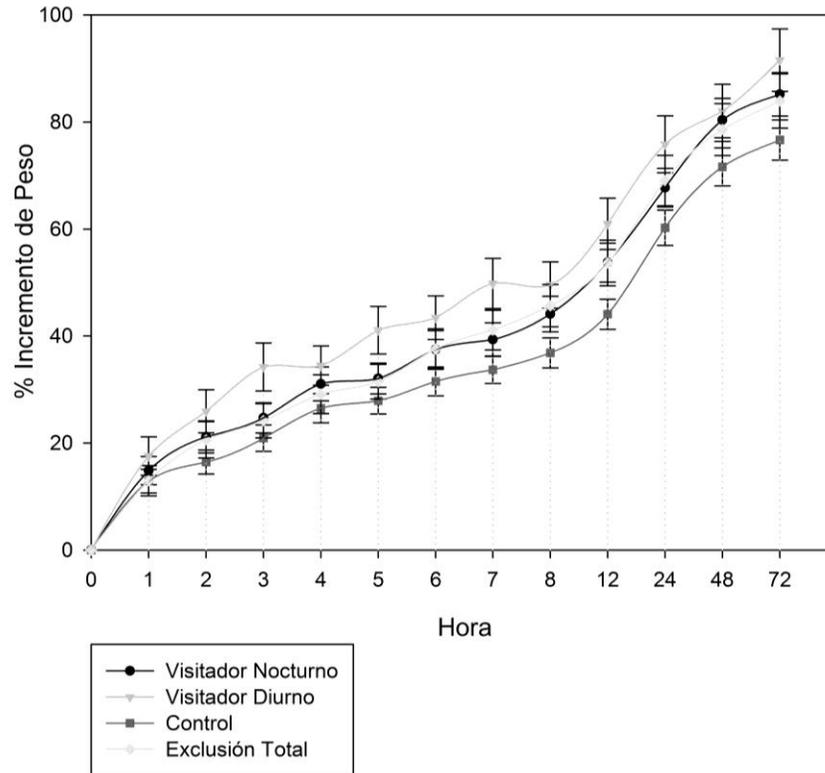


Figura 2.5 Comportamiento de las curvas de incremento promedio de masa (peso) sometiendo a comparación los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL) en las pruebas de imbibición durante las 72 horas. Diferencia no significativa entre las curvas.

2.5 Germinación

El porcentaje global de germinación entre todos los tratamientos fue del 97%. Los tratamientos más disímiles fueron VN y FULL con un porcentaje de germinación del 98% y 96% respectivamente. Sin embargo, la comparación de las curvas de probabilidad entre los tratamientos dieron resultados similares con una germinación rápida que alcanza su punto mayor entre los días 7 y 10 y con una probabilidad de ausencia de germinación que va del 0,022 del tratamiento VN al 0,044 del tratamiento FULL (la probabilidad más baja y la probabilidad más alta de no emergencia). Para la censura de datos entre los tratamientos se obtuvo un porcentaje de censura similar, entre el 2% y 4% y la prueba Log-Rank lo afirma, al estimar una diferencia no significativa entre tratamientos ($p=0,344$; $gl=3$) (Figura 2.6).

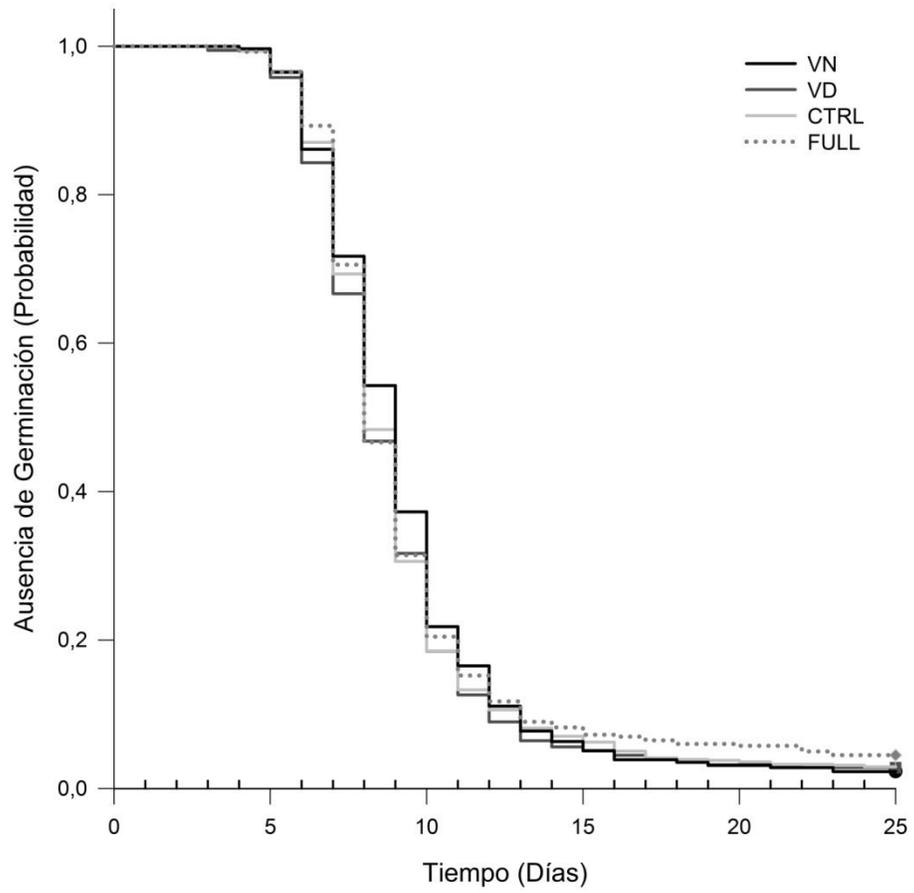


Figura 7.6 Probabilidad de Ausencia de Germinación para las semillas de los tratamientos Visitador Nocturno (VN), Visitador Diurno (VD), Control (CTRL) y Exclusión Total (FULL) en un periodo de 25 días (Método Kaplan-Meier). No existen diferencias significativas entre los tratamientos. La ausencia de germinación es baja para todos los tratamientos.

CAPÍTULO III

DISCUSIONES

Los resultados del presente trabajo sugieren que la calidad física (tamaño, número y peso) y la calidad fisiológica (absorción/ adsorción de agua y germinación) de semillas de *Oreocallis grandiflora* no está relacionada con el agente polinizador ya sea este, visitador nocturno, diurno o polen endogámico (autopolinización), pues las diferencias encontradas entre los tratamientos de polinización no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, se considera que no existe un solo polinizador efectivo, si no que la especie se beneficia tanto de la autopolinización como de la polinización por visitantes nocturnos y diurnos.

3.1 Número de semillas por folículo (totales y desarrolladas)

O. grandiflora no exhibe diferencia significativa en el número de semillas por folículo entre los distintos tratamientos. Esto contrasta con el estudio de Hazlehursts et al, (2016) donde en la población peruana de *O. grandiflora*, el número de semillas del tratamiento de autopolinización dieron un número significativamente inferior respecto al tratamiento con polen de origen lejano. De igual forma, contrasta con lo obtenido por Schmid et al. (2015), donde la autopolinización reduce el número de semillas por fruto en las 7 especies del género *Protea* (Proteaceae) estudiadas y donde la exclusión de las aves afecta negativamente la producción de semillas en 4 especies de las 7 especies del mismo género.

Se deja claro que en promedio de 11 semillas formadas, 7 semillas llegan a desarrollarse completamente por lo que el contraste entre semillas formadas y desarrolladas es evidente. Esta reducción del número de semillas en *O. grandiflora*, sería un suceso generalizado en la familia Proteaceae que estaría ligado a brindar la mayor concentración posible de fósforo a las semillas, aún si esto implica el aborto selectivo de

otras semillas dentro del folículo (Lambers, Clode, et al., 2015). La capacidad de concentrar fósforo en las semillas, es un resultado de la optimización del uso del fósforo disponible, que garantiza la re-movilización de este elemento desde las partes muertas a partes importantes de la planta como rebrotes, frutos y semillas (Lambers et al., 2011; Lambers, Clode, et al., 2015; Lambers, Finnegan, et al., 2015).

Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, existen pequeñas diferencias en los resultados que indican que los tratamientos Control y Exclusión Total tuvieron el mayor número de semillas totales por folículo, pero no el mayor número de semillas desarrolladas por folículo. Esto podría explicarse por la variación genética que tiene el polen dependiendo del agente polinizador. Así, los frutos del tratamiento Control, al tener una alta variación de origen polínico (ya que este polen no es de un vector específico) presenta el aporte total de polen de los distintos polinizadores de *O. grandiflora*, incluidos los de eventos endogámicos; mientras que, los frutos del tratamiento Exclusión Total (de origen endogámico), aparentemente responden a la premisa, de que ante una autopolinización, las plantas generan una gran cantidad de semillas (Busch y Delph, 2012); en este sentido, la expresión de una alta cantidad de frutos producto de la autopolinización que ya ha sido reportado en trabajos anteriores (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016) no está ligada con la aptitud y viabilidad de las semillas generadas. Por otro lado, el tratamiento Visitador Nocturno tuvo el mayor número de semillas desarrolladas por folículo, con lo que se evidencia que el tratamiento Visitador Nocturno, tiene una mayor expresión de semillas que tienen más probabilidad de germinar por su aptitud y capacidad germinativa, como resaltan Dos Santos et al. (2009) y Sosa-Luría et al. (2012). Al no tener datos concluyentes que soporten estas ideas, se deja en evidencia que *O. grandiflora* es factible la endogamia con producción exitosa de semillas, como en otras especies de Proteaceas (Ayre et al., 1994; Collins, Walsh, y Grey, 2008; Schmid et al., 2015; Steenhuisen y Johnson, 2012).

3.2 Tamaño de semillas

El origen polínico no influyó en el tamaño (largo, ancho) de semillas de *O. grandiflora*, tal como registra Forrest et al. (2011) con *Grevillea mucronulata* R. Br. (Proteaceae) en donde una serie de propiedades de frutos y semillas (incluido tamaño de semillas) no se ven afectadas por el origen del polen (endogámico o exogámico); sin embargo, este estudio señala la importancia que tiene el polen cuyo origen tiene un rango medio (30-50 metros de distancia desde el origen del polen, hasta la planta polinizada) pues tiene el mejor desempeño para la producción de frutos y semillas (Forrest et al., 2011).

El hallazgo de que las semillas en el tratamiento Exclusión Total no tuvieron una reducción en su tamaño, no tiene un equivalente en Proteaceas, pues el tamaño de semilla no es tomado como un parámetro en estudios para determinar la influencia de la endogamia. Sin embargo, en otras especies como *Crinum erubescens* Aiton (Amaryllidaceae) y *Cucurbita moschata* (Duchesne) Duchesne Ex Poir. (Cucurbitaceae) se evidencia una reducción notable del tamaño de la semilla cuando estas son obtenidas mediante autopolinización (Inácio Cardoso, 2004; Manasse y Stanton, 1991). Conclusiones similares se hallaron en especies leñosas neotropicales (Vamosi et al., 2008). Bajo estas condiciones el tamaño de semilla en *Oreocallis grandiflora* podría estar influenciado estrictamente por el control parental, es decir para el tamaño de semillas en primer plano pesarían factores intrínsecos de la planta como, expresión de los genes para el crecimiento del endospermo, el marcaje de aminoácidos específicos para la degradación y reciclaje de proteínas innecesarias, producción de suficiente de fitohormonas, la relación tamaño semilla/crecimiento de los órganos vegetales, entre otros (N. Li y Li, 2015).

3.3 Peso de semillas

El peso no se vio influenciado por los tratamientos de polinización en *O. grandiflora*, lo que contrasta con lo encontrado por Hazlehursts et al. (2016) en una población peruana de *O. grandiflora*, en donde se evidencia una reducción considerable de la masa de las

semillas obtenidas por autopolinización respecto a las semillas obtenidas con polen de origen lejano. Al parecer el peso de semillas de *O. grandiflora* para el sur del Ecuador podría estar condicionado por otros factores diferentes al origen polínico, como adaptaciones evolutivas de la especie a cada zona en particular donde ocurre, como se demuestra en especies como *Aeschynomene americana* L. (Fabaceae), *Amaranthus retroflexus* L. (Amaranthaceae) y *Potamogeton pectinatus* L. (Potamogetonaceae), donde las semillas presentaron diferencias significativas del peso entre las distintas poblaciones que ocurrían en distintos puntos geográficos (Z. Li et al., 2015; McWilliams et al., 1968; J. Zhang, 1998).

En otras especies de la familia Proteaceae se ha evidenciado que no existe influencia en el peso de los tratamientos de polinización aplicados a las semillas, como en el género *Protea* (Schmid et al., 2015); en contraste, en otras especies se reporta un mayor peso de semillas obtenidas a partir de una polinización mediada por uno u otro polinizador (diferentes a autopolinización), como es el caso de *Banksia ilicifolia* y *Banksia spinulosa*; además se apunta que existe una preferencia polínica para el caso de *Banksia ilicifolia* (Heliyanto et al., 2005; Vaughton y Ramsey, 1997).

3.4 Imbibición y Germinación

Los tratamientos de polinización no influyeron significativamente en la imbibición y en la capacidad germinativa de semillas *O. grandiflora*. Se obtuvo altos porcentajes de germinación tanto en semillas obtenidas de autopolinización y polinización a través de vectores externos, como reporta Schmid et al. (2015) en pruebas de germinación con siete especies de *Protea* (Proteaceae).

A pesar de observarse ligeras variaciones en las pruebas de imbibición como en germinación, estas fueron despreciables, por lo que se confirma la nula influencia del origen polínico en los procesos germinativos de *O. grandiflora*. Resultados similares se obtuvieron en otras especies de Proteaceas de los géneros *Grevillea mucronulata*, donde

a pesar de influir el polen según la distancia de su origen, los efectos de autopolinización y polinización cruzada son nulos y en *Protea caffra*, donde bajo distintos tratamientos de polinización, incluido la autopolinización, el porcentaje de germinación no varió (Forrest et al., 2011; Steenhuisen, 2012).

3.5 Consideraciones Finales

La capacidad reproductiva, manifestada en la producción y calidad física y fisiológica de semillas, de *O. grandiflora*, parece no estar ligada al tipo de polinizador o de polinización, si no a otras variables como, el suelo, amplia gama disponible de polinizadores y factores intrínsecos de las plantas.

Las características químicas del suelo en el lugar de estudio, pudieron influir en la capacidad reproductora de *O. grandiflora*; pues el tipo de suelo encontrado al sur de la provincia de Azuay, es un suelo mayoritariamente de tipo Dystric Histosols (Buytaert et al., 2005; Chacón et al., 2015), que presenta baja disponibilidad de fósforo (P), que lo convierte en un nutriente limitante para las especies vegetales (Bossio y Cassman, 1991; Buytaert et al., 2005; Chacón et al., 2015; Chacón et al., 2003; Nanzyo, 2002). Ante esta limitación de fósforo, ciertas plantas, como las de la familia Proteaceae, han desarrollado una estrategia importante de absorción y fijación de fósforo, que se trata de utilizar eficientemente el recurso, removilizándolo de las partes envejecidas a brotes verdes y partes jóvenes, exudando el exceso de fósforo y acumulando fósforo en sus semillas; de esta manera garantizan en su progenie (semillas) cantidades altas de fósforo para asegurar una colonización exitosa en este tipo de suelos (Lambers et al., 2011; Lambers, Finnegan, et al., 2015). Por consiguiente, su supervivencia no dependería directamente del número de semillas aptas para colonizar, pues todas en potencia tendrían las mismas características nutricionales ligadas a un monto fuerte de fósforo en sus tejidos, que les permite establecerse en ambientes empobrecidos de fósforo (Lambers, Clode, et al., 2015; Lambers, Finnegan, et al., 2015).

La disponibilidad de múltiples tipos de polinizadores, puede ser otro factor influyente en la capacidad reproductora de la especie, pues varios autores registran que *O. grandiflora* es visitado por distintos grupos animales, desde insectos hasta mamíferos (Cárdenas, 2015; Hazlehurst et al., 2016; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016; Landázuri-Paredes et al., 2015). Esta gama de visitantes florales evidencia una adaptación típica de especies hermafroditas como lo sugieren para *O. grandiflora* y otras Proteáceas del género *Aulax* y *Leucadendron* (Ayre y Whelan, 1989; Cárdenas, 2015; Collins y Rebelo, 1987; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016) que sumada a su alta tasa de autofecundación (Cárdenas, 2015), podría facultar a la especie a prescindir de todos o algunos de los polinizadores. Esto puede presentar una ventaja reproductiva frente a especies que requieren un polinizador específico. La razón es que en cuanto disminuye o fluctúa un grupo específico de visitantes, como ocurre en *O. grandiflora* (Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016), la capacidad reproductora no es afectada, pues hay otros tipos de polinizadores que reemplazan la ausencia del grupo polinizador faltante (Waser et al., 1996).

Por último, factores propios de la planta madre pudieron influir en la generación de semillas, como la condición intrínseca de expresión del número máximo de inflorescencias que selectivamente reducen su número, por ende de frutos y también el número de semillas en un folículo, pudiendo llegar al final de la dehiscencia solo las semillas más aptas para germinar (Ayre y Whelan, 1989; Haig y Westoby, 1988; Melser y Klinkhamer, 2001; Stephenson y Winsor, 1986) o la influencia que tiene la planta madre sobre su progenie que controla su producción, sus características físicas (fenotipo) o fisiológicas (dormancia), o su desarrollo (Chaudhury y Berger, 2001; Lacey et al., 1997; Roach y Wulff, 1987).

CONCLUSIONES

- Al igual que con el estudio de la influencia de tratamientos (VN, VD, CTRL y FULL) en los frutos de *O. grandiflora* de Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera (2016), en donde no se presentaban influencias de los distintos visitantes florales, se expone que no existe influencia en las características físicas y fisiológicas de semillas cuyo origen polínico tuvo distinto contribuyente.
- Así como en otras especies de Proteáceas que presentan auto-compatibilidad (Ayre et al., 1994; Cadzow y Carthew, 2000; Forrest et al., 2011; Schmid et al., 2015; Steenhuisen y Johnson, 2012; Steenhuisen et al., 2012) *O. grandiflora* comparte esta característica como sugirieron ya autores como Cárdenas (2015), Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera (2016) y Landázuri-Paredes et al. (2015). La auto-compatibilidad presenta una ventaja reproductiva si los polinizadores llegaran a escasear; al prescindir de polinizadores aseguran la producción de progenie con su propio polen disponible todo el tiempo (Barrett, 2009; Eckert et al., 2006). Las semillas producidas en la autopolinización tienen dos réplicas exactas del material genético del árbol madre; que llega a conseguirse a un gran coste, pues estas semillas corren el riesgo de presentar efectos de la depresión endogámica (como disminución de su aptitud germinativa frente a semillas obtenidas de polinización cruzada) y expresar alelos recesivos perjudiciales (Busch y Delph, 2012; Karron et al., 2012; Pannell, 2001).
- La presentación de inflorescencias conspicuas y abundantes y ovarios con numerosos óvulos que forman numerosas semillas dentro del fruto apuntan a que *Oreocallis grandiflora* es una especie generalista (Arroyo et al., 2006; Ayre y Whelan, 1989; Bawa, 2016; Peng et al., 2014). Varias características de la especie sostienen esta propuesta, los rasgos florales a favor de un solo tipo de polinizador (murciélagos) (Fleming et al., 2009), que no cambian pese a que los polinizadores son de diverso tipo (es decir, no hay divergencia floral) (Gómez

et al., 2015) a más de que la fructificación que no está limitada por la cantidad de polen disponible (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes et al., 2015), se interpreta como una táctica evolutiva para maximizar la polinización exitosa por medio de distintos grupos faunísticos (Castellanos et al., 2006). Además de ello, *O. grandiflora* exhibe características que favorecen el proceso de generalización (Gómez, 2002) como: 1) Fluctuación de los visitantes florales a través del tiempo, lo que provoca que la efectividad de polinización entre los visitantes sea cambiante y se solapen, es decir, que no haya un solo polinizador efectivo. 2) Abundancia de visitantes florales que varía espacialmente, tal como lo demuestra Hazlehursts et al. (2016) en dos poblaciones de *O. grandiflora* del norte de Perú y del sur del Ecuador. 3) Producción de semillas viables, con buenas características físicas y alta probabilidad de emergencia, ya sean estas de origen polínico cruzado o autógamo, que diluye el efecto de los polinizadores sobre el “fitness” de la planta. 4) Efectividad similar de los diferentes polinizadores tanto para la formación de frutos (Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016) como para la formación de semillas viables; y 5) Preferencia similar de distintos grupos visitantes ante sus rasgos florales, como ha sido reportado por varios autores (Cárdenas, 2015; Landázuri-Paredes y Mogrovejo-Barrera, 2016; Landázuri-Paredes et al., 2015; Nieto y Silva, 2012; Serrano, 1996).

- Los resultados obtenidos, obedecen a condiciones propias del sur del Ecuador, tales como polinizadores o tipo de suelo, por lo que es importante hacer estudios similares en otros ecosistemas donde *O. grandiflora* esté presente como Hazlehursts et al. (2016) comparando poblaciones de *O. grandiflora* para así poder ampliar el conocimiento sobre la variabilidad de producción de frutos y semillas de respecto a diversos factores en otros ambientes. Es importante ahondar en estudios de este tipo dentro de valles cercanos con presencia de *O. grandiflora* y así contrastar la respuesta de la planta en distintos rangos altitudinales, climáticos y con distinto ensamblaje de polinizadores en busca de un mosaico geográfico de especialización, que es la adaptación frente a

polinizadores locales que varían entre dos o más poblaciones de una misma especie, para aclarar si esta especie se comporta como en una planta generalista a nivel de especie pero especialista a nivel población (Thompson, 1994).

RECOMENDACIONES

- En próximos estudios debería incluir a las especies de polinizadores (todos ellos insectos) que fueron omitidas para efectos de estos experimentos, de esta manera se tendría la comprensión de su influencia o no, en *O. grandiflora*.
- Los resultados de este estudio sugieren que *O. grandiflora* es una especie con gran potencial para la restauración de ecosistemas degradados, por ser una especie que se desarrolla bien en suelos empobrecidos de fosforo lo que le permitiría generar cambios positivos en la estructura del ecosistema; y por otras características como producir un número considerable de semillas de alta calidad física y fisiológica y con una buena respuesta germinativa (97% en 9 días). Adicionalmente, ya que es una especie que atrae múltiples polinizadores, su reintroducción en paisajes degradados contribuiría también a la recuperación funcional de los ecosistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ailín Masini, A., Rovere, A., & Pirk, G. (2014). Requerimientos pregerminativos de *Maihuenia patagonica* y *Maihueniopsis darwinii*, cactáceas endémicas de Patagonia. *Gayana Botánica*, 71(2), 0717-6643.
- Albano, S., Salvado, E., Duarte, S., Mexia, A., & Borges, P. a V. (2009). Pollination effectiveness of different strawberry floral visitors in Ribatejo, Portugal: Selection of potential pollinators. Part 2. *Advances in Horticultural Science*, 23(4), 246-253.
- Arroyo, M. T. K., Muñoz, M. S., Henríquez, C., Till-Bottraud, I., & Pérez, F. (2006). Erratic pollination, high selfing levels and their correlates and consequences in an altitudinally widespread above-tree-line species in the high Andes of Chile. *Acta Oecologica*, 30(2), 248-257. <http://doi.org/10.1016/j.actao.2006.05.006>
- Ayre, D., & Whelan, R. (1989). Factors controlling fruit set in hermaphroditic plants: studies with the Australian Proteaceae. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 267-272.
- Ayre, D., Whelan, R., & Reid, A. (1994). Unexpectedly high levels of selfing in the Australian shrub *Grevillea barklyana* (Proteaceae). *Heredity*, 72, 168-174. <http://doi.org/10.1038/hdy.1994.24>
- Barrett, S. C. H. (2009). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B-Biological Sciences*, 365(1537), 99-109. <http://doi.org/10.1098/rstb.2009.0199>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-51. <http://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

- Bawa, K. S. (2016). Kin Selection and the Evolution of Plant Reproductive Traits. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 283(1842), 1-8. <http://doi.org/10.1098/rspb.2016.0789>
- Bland, M., & Altman, D. (1998). Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ (British Medical Journal)*, 317, 1572. <http://doi.org/doi:10.1136/bmj.317.7172.1572>
- Bland, M., & Altman, D. (2004). The Logrank test. *BMJ (British Medical Journal)*, 328, 1073. <http://doi.org/10.1136/bmj.328.7447.1073>
- Bossio, D., & Cassman, K. (1991). Traditional Rainfed Barley Production in the Andean Highland of Ecuador: Soil Nutrient Limitations and Other Constraints. *Mountain Research and Development*, 11(2), 115-126. <http://doi.org/10.2307/3673571>
- Burkle, L., & Irwin, R. (2009). The effects of nutrient addition on floral characters and pollination in two subalpine plants, *Ipomopsis aggregata* and *Linum lewisii*. *Plant Ecology*, 203, 83-98. <http://doi.org/10.1007/s11258-008-9512-0>
- Busch, J. W., & Delph, L. F. (2012). The relative importance of reproductive assurance and automatic selection as hypotheses for the evolution of self-fertilization. *Annals of Botany*, 109(3), 553-562. <http://doi.org/10.1093/aob/mcr219>
- Buytaert, W., Deckers, J., & Wyseure, G. (2005). Description and Classification of nonallophanic Andosols in south ecuadorian alpine grasslands (páramo). *Geomorphology*, 73(3-4), 207-221. <http://doi.org/10.1016/j.geomorph.2005.06.012>
- Cadzow, B., & Carthew, S. (2000). Breeding system and fruit development in *Persoonia juniperina* (Proteaceae). *Cunninghamia*, 6, 941-950.
- Calviño, A. (2014). Effects of ovule and seed abortion on brood size and fruit costs in the leguminous shrub *Caesalpinia gilliesii* (Wall. ex Hook.) D. Dietr. *Acta Botanica*

Brasilica, 28(1), 59-67. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062014000100006>

Cárdenas, S. (2015). *Ecología de Polinización de Oreocallis grandiflora (Lam.) R. Br. (Proteacea) en un Matorral Montano del Sur del Ecuador*. Universidad del Azuay.

Cardoza, Y. J., Harris, G. K., & Grozinger, C. M. (2012). Effects of soil quality enhancement on pollinator-plant interactions. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012, 8 pages. <http://doi.org/10.1155/2012/581458>

Carr, S. A., & Davidar, P. (2015). Pollinator Dependency , Pollen Limitation and Pollinator Visitation Rates To Six Vegetable Crops in Southern India. *Journal of Pollination Ecology*, 16(August 2014), 51-57.

Carthew, S. M., & Goldingay, R. L. (1997). Non-flying mammals as pollinators. *Trends in Ecology and Evolution*. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(96\)10067-7](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(96)10067-7)

Castellanos, M. C., Wilson, P., Keller, S. J., Wolfe, A. D., & Thomson, J. D. (2006). Anther evolution: pollen presentation strategies when pollinators differ. *The American naturalist*, 167(2), 288-96. <http://doi.org/10.1086/498854>

Chacón, G., Gagnon, D., & Paré, D. (2015). Soil Agricultural Potential in Four Common Andean Land Use Types in the Highlands of Sourthern Ecuador as Revealed by a Corn Bioassay. *Agricultural Sciences*, 6, 1129-1140. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/as.2015.610108>

Chacón, G., Gagnon, D., Paré, D., & Proulx, D. (2003, febrero). Impacto de la Reforestación, Pastizales, Plantaciones de Eucalipto y Pino en Suelos de Bosque Montano Alto, en la Sierra Sur del Ecuador. *Revista de Investigación de la Universidad del Azuay*, 19-34.

- Chaudhury, A. M., & Berger, F. (2001). Maternal control of seed development. *Cell & Developmental Biology*, 12, 381-386. <http://doi.org/10.1006/scdb.2001.0267>
- Cocucci, A. a., & Sérsic, A. N. (1998). Evidence of rodent pollination in *Cajophora coronata* (Loasaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 211, 113-128. <http://doi.org/10.1007/BF00984916>
- Collevatti, R. G., Estolano, R., Garcia, S. F., & Hay, J. D. (2009). Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Botany*, 87(11), 1110-1115. <http://doi.org/10.1139/B09-054>
- Collins, B., & Rebelo, T. (1987). Pollination biology of the Proteaceae in Australia and southern Africa. *Austral Ecology*, 12(4), 387-421. <http://doi.org/DOI:10.1111/j.1442-9993.1987.tb00958.x>
- Collins, B., Walsh, M., & Grey, J. (2008). Floral development and breeding systems of *Dryandra sessilis* and *Grevillea wilsonii* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany*, 56(2), 119-130. <http://doi.org/10.1071/BT07147>
- Cook, A., Turner, S., Baskin, J., Baskin, C., Steadman, K., & Dixon, K. (2008). Occurrence of Physical Dormancy in Seeds of Australian Sapindaceae: A Survey of 14 Species in Nine Genera. *Annals of Botany*, 101, 1349-1362. <http://doi.org/10.1093/aob/mcn043>
- Crespo, A. (2014). *Direct seeding with native trees in south central Ecuador: Enhancing restoration potencial with local knowledge*. University of Florida.
- De Luca, N. (2010). Características de las Semillas, Tratamientos pregerminativos, técnicas de recolección y almacenamiento. Recuperado 13 de enero de 2016, a partir de <https://cursoreforestacion.wordpress.com/>

- Dieringer, G. (1992). Pollinator Effectiveness and Seed Set in Population of *Agalinis strictifolia* (Scrophulariaceae). *Botanical Society of America. Inc.*, 79(9), 1018-1023. <http://doi.org/10.2307/2444911>
- Dilcher, D. L. (1979). Early angiosperm reproduction: An introductory report. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 27(3-4), 291-328. [http://doi.org/10.1016/0034-6667\(79\)90015-0](http://doi.org/10.1016/0034-6667(79)90015-0)
- Dos Santos, S., da Silva, R., Pereira, M., Machado, J., Bórem, F., Gomes, V., & Tonetti, O. (2009). X-ray technique application in evaluating the quality of papaya seeds. *Seed Science and Technology*, 37(3), 776-780.
- Eckert, C., Samis, K., & Dart, S. (2006). Reproductive assurance and the evolution of uniparental reproduction in flowering plants. En L. D. Harder & S. C. Barrett (Eds.), *Ecology & Evolution of Flowers* (1ra ed., pp. 183-203). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Ehiagbonare, J., & Onyebi, H. (2009). Seed storage evaluation, imbibition capacity assesment and seed pre-sowing treatment studies on *Newbouldia leavis* (P. Beauv) ex bureau. *Scientific Research and Essay*, 4(5), 453-456. <http://doi.org/10.5897/SRE>
- Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. (2004). Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 375-403. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>
- Fernández, D., Trovant, B., & López, J. (2009). *Reintegración ecológica y económica de una ladera interandina del noreste de Gualaceo (Azua, Ecuador)*. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Universidad Central del Ecuador.

- Fleming, T. H., Geiselman, C., & Kress, W. J. (2009). The evolution of bat pollination: A phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, *104*(6), 1017-1043. <http://doi.org/10.1093/aob/mcp197>
- Forrest, C., Ottewell, K., Whelan, R., & Ayre, D. (2011). Tests for inbreeding and outbreeding depression and estimation of population differentiation in the bird-pollinated shrub *Grevillea mucronulata*. *Annals of Botany*, *108*, 185-195. <http://doi.org/10.1093/aob/mcr100>
- Friis, E. M. (2000). Fossil floral structures of a basal angiosperm with monocolpate, reticulate-acolumellate pollen from the Early Cretaceous of Portugal. *Grana*, *39*, 226-239. <http://doi.org/10.1080/00173130052017262>
- Friis, E. M., Pedersen, K. R., & Crane, P. R. (2010). Diversity in obscurity: fossil flowers and the early history of angiosperms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *365*(1539), 369-82. <http://doi.org/10.1098/rstb.2009.0227>
- Giannini, T., Cordeiro, G., Freitas, B., Saraiva, A., & Imperatriz-Fonseca, V. (2015). The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, *108*, 849-857. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Goldingay, R. L., & Carthew, S. M. (1998). Breeding and Mating Systems of Australian Proteaceae. *Australian Journal of Botany*, *46*, 421-437. <http://doi.org/10.1071/bt97037>
- Gómez, J. M. (2000). Effectiveness of ants as pollinators of *Lobularia maritima*: effects on main sequential fitness components of the host plant. *Oecologia*, *122*(1), 90-97. <http://doi.org/10.1007/PL00008840>

- Gómez, J. M. (2002). Generalización en las interacciones entre las plantas y polinizadores. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 105-116. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2002000100010>
- Gómez, J. M., Perfectti, F., Abdelaziz, M., Lorite, J., Muñoz-Pajares, A. J., & Valverde, J. (2015). Evolution of pollination niches in a generalist plant clade. *New Phytologist*, 205(1), 440-453. <http://doi.org/10.1111/nph.13016>
- Gonzales, P. O., Angeles, C. T., Picón, F. C., Wong, M. C., K, H. B., & Sambucus, H. B. K. (2011). Características de suelo y usos tradicionales de especies vegetales en la Provincia de Huaraz , Ancash , Perú Soil features and traditional uses of plant species in the province of. *ECIPERÚ*, 8(1), 44-47. <http://doi.org/1813-0194>
- Gudade, B., Babu, S., Bora, S., Dhanapal, K., & Singh, R. (2016). Effect of boron on growth, nutrition and fertility status of large cardamom in Sikkin Himalaya, India. *Journal of Applied and Natural Science*, 8, 822-825.
- Haig, D., & Westoby, M. (1988). On limits to seed production. *The American Naturalist*, 131, 757-759.
- Hazlehursts, J., Tinoco, B., Cárdenas, S., & Karubian, J. (2016). Pollination ecology of *Oreocallis grandiflora* (Proteaceae) at the northern and southern ends of its geographic range. *Journal of Pollination Ecology*.
- Heliyanto, B., Veneklaas, E. J., Lambers, H., & Krauss, S. L. (2005). Preferential outcrossing in *Banksia ilicifolia* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany*, 53(2), 163-170. <http://doi.org/10.1071/BT04011>
- Hernandez-Jaramillo, A., Pinzón, P., & Parrado-Rosselli, Á. (2012). Depredación de las Semillas de *Sanpindus saponaria* L. por *Leptostylus gibbulosus* Bates (Coleoptera: Cerambycidae) y su efecto en la Germinación. *Colombia Forestal*, 15(2), 247-260.

- Huda, A. N., Salmah, M. R., Hassan, A. A., & Razak, M. N. (2015). Pollination Services of Mango Flowers Pollinators. *Journal of Insect Science*, 15(1). <http://doi.org/10.1093/jisesa/iev090>
- IERSE. (2003). Universidad del Azuay-Geomática y Territorio. Recuperado a partir de <http://www.uazuay.edu.ec/geomatica/metadatos.html>
- Inácio Cardoso, A. I. (2004). Depression by inbreeding after four successive self-pollination squash generations. *Scientia Agricola*, 61. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000200016>
- INAMHI. (2012). Boletín del Clima Anual. Recuperado 15 de enero de 2016, a partir de <http://186.42.174.231/index.php/clima/boletines/anual>
- Jacobs, J. H., Clark, S. J., Denholm, I., Goulson, D., Stoate, C., & Osborne, J. L. (2010). Pollinator effectiveness and fruit set in common ivy, *Hedera helix* (Araliaceae). *Arthropod-Plant Interactions*, 4(1), 19-28. <http://doi.org/10.1007/s11829-009-9080-9>
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. (Missouri Botanical Garden Press, Ed.). Michigan: Missouri Botanical Garden.
- Kärkkäinen, K., Savolainen, O., & Koski, V. (1999). Why do plants abort so many developing seeds: Bad offspring or bad maternal genotypes? *Evolutionary Ecology*, 13(3), 305-317. <http://doi.org/10.1023/A:1006746900736>
- Karron, J. D., Ivey, C. T., Mitchell, R. J., Whitehead, M. R., Peakall, R., & Case, A. L. (2012). New perspectives on the evolution of plant mating systems. *Annals of Botany*, 109(3), 493-503. <http://doi.org/10.1093/aob/mcr319>

- King, C., Ballantyne, G., & Willmer, P. G. (2013). Why flower visitation is a poor proxy for pollination: Measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(9), 811-818. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.12074>
- Knut, F., & Van der Pijil, L. (1979). *Principles of Pollination Ecology* (3rd ed.). Pergamon Press Ltd.
- Kudo, G., Ida, T. Y., & Tani, T. (2008). Linkages between phenology, pollination, photosynthesis, and reproduction in deciduous forest understory plants. *Ecology*, 89(2), 321-331. <http://doi.org/10.1890/06-2131.1>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Bojesen, R. (2016). Tests in Linear Mixed Effects Models. R Project/ CRAN.
- Lacey, E. P., Smith, S., & Case, A. L. (1997). Parental effects on seed mass: seed coat but not embryo/endosperm effects. *American journal of botany*, 84(11), 1617-1620. <http://doi.org/10.2307/2446624>
- Lambers, H., Clode, P., Hawkins, H.-J., Laliberté, E., Oliveira, R., Reddell, P., ... Weston, P. H. (2015). Metabolic Adaptations of the Non-Mycotrophic Proteaceae to Soils with Low Phosphorus Availability. En W. Plaxton & H. Lambers (Eds.), *Annual Plant Reviews* (1st ed., Vol. 48, pp. 289-323). John Wiley & Sons, Ltd.
- Lambers, H., Finnegan, P., Laliberté, E., Pearse, S., Ryan, M., Shane, M., & Veneklass, E. (2011). Phosphorus Nutrition of Proteaceae in Severly Phosphorus-Impoverished Soils: Are There Lessons To Be Learned for Future Crops? *Plant Physiology*, 156(3), 1058-1066. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.174318>.
- Lambers, H., Finnegan, P., Plaxton, W., Jost, R., Shane, M., & Sttit, M. (2015). Phosphorus nutrition in Proteaceae and beyond. *Nature Plants*, 1.

- Landázuri-Paredes, B., & Mogrovejo-Barrera, G. (2016). *Contribución de vectores diurnos y nocturnos a la polinización de Oreocallis grandiflora*. Universidad del Azuay.
- Landázuri-Paredes, O., Cárdenas, S., & Tinoco, B. (2015). *Ecología de polinización de Oreocallis grandiflora*. Universidad del Azuay.
- Lázaro, A., Lundgren, R., & Totland, Ø. (2015). Pollen limitation, species' floral traits and pollinator visitation: Different relationships in contrasting communities. *Oikos*, 124(2), 174-186. <http://doi.org/10.1111/oik.01525>.
- Li, N., & Li, Y. (2015). Maternal control of seed size in plants. *Journal of Experimental Botany*. <http://doi.org/10.1093/jxb/eru549>.
- Li, Z., Lu, W., Yang, L., Kong, X., & Deng, X. (2015). Seed weight and germination behavior of the submerged plant *Potamogeton pectinatus* in the arid zone northwest China. *Ecology and Evolution*, 5(7), 1504-1512. <http://doi.org/10.1002/ece3.1451>
- Lunau, K. (2004). Adaptive radiation and coevolution - Pollination biology case studies. *Organisms Diversity and Evolution*, 4(3), 207-224. <http://doi.org/10.1016/j.ode.2004.02.002>
- MAE. (2013). *Modelo Bioclimático para la Representación Cartográfica de Ecosistemas del Ecuador Continental*. Sistema de Nacional de Información. (SNI). Quito, Ecuador.
- Manasse, R. S., & Stanton, M. L. (1991). The influence of the mating system on seed size variation in *Crinum erubescens* (Amaryllidaceae). *Evolution*, 45(4), 883-890. <http://doi.org/10.2307/2409696>
- Manish, K. G., Pardeep, K., & Jugal, K. (2010). Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *International Journal of Ayurveda Research*, 4, 274-278. <http://doi.org/10.4103/0974-7788.76794>

- McNair, J. N., Sunkara, A., & Frobish, D. (2012). How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric and semi-parametric methods. *Seed Science Research*, 22(2), 77-95. <http://doi.org/10.1017/S0960258511000547>
- McWilliams, E., Landers, R., & Mahlstede, J. (1968). Variation in Seed Weight and Germination in Populations of *Amaranthus retroflexus* L. *Ecology*, 49, 290-296. <http://doi.org/10.2307/1934458>
- Melser, C., & Klinkhamer, P. G. L. (2001). Selective seed abortion increases offspring survival in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *American Journal of Botany*, 88(6), 1033-1040. <http://doi.org/10.2307/2657085>
- Mena Vásconez, P., & Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos. En M. M., O. B., K. P., B. F., & H. Balslev (Eds.), *Botánica económica de los Andes Centrales* (pp. 91-109). LA Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Mendizábal-Hernández, L., Alba-Landa, J., & Cabrera Callejas, M. I. (2006). Variación de Semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. con respecto a su posición en el fruto. *Foresta Veracruzana*, 8(1), 13-16.
- Morales, C. L., Traveset, A., & Harder, L. D. (2013). Sterile flowers increase pollinator attraction and promote female success in the Mediterranean herb *Leopoldia comosa*. *Annals of Botany*, 111(1), 103-111. <http://doi.org/10.1093/aob/mcs243>
- Municipalidad de Nabón, & Universidad de Cuenca. (2010). *Diagnóstico Integral del Cantón Nabón de la Provincia del Azuay, Ecuador*. Nabón.
- Muñoz, B. C., Sánchez, J. a, Montejo, L., & Herrera-Peraza, R. a. (2001). Características morfológicas y fisiológicas de semillas de *Prunus occidentalis*: comparación entre

especies de diferentes estrategias sucesionales. *Ecotropicos*, 14(1), 1-10.

Muriel, P. (2008). La Diversidad de Ecosistemas en el Ecuador. En L. de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, M. Macía, & H. Balslev (Eds.), *Enciclopedia De Plantas Útiles Del Ecuador* (pp. 28-38).

Nanzyo, M. (2002). Unique properties of volcanic ash soils. *Global Environmental Research*, 6, 99-112.

Neiland, M. R. M., & Wilcock, C. C. (1998). Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, 85(12), 1657-1671. <http://doi.org/10.2307/2446499>

Nieto, A., & Silva, C. (2012). *Influencia de la Alteración de Hábitat en el Uso de Recursos Florísticos por el Ensamble de Colibríes en Bosques Altoandinos del Sur del Ecuador*. Universidad del Azuay.

Olesen, J. M., & Valido, A. (2003). Lizards as pollinators and seed dispersers: An island phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution*. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00004-1](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00004-1)

Ollerton, J., Alarcon, R., Waser, N. M., Price, M. V., Watts, S., Cranmer, L., ... Rotenberry, J. (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103(9), 1471-1480. <http://doi.org/10.1093/aob/mcp031>

Ortega-Olivencia, A., Rodríguez-Riaño, T., Pérez-Bote, J. L., López, J., Mayo, C., Valtueña, F. J., & Navarro-Pérez, M. (2012). Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered Scrophularia of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany*, 109(1), 153-167. <http://doi.org/10.1093/aob/mcr255>

Pannell, J. (2001). Evolution and Ecology of Plant Mating Systems. En J. W. & Sons

(Ed.), *eLS*. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021909>

- Peng, D. L., Ou, X. K., Xu, B., Zhang, Z. Q., Niu, Y., Li, Z. M., & Sun, H. (2014). Plant sexual systems correlated with morphological traits: Reflecting reproductive strategies of alpine plants. *Journal of Systematics and Evolution*, 52(3), 368-377. <http://doi.org/10.1111/jse.12046>
- Pérez, H. E., & Kettner, K. (2013). Characterizing *Ipomopsis rubra* (Polemoniaceae) germination under various thermal scenarios with non-parametric and semi-parametric statistical methods. *Planta*, 238(4), 771-784. <http://doi.org/10.1007/s00425-013-1935-8>
- Pintado, K. (2016). *Influencia del microclima y labrado el suelo en la siembra directa de Oreocallis grandiflora en dos ecosistemas degradados del Sur del Ecuador*. Universidad del Azuay.
- Pretell, J., Ocaña, D., Jon, R., & Barahona, E. (1985). *Apuntes sobre algunas Especies Forestales Nativas de la Sierra Peruana*. Lima, Perú.
- Rafferty, N. E., & Ives, A. R. (2012). Pollinator effectiveness varies with experimental shifts in flowering time. *Ecology*, 93(4), 803-814. <http://doi.org/10.1890/11-0967.1>
- Ramos-Font, M., González Rebollar, J., & Robles Cruz, A. (2015). Dispersión endozoócora de leguminosas silvestres: desde la recuperación hasta el establecimiento en campo. *ecosistemas*, 24(3), 14-21. <http://doi.org/10.7818/ECOS.2015.24-3.03>
- Reynel, C., & Marcelo, J. (2009). *Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies*. (Investigación y Sistematización No. 9). Lima, Perú.
- Rianti, P., Suryobroto, B., & Atmowidi, T. (2010). Diversity and Effectiveness of Insect

- Pollinators of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Hayati: Journal of Biosciences*, 17(1), 38-42.
- Roach, D., & Wulff, R. (1987). Maternal Effects in Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18, 209-235.
<http://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001233>
- Sahli, H., & Conner, J. (2006). Visitation, effectiveness and efficiency of 15 genera of visitors to wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 94(2), 203-209. <http://doi.org/10.3732/ajb.94.2.203>
- Sánchez, D. (1991). Formación y Desarrollo de la Semilla. En R. Castillo T., J. Estrella E., & C. Tapia B. (Eds.), *Técnicas para el manejo y uso de los recursos fitogenéticos* (1 ed., pp. 88-96). Quito, Ecuador: Departamento de Recursos Genéticos-INIAP.
- Schmid, B., Nottebrock, H., Esler, K. J., Pagel, J., Pauw, A., Böhning-Gaese, K., ... Schleuning, M. (2015). Reward quality predicts effects of bird-pollinators on the reproduction of African *Protea* shrubs. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17(3), 209-217. <http://doi.org/10.1016/j.ppees.2015.02.007>
- Schmidt, L. (2000). Seed Testing. En Danida Forest Seed Centre (Ed.), *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Humlebaek, Denmark.
- Sedgwick, P., & Joekes, K. (2013). Kaplan-Meier survival curves: interpretation and communication of risk. *BMJ (British Medical Journal)*, 347, 7118.
<http://doi.org/doi: http://dx.doi.org/10.1136/bmj.f7118>
- Serrano, F. (1996). *Árboles y Arbustos del Bosque de Mazán* (Tomo I). Cuenca, Ecuador: ETAPA EP.

- Sosa-Luría, D., Chávez-Servia, J., Mondragón-Chaparro, D., Estrada-Gómez, J., & Ramírez-Vallejo, P. (2012). Viabilidad y Germinación de Semillas de Seis Especies de Tillandsia (Bromeliaceae) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia mexicana*, 35, 37-42.
- Steenhuisen, S. L. (2012). *Mating systems, insect pollination and chemical ecology of grassland Protea species (Proteaceae)*. KwaZulu-Natal.
- Steenhuisen, S. L., & Johnson, S. D. (2012). Evidence for autonomous selfing in grassland Protea species (Proteaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(3), 433-446. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01243.x>
- Steenhuisen, S. L., van der Bank, H., & Johnson, S. D. (2012). The relative contributions of insect and bird pollinators to outcrossing in an African protea (Proteaceae). *American Journal of Botany*, 99(6), 1104-1111. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100535>
- Stephenson, A. G., & Winsor, J. a. (1986). Lotus corniculatus Regulates Offspring Quality Through Selective Fruit Abortion. *Evolution*, 40(3), 453-458. <http://doi.org/10.2307/2408568>
- Thien, L. B., Azuma, H., & Kawano, S. (2000). New perspectives on the pollination biology of basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 161(6), S225-S235. <http://doi.org/doi:10.1086/317575>
- Thompson, J. N. (1994). The Geographic Mosaic Theory of Coevolution. En J. N. Thompson (Ed.), *The Coevolutionary Process* (1ra ed., Vol. 1, p. 383). Chicago, Illinois: The University of Chicago Press.
- Traveset, A., & Sáez, E. (1997). Pollination of Euphorbia dendroides by lizards and insects: Spatio-temporal variation in patterns of flower visitation. *Oecologia*, 111(2), 241-248. <http://doi.org/10.1007/s004420050231>

- Turner, S., Cook, A., Baskin, J., Baskin, C., Tuckett, R., Steadman, K., & Dixon, K. (2009). Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: a first report for Sapindaceae. *Annals of Botany*, *104*(5), 833-844. <http://doi.org/10.1093/aob/mcp171>
- Turner, S., Merritt, D., Baskin, J., Baskin, C., & Dixon, K. (2006). Combinational dormancy in seeds of the Western Australian endemic species *Diplopeltis huegelii* (Sapindaceae). *Australian Journal of Botany*, *54*, 565-570. <http://doi.org/DOI:10.1071/BT05156>
- Ulloa, C., & Jorgensen, P. (1995). *Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador*. (Adyala & Institute of Biological Science, Eds.) (2da ed.). Quito, Ecuador.
- Vamosi, S. M., Mazer, S. J., & Cornejo, F. (2008). Breeding systems and seed size in a neotropical flora: Testing evolutionary hypotheses. *Ecology*, *89*(9), 2461-2472. <http://doi.org/10.1890/07-0674.1>
- Vaughton, G., & Ramsey, M. (1997). Seed mass variation in the shrub *Banksia spinulosa* (Proteaceae): Resource constraints and pollen source effects. *International Journal of Plant Sciences*, *158*(4), 424-431. <http://doi.org/10.1086/297452>
- Waser, N. M., Chittka, L., Price, M. V., Williams, N. M., & Ollerton, J. (1996). Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, *77*(4), 1043-1060. <http://doi.org/10.2307/2265575>
- Wester, P. (2015). The Forgotten Pollinators – First Field Evidence For Nectar-feeding By Primarily Insectivorous Elephant-Shrews. *Journal of Pollination Ecology*, *16*, 108-111.

- Weston, P. H. (2007). Proteaceae. En *The Families and Genera of Vascular Plants* (vol 9, pp. 364-404). Berlin: Klaus Kubitzki. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-32219-1>
- Weston, P. H., & Barker, N. P. (2006). A new suprageneric classification of the Proteaceae, with an annotated checklist of genera. *Telopea*, *11*(3), 314-344.
- Whelan, R. J., & Burbidge, A. H. (1980). Flowering phenology, seed set and bird pollination of five Western Australian Banksia species. *Australian Journal of Ecology*, *5*(1), 1-7. <http://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1980.tb01225.x>
- Willmer, P. G. (2011). Reward and Costs: The Environmental Economics of Pollination. En *Pollination and Floral Ecology* (pp. 234-260). Woodstock: Princeton University Press.
- Zhang, J. (1998). Variation and Allometry of Seed Weight in *Aeschynomene americana*. *Annals of Botany*, *82*(6), 843-847. <http://doi.org/doi:10.1006/anbo.1998.0774>
- Zhang, S., Hu, H., Zhou, Z., Xu, K., Yan, N., & Li, S. (2005). Photosynthesis in relation to reproductive success of *Cypripedium flavum*. *Annals of Botany*, *96*(1), 43-49. <http://doi.org/10.1093/aob/mci146>
- Zoeller, K. D., Steenhuisen, S. L., Johnson, S. D., & Midgley, J. (2016). New evidence for mammal pollination of Protea species (Proteaceae) based on remote-camera analysis. *Australian Journal of Botany*, *64*, 1-7. <http://doi.org/10.1071/BT15111>

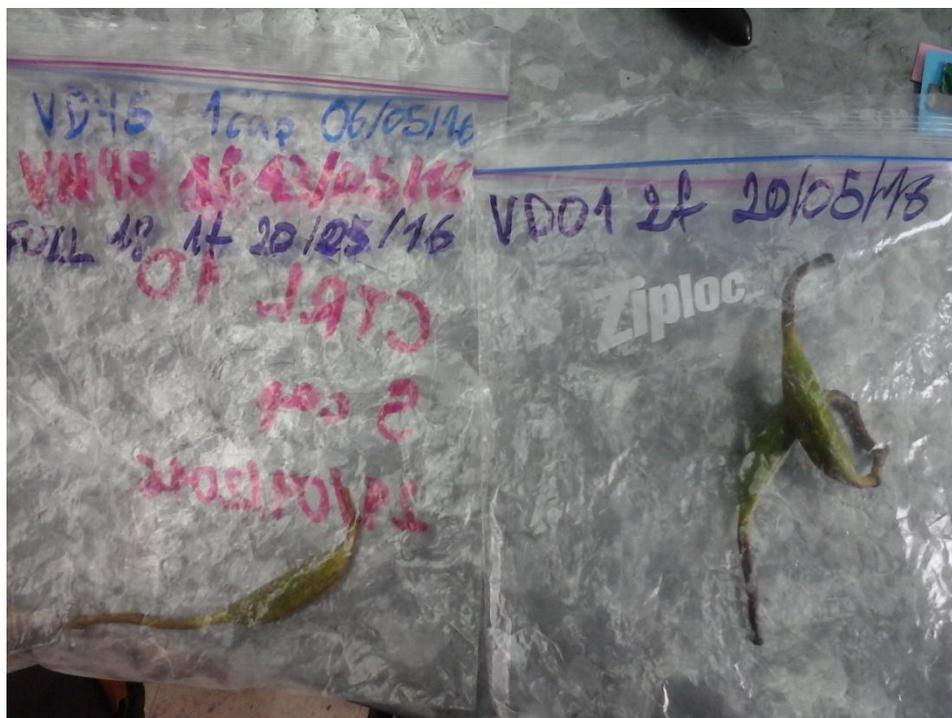
ANEXOS

N	Duplete_ID	Tratamiento	Planta_Tratamiento	28/12/15	04/01/16	11/01/16	17/01/16	27/01/16	02/02/16	11/02/16	18/02/16	03/03/16	11/03/16	17/03/16	24/03/16	30/03/16	06/04/16	29/04/16	06/05/16	13/05/16	20/05/16	27/05/16	03/06/16	10/06/16	17/06/16	23/06/16	01/07/16	08/07/16	14/07/16	21/07/16	28/07/16	
1	D001	VD	VD01	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2	D001	VN	VN01	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
5	D002	VD	VD03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	D002	VN	VN03	6	6	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2	1	fin	fin
8	D002	CTRL	CTRL04	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	D003	VD	VD05	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	fin	fin						
10	D003	VN	VN05	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	1	fin	fin								
12	D003	CTRL	CTRL06	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	1
16	D004	CTRL	CTRL08	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	2	fin	fin	fin	fin
18	D005	VN	VN09	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	fin	fin								
19	D005	FULL	FULL10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	D005	CTRL	CTRL10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	4	2	1	fin	fin									
22	D006	VN	VN11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
24	D006	CTRL	CTRL12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	2	fin	fin								
27	D007	FULL	FULL14	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	3	2	1	1	fin	fin	fin	
28	D007	CTRL	CTRL14	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	8	8	7	5	2	fin	fin	fin	fin	fin	fin
34	D009	VN	VN17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	D009	FULL	FULL18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	1	fin	fin									
36	D009	CTRL	CTRL18	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	2	1	fin	fin										
39	D010	FULL	FULL20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	D010	CTRL	CTRL20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Anexo 1. Código bi-modal asignado a los tratamientos respecto al árbol en donde estaban instalados.



Anexo 2. Inicio del estado de dehiscencia frutal. A este punto, los frutos que presentaban el corte en la sutura, eran retirados de la planta y llevados al laboratorio para su proceso y así evitar la pérdida de semillas.



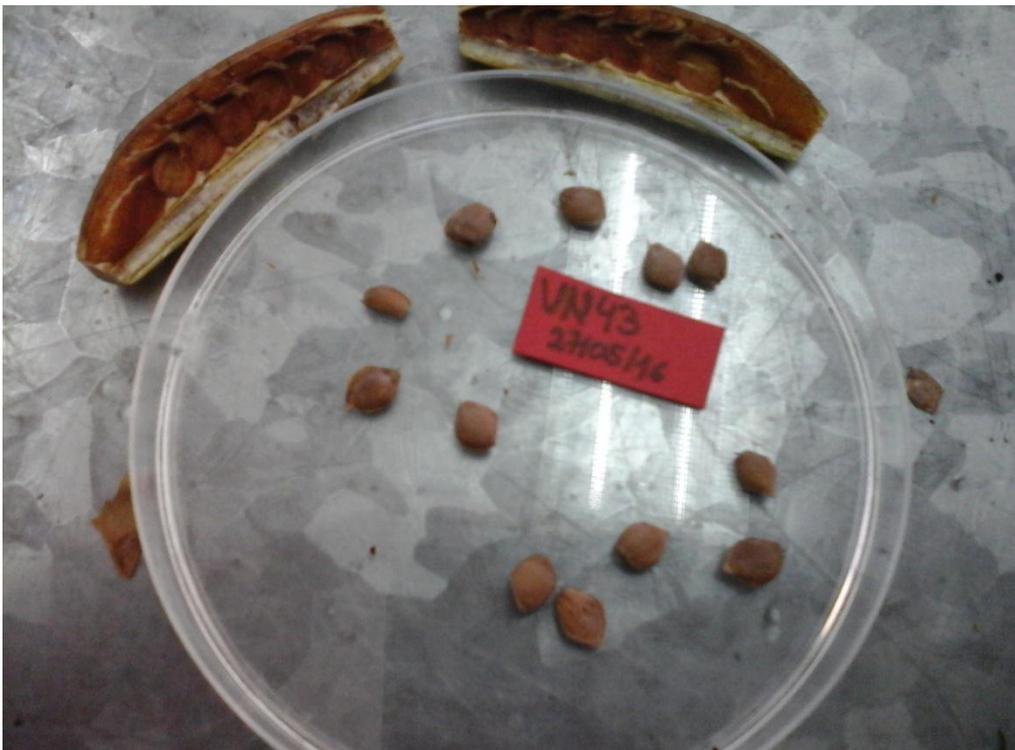
Anexo 3. Fundas plásticas con cierre hermético usadas para el transporte de los frutos del campo al laboratorio. Las fundas plásticas fueron reutilizadas para todas las salidas. Los etiquetados fueron secuenciales y ordenados para facilitar el trabajo en laboratorio.



Anexo 4. Frutos devorados por larva lepidóptera (*Lepidoptera spp 1*). Casos como estos fueron reportados durante los primeros estados de maduración de los frutos.



Anexo 5. Frutos de *O. grandiflora* secuestrados presuntamente por especímenes del Orden Rodentia. Los secuestros se dieron solo en un sector del terreno de experimentación las semanas del 03 al 17 de junio. Los frutos secuestrados presentaban características que indicaban la cercanía de la dehiscencia (observaciones personales).



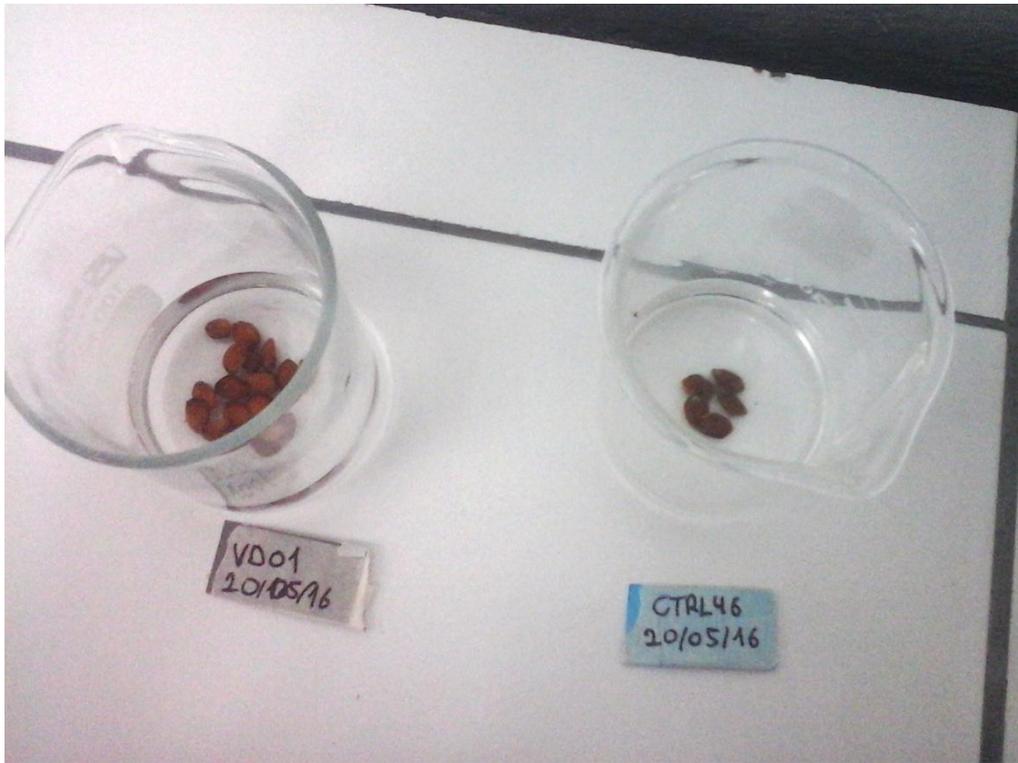
Anexo 6. Semillas pertenecientes a la misma identidad que eran unidas en una sola caja Petri una vez que era contado el número de semillas por folículo.



Anexo 7. Medición de largo y ancho de semillas. Calibrador manual usado para este fin.



Anexo 8. Balanza utilizada para pesar las semillas de *O. grandiflora*. Los datos obtenidos tuvieron una precisión de 3 decimales.



Anexo 9. Semillas en inmersión durante pruebas de imbibición con su respectiva etiqueta de estatus.

Lote	Fecha Prueba	Tratamiento	Rep.	Hora Prueba	Peso Seco	1	2	3	4	5
20/05/16	24/05/16	N21	3	8:12	0,016	0,026	0,018	0,016	0,019	0,028
			1		0,012	0,011	0,015	0,011	0,016	0,024
			2		0,008	0,013	0,014	0,016	0,015	0,01
			3		0,011	0,010	0,010	0,013	0,011	0,0
			4		0,010	0,014	0,010	0,010	0,014	0,0
20/05/16	25/05/16	N29	1	8:32	0,019	0,042	0,025	0,026	0,025	0,0
			2		0,021	0,009	0,024	0,023	0,019	0,0
			3		0,020	0,027	0,028	0,020	0,022	0,0
			4		0,020	0,022	0,025	0,010	0,035	0,0
			5		0,012	0,025	0,015	0,022	0,027	0,0
			6		0,023	0,025	0,020	0,019	0,027	0,0
			7		0,016	0,024	0,022	0,028	0,023	0,0
			8		0,019	0,021	0,022	0,025	0,04	0,0

Anexo 10. Hoja de registro donde constan semillas de distinto estatus sometidas a pruebas de imbibición en distinto día.



Anexo 13. Caja Petri con germinantes del mismo estatus. Todos los germinantes de un mismo estatus permanecían en la misma caja hasta el momento de su siembra.

Registro diario no-cumulativo de germinación - Laboratorio

Cod	Siemb	Rep	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	d23	d24	d25	d26	d27	d28			
Rep. VD51	07/06/16	1	0	0	0	0	3	0	1	1	4	0	0	0																			
Rep. VD52	07/06/16	2	0	0	0	0	7	0	3	1	0	2	0	1	0																		
Rep. VD39	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	2	0	3	1	0	0																			
Rep. VD35	07/06/16	1	0	0	0	0	0	1	0	2	1	2	0	0																			
Rep. VD35	07/06/16	2	0	0	0	0	0	0	2	2	3	1	0	0																			
Rep. CTRL4	07/06/16	1	0	0	0	0	0	1	2	3	1	0	0	0																			
Rep. CTRL5	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	1	2	5	0	0	0																			
Rep. VD04	07/06/16	1	0	0	0	0	3	2	2	2	1	0	0	0																			
Rep. VD32	07/06/16	2	0	0	0	0	4	4	1	1	2	3	1	3																			
Rep. VD32	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	1	3																			
Rep. VD23	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1																			
Rep. VD23	07/06/16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	1	2																		
Rep. VD23	07/06/16	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2																			
Rep. VD23	07/06/16	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2																			
Rep. VD23	07/06/16	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0	2																		
Rep. VD23	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	1	2	1																		
Rep. CTRL4	07/06/16	2	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	0																			
Rep. CTRL4	07/06/16	3	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	1	1																			
Rep. CTRL4	07/06/16	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	4	0	2																		
Rep. CTRL4	07/06/16	1	0	0	0	0	0	0	1	4	3	2	0	0																			
Rep. CTRL4	07/06/16	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	0	0																			
Rep. VD23	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Rep. VD25	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Rep. VD51	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Rep. VD51	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Rep. VD05	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Rep. VD23	14/06/16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			

Anexo 14. Hoja de registro de germinación. Cada repetición (rep) es una caja Petri de un mismo estatus. Los registros terminaron en el día 25.

101	EX051	D026	VD	VD51	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	4	2	fin											
102	EX051	D026	VN	VN51	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	1	fin								
103	EX052	D026	FULL	FULL52	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	fin	fin
104	EX052	D026	CTRL	CTRL52	9	9	9	9	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	fin	
105	EX053	D027	VD	VD53	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	fin	fin		
106	EX053	D027	VN	VN53	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	1	1	1	fin								
107	EX054	D027	FULL	FULL54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
108	EX054	D027	CTRL	CTRL54	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1	1	fin							

Anexo 15. Tabla de registro de campo de los frutos que permanecían en los árboles hasta su completa extracción. Los ceros (0) representa la inexistencia de frutos en los árboles y (fin) la finalización de la recolección del total de frutos en los árboles, es decir los llevados al laboratorio.