

**ALMACENAMIENTO Y GERMINACION DE SEMILLAS DE *Espeletia*
*grandiflora***

Autor:

Brayan Enrique Bohórquez García

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Programa de Biología

Bogotá -2020

**ALMACENAMIENTO Y GERMINACION DE SEMILLAS DE *Espeletia*
*grandiflora***

Autor:

Brayan Enrique Bohórquez García

Director:

M.Sc. Juan Pablo Hernández Sánchez

Coordinador Laboratorio de Investigación de Biología

Universidad El Bosque

Facultad de Biología

Bogotá -2020

Página de aprobación

JUAN PABLO HERNÁNDEZ SÁNCHEZ
DIRECTOR

JURADO

JURADO

JURADO

Dedicatoria y Agradecimientos

Este proceso de culminación de mi pregrado se lo agradezco y dedico en primer lugar a mis padres, por ser las personas que me han brindado todo y cada cosa por pequeña que sea, que me hizo estar en este paso de mi vida profesional, por su esfuerzo y dedicación, siempre buscando lo mejor día tras día, que a pesar de que no se los diga, me han enseñado a valorar la vida, cada momento, cada oportunidad, a atesorar a las buenas personas y cuidar de sus sentimientos, a entender que una sociedad integra empieza desde la familia.

A Daniela Ramirez Torres una persona muy especial, la cual me ha apoyado incondicionalmente, ha recorrido una gran parte de mi vida académica y personal, a la cual algún día le diré colega. Gracias

A mi director, Juan Pablo Hernández quiero agradecerle por su apoyo, por la paciencia que lo caracteriza y el empeño que coloca a todo INBIBO, por sus enseñanzas y orientación en esta trayectoria y a la Universidad El Bosque por permitirme realizar mi trabajo de grado en sus instalaciones.

A Sofia Camacho, Angela Romero y Camilo Braga, por su amistad, las horas de trabajo que compartimos en el laboratorio, y su ayuda en este proceso.

A Eimy Suaza por su colaboración en campo y en el laboratorio, a las amistades que se dieron en este proyecto y a todos mis compañeros de INBIBO que fueron participe en mi formación.

Y finalmente y no menos importante a los amigos que me acompañaron en todo mi paso por la universidad, que sin lugar a duda por alguna casualidad lean este trabajo sabrán que este pequeño espacio va dedicado a ellos.

Nota de salvedad

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por el Investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Tabla de contenido

1. Introducción	16
2. Marco de referencia	19
2.1. Antecedentes	19
2.2. Marco Teórico	22
2.2.1. Parque Natural Regional Siscunsi Ocetá.	22
2.2.2. Ecosistema de páramo.....	23
2.2.3. <i>Espeletia grandiflora</i>	25
2.2.4. Semillas.	26
2.2.5. Germinación de las semillas.....	27
2.2.6. Dormancia y tratamientos pre germinativos.....	28
2.2.7. Almacenamiento y conservación de semillas.	29
2.2.8. Rizosfera y organismos asociados.....	30
2.2.9. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	31
3. Pregunta de investigación	32
3.1 Hipótesis.....	32
4. Justificación	33

5. Objetivos.....	34
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos Específicos.....	34
6. Métodos	35
6.1. Fase de campo	35
6.2. Fase de laboratorio	37
6.2.1. Almacenamiento de las semillas.....	37
6.2.2. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera de <i>E. grandiflora</i>	38
6.2.3. Caracterización Bacteriana.	39
6.2.3.1. Preparación de los inóculos bacterianos.....	39
6.2.3.2. Características macroscópicas.....	40
6.2.3.5. Características microscópicas.....	40
6.2.3.6. Conservación de inóculos bacterianos	41
6.2.4. Extracción de ADN y Caracterización molecular	42
6.2.4.1. Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).	43
6.2.5 Prueba de viabilidad por flotabilidad.....	44
6.2.6. Prueba de viabilidad por tetrazolio	44

6.2.7. Tratamiento de las semillas: germinación e inoculación de las semillas.	45
6.2.7.1 Primera Germinación: No inoculados	45
6.2.7.2 Segunda Germinación: Inoculados	46
6.2.8. Análisis de los datos de germinación de las semillas de <i>E.</i>	50
7. Resultados y discusión.....	53
7.1 Aislamientos de bacterias de la rizosfera de <i>E. grandiflora</i>	53
7.1.2 Extracción de ADN de los morfotipos aislados	56
7.2 Confirmación de grupo funcional por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	57
7.3 Observación de las características de las semillas.....	58
7.4. Evaluación de los tratamientos de germinación de las semillas de <i>E. grandiflora</i>	60
7.4.1. Primera Germinación: No inoculado	60
7.4.2. Primera Germinación: Prueba de flotabilidad	61
7.4.3. Segunda Germinación: Prueba de flotabilidad	61
7.4.4. Segunda Germinación: inoculados	63
7.4.4.1. Tratamiento Capitulo (C)	63
7.4.4.2. Tratamiento Capitulo Escarificado (C.E)	64
7.4.4.3. Tratamiento Sobre (S)	65

7.4.4.4. Tratamiento Sobre Escarificado (S.E).....	66
7.5 Prueba de viabilidad de Tetrazolio (TZ)	70
7.5.1 Prueba de viabilidad de Tetrazolio de las semillas no germinadas	73
7.5.2 Prueba de viabilidad de Tetrazolio comparado con el porcentaje de germinación	74
8. Conclusiones.....	75
9 recomendaciones	76
10 Bibliografía	77
11 Anexos	85

Figura 1 Ubicación y zonificación del parque Natural Regional Siscuncí – Ocetá (Corpoboyacá & Neotropical, 2010).....	23
Figura 2 Lugar de tomas de muestras en el PNR Siscuncí Ocetá	35
Figura 3 A) Colecta de capítulos florales, B) almacenamiento del material vegetal, C) almacenamiento de muestras de suelo.	36
Figura 4 Extracción de las semillas de los capítulos de E. grandiflora para su posterior almacenamiento	38
Figura 5 Preenriquecimiento del suelo en botellas ámbar.	39
Figura 6 A) Inóculos en medio BTB B).Viales de criogenia A. brasilense y sus medios de cultivo	40
Figura 7 Inóculos preparados en viales para almacenamiento en criogenia	42

Figura 8 Muestras de la primera fase de germinación de las semillas de <i>E. grandiflora</i> . .	48
Figura 9 Segunda fase de germinación de las semillas de <i>E. grandiflora</i>	49
Figura 10 Error estándar para la prueba T de Student entre los germinados de luz y oscuridad con semillas escarificadas	50
Figura 11 Comparación entre los tratamientos control. ANOVA.....	51
Figura 12 Test Tukey Subconjuntos entre tratamientos bacterianos (1) y control (2).....	52
Figura 13 Morfotipo1 (M1) A) Vista microscopio 1000 aumentos, bacilos gran negativos B) Colonia a simple vista en agar BTB.	54
Figura 14 Morfotipo 2 (M2) A) Vista microscopio 1000 aumentos, bacilos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB.	54
Figura 15 Morfotipo 3 (M3) A) Vista microscopio 1000 aumentos, cocos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB.	55
Figura 16 <i>Azospirillum brasilense</i> (Bacteria control) A) Vista microscopio 1000 aumentos, cocos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB.....	55
Figura 17 Visualización del gel de agarosa con cuatro carriles de resultados positivos...	56
Figura 18 Visualización del gel de agarosa de PCR de 16 carriles, los cuales se usaron 8 carriles, 3 para control positivo, 2 para control negativo y 3 para los morfotipos aislados de la rizosfera de <i>E. grandiflora</i>	57
Figura 19 Clasificación de las semillas A) forma de las semillas B) coloración de las semillas	58
Figura 20 A) Presencia de depredación de las semillas de las semillas 1) semilla con tamaño inusual 2) Semilla de tamaño normal B) extracción de las larvas. C) larvas encontradas en los capítulos y dentro de las semillas)D y E).....	59

Figura 21 Numero de semillas germinadas en el primer tiempo de germinación comparación del conteo parcial y el conteo acumulado entre luz y oscuridad , La letra P y p corresponde a conteos parciales y la letra A y a corresponden a conteos acumulados, las líneas mas oscuras son de semillas sin luz y las líneas claras en semillas con presencia de luz 60

Figura 22 Numero de semillas germinadas Capitulo (C) que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado..... 61

Figura 23 Numero de semillas germinadas Capitulo (C) post almacenaje que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado 62

Figura 24 Numero de semillas germinadas Sobre (S) que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado..... 62

Figura 25 conteo parcial de germinación por las condiciones de semillas Capitulo (C), M1 y AB..... 63

Figura 26 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones de semillas Capitulo (C), M1 y AB 64

Figura 27 Conteo parcial de germinación por las condiciones de semillas Capitulo escarificado (C.E), C. M1 y C. AB..... 64

Figura 28 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas de Capitulo escarificado (C.E), C.E M1 y C.E AB 65

Figura 29 Conteo parcial de germinación por las condiciones semillas Sobre (S), M1 y AB 65

Figura 30 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas Sobre (S), S. M1 y S. AB 66

Figura 31 Conteo parcial de germinación por las condiciones semillas Sobre escarificado (S.E), M1 y AB	66
Figura 32 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas Sobre escarificado (S.E), M1 y AB.....	67
Figura 33 Prueba de viabilidad por tetrazolio A) semillas después de sumergidas en tetrazolio B) semilla viable con un corte longitudinal, cotiledones separados C) semilla inviable con un corte transversal D) semilla inviable vista lateral.	70
Figura 34 Prueba TZ de los lotes a germinar. 1) corresponde a la prueba TZ 1 antes de la primera germinación de las semillas 2) Corresponde a la prueba TZ 2 antes de la segunda germinación.....	71
Figura 35 Prueba TZ a las semillas no germinadas, concluido el experimento de germinación 1) corresponde a la germinación recién colectadas las semillas 2) corresponde a la germinación pasado 1 año de su almacenamiento	73
Figura 36 Comparación entre el porcentaje de germinación y el porcentaje de viabilidad TZ 1) corresponde a semillas enteras decantadas 2) corresponde a semillas escarificadas decantadas 3) semillas que flotaron, T1 corresponde a prueba TZ en tiempo 1 , T2 a prueba TZ en tiempo 2 , G1 a la primera germinación y G2 a la segunda germinación.....	74

Índice de tablas

Tabla 1 Tratamientos planteados para la segunda germinación.....	48
--	----

Tabla 2 Caracterización de los morfotipos fijadores de nitrógeno aislados de la rizosfera de <i>E. grandiflora</i>	53
--	----

Índice de anexos

Anexo 1Formula de preparación del medio OAB para bacterias fijadoras de nitrógeno.	85
Anexo 2. Repiques bacterianos en medios OAB y BTB) previos a los inóculos finales..	86
Anexo 3Morfotipos fijados y teñidos con tinción de Gram.....	86
Anexo 4Extracción de ADN tratamiento térmico de extracción para bacterias	87
Anexo 5Botón de <i>Azospirillum brasilense</i> celular obtenido por centrifugado	87
Anexo 6Cámara de electroforesis con el gel y las muestras cargadas.	88
Anexo 7Fuente de alimentación básica PowerPac TM	88
Anexo 8 C1000 Touch TM Thermal Cyclers - BioRad	89
Anexo 9Protocolo NifH	89
Anexo 10Observación y selección de semillas de <i>E. grandiflora</i>	90
Anexo 11Lote de semillas <i>E. grandiflora</i>	90
Anexo 12Prueba de flotabilidad de semillas <i>E. grandiflora</i>	91
Anexo 13Semillas escarificadas de <i>E. grandiflora</i>	91
Anexo 14Gráfico de error prueba T student	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 15Anova entre los tratamientos control.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 16Anova entre todos los tratamientos	¡Error! Marcador no definido.

Resumen

Espeletia grandiflora fue de las primeras especies descritas en Colombia por el botánico Cuatrecasas es una especie insignia en nuestros paramos, el interés por llevar este estudio radica en la fragilidad de nuestros paramos y en el primer registro de afectaciones en frailejones que fue realizado durante el desarrollo del programa nacional integrado de adaptación al cambio climático INAP donde expusieron unas afectaciones inusuales en *Espeletia* provenientes de plagas de artrópodos y hongos. Razón por la cual es necesario realizar estudios previos para garantizar conservar la especie en y fuera de su habitat. Se evaluaron dos formas de almacenamiento de las semillas de *E. grandiflora* por un periodo de un año, para medir su capacidad germinativa y la viabilidad de las semillas post almacenaje, se sometieron las semillas a tratamientos pre germinativos y pruebas químicas de viabilidad, además de las semillas colectadas provenientes del Parque Natural Regional Siscunsi Ocetá se tomaron muestras de suelo de la rizosfera de *E. grandiflora* con el objetivo de aislar bacterias fijadoras de nitrógeno e inocular las semillas para comprobar el efecto sobre su germinación.

Palabras clave

PGBP, *E. grandiflora*, Viabilidad, Germinación, Semillas, Espeletia, Grandiflora, Paramo, Microbiología

Abstract

Espeletia grandiflora was one of the first species described in Colombia by the botanist Cuatrecasas, it is a flagship species in our paramos, the interest in carrying out this study lies in the fragility of our paramos and in the first record of affectations in frailejones that was carried out during development. of the integrated national program of adaptation to climate change INAP where they exposed unusual affectations in *Espeletia* from arthropod and fungal pests. This is why it is necessary to carry out previous studies to guarantee the conservation of the species in and outside its habitat. Two forms of storage of *E. grandiflora* seeds were evaluated for a period of one year, to measure their germination capacity and the viability of the seeds post-storage, the seeds were subjected to pre-germination treatments and chemical viability tests, in addition to In the seeds collected from the Siscunsi Ocetá Regional Natural Park, soil samples were taken from the rhizosphere of *E. grandiflora* in order to isolate nitrogen-fixing bacteria and inoculate the seeds to verify the effect on their germination.

Keywords

PGBP, *E. grandiflora*, Viability, Germination

1. Introducción

El ecosistema de páramo es una peculiaridad entre los ecosistemas de grandes altitudes, apreciados por su alta biodiversidad y endemismo, los cuales fueron el resultado de procesos geológicos y climáticos que otorgaron una afinidad clave con el agua, dando como resultado adaptaciones únicas y especiaciones que conformaron las comunidades de fauna y flora las cuales pueden tener niveles tan altos de exclusividad siendo únicos para cada páramo (falta cita). Es por ello que estos ecosistemas son reconocidos por los servicios ecosistémicos que brindan a la humanidad, entre los más importantes destacan la provisión de agua y el secuestro de carbono, que contribuye a controlar el fenómeno de efecto invernadero (Sarmiento Pinzón et al., 2013).

En Colombia el ecosistema de paramo se localiza en todo el sistema montañoso y también hace presencia en la Sierra Nevada de Santa Marta con un increíble 49% de representatividad mundial (Rincón, 2015 “El departamento con mayor extensión es Boyacá, con un 16 % de los páramos del mundo” (Rincón, 2015, p.2). A pesar de ser áreas estratégicas para la conservación y garantía de bienes y servicios ecosistémicos han sido zonas muy afectadas por diferentes actividades antrópicas principalmente de tipo productivo, que amenazan la biodiversidad de flora y fauna (Rojas, Ramírez y Osher, 2018).

El Parque Natural Regional PNR Siscunsi – Ocetá está localizado al oriente del departamento de Boyacá, entre el Lago de Tota y el Parque Nacional Natural Pisba, es reconocido por tener uno de los páramos más atractivos del territorio nacional (CORPOBOYACÁ, 2010). Según el Plan de Manejo del área protegida, el páramo de Ocetá

está representado por varias especies de *Espeletia*, reportando a *Espeletia grandiflora* como la especie más abundante del género, siendo así un elemento clave para la conservación y estudio.

E. grandiflora es una de las especies más abundantes y representativas del ecosistema de páramo, son plantas fundamentales para la regulación del recurso hídrico y de gran importancia biológica y cultural. Se caracterizan por ser especies de crecimiento lento, presentando un bajo porcentaje de germinación que suele estar determinado por las condiciones ambientales del páramo (alta radiación, fuertes vientos, bajas temperaturas, suelos ácidos, bajos niveles de oxígeno), estas restricciones climáticas sumado a las actividades humanas, amenazan a las poblaciones de frailejón en una de las etapas más cruciales de su ciclo de vida, la fase de germinación y reclutamiento (Gallego & Bonilla, 2016), repercutiendo en la dinámica poblacional de la especie.

Lo anterior genera una gran preocupación por encontrar alternativas de germinación, propagación y conservación ex situ que favorezcan el éxito y la supervivencia de *E. grandiflora*. Lo cual deberá comprender varias etapas, desde la forma de almacenamiento de las semillas hasta la utilización de los métodos más apropiados para su germinación, entre estos últimos, el uso de bacterias promotoras de crecimiento ha sido una alternativa eficiente para estimular el desarrollo de las plantas en los últimos años (Pedraza et al., 2010). En este sentido es necesario adelantar estudios que permitan obtener información de la ecología de las semillas a fin de establecer los requerimientos específicos para su germinación, por lo tanto, se propone evaluar el almacenamiento y germinación de semillas de *E. grandiflora* y el efecto de diferentes tratamientos en su germinación. De esta manera, la información recabada será fundamental para orientar proyectos de restauración y conservación de la flora de páramo con base en el

conocimiento de la ecología de las semillas de una de las especies más representativas de los ecosistemas de la alta montaña, el frailejón.

2. Marco de referencia

2.1. Antecedentes

La propagación de especies en condiciones ex -situ permite controlar diversas variables que en condiciones naturales suelen impedir o retrasar el éxito germinativo de una especie. Esta fase es crucial para garantizar el aporte de nuevos individuos a la población y la transición a nuevos estados (Gallego, 2014), es por ello que la intervención en etapas iniciales es imprescindible para aumentar las probabilidades de germinación y por ende asegurar un óptimo crecimiento. Teniendo en cuenta esto, se han desarrollado diferentes estudios en especies de frailejón a través de ensayos y pruebas germinativas que buscan determinar la efectividad de diferentes métodos de propagación, utilizando micropropagación invitro, sustratos de diferente composición, medios nutritivos, microorganismos promotores de crecimiento, entre otras.

Uno de los estudios en la propagación del frailejón es la investigación realizada por Tintinago (2019) en el páramo de Barbillas, Cauca, Colombia. Allí evaluaron diferentes sustratos tradicionales en la reproducción de *Espeletia harwegiana* bajo condiciones semicontroladas, teniendo en cuenta variables como germinación, desarrollo y sobrevivencia de las plántulas. En general, encontraron un porcentaje bajo de germinación (7.8%) siendo el sustrato suelo el que presento el mayor porcentaje (13,6%), con un máximo de germinación a los 39 días y una sobrevivencia de (92%). Además de presentar un mayor crecimiento, un mayor diámetro del tallo, longitud y ancho de la lámina foliar. Finalmente recomiendan este sustrato ya que proporciona las mejores condiciones para el desarrollo de plántulas de *E. hartwegiana*.

En otro estudio realizado por Bohórquez et al (2016) establecieron un protocolo para la micro propagación invitro de *Espeletia paipana* en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

con macroelementos a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que después de 30 días de cultivo 433 embriones germinaron (de 1.160), y de estos, solo 90 plántulas resultaron viables. Por otro lado, observaron que el medio MS/4 suplementado con ácido giberélico fue el que mejor estimuló la germinación (50%) y que el mayor porcentaje de embriones germinados se dio en condiciones de luz continua. Así mismo encontraron que la presencia de auxinas y el ácido indolbutírico (en altas concentraciones) estimula el desarrollo radicular y la proliferación de brotes. Este estudio refleja la importancia de desarrollar nuevas formas de propagación para especies en peligro de extinción, como es el caso de *E. paipana*, donde solo crece en una zona restringida de Boyacá.

Por otro lado, Gallego (2014) estableció la oferta de semillas y de germinación de *Espeletia uribei* y su relación con el reclutamiento y reconoce la importancia de los micrositios, espacios donde es posible la germinación de las semillas y el posterior establecimiento de las plántulas, como un factor fundamental para el reclutamiento del frailejón. Los resultados demuestran que la germinación se ve favorecida en presencia de luz y no en condiciones de oscuridad con porcentajes 19.4% y 12.1% respectivamente. Igualmente registra una alta oferta de semillas (15318 semillas por individuo) que se ve contrarrestada por la baja viabilidad de las mismas 30%.

En el caso de *Espeletia grandiflora* Moreno (2018) reporta una viabilidad del 80% además de evaluar la germinación de las semillas en condiciones controladas de laboratorio y cuantificar la oferta de semillas. Encontrando que *E. grandiflora* presenta una buena oferta de achenios y un bajo porcentaje de germinación (12% en 46 días).

Igualmente, Mendoza y Martínez (2011) consideraron factores importantes para la propagación del frailejón, que van desde la recolección de la semilla hasta la siembra en vivero. En su estudio, realizaron la siembra al voleo de semillas de frailejón en condiciones in situ, evidenciando que un periodo de 40 días inicia la germinación de las semillas. Así mismo registraron una supervivencia del 84% de las plántulas y un crecimiento de 8cm después de un año, en contraste a condiciones naturales en donde por lo general crecen de 1 a 2,5 cm al año. Este estudio se constituye como un referente para la germinación de especies emblemáticas de los ecosistemas de alta montaña.

Mancipe-Murillo (2020) estableció un protocolo de propagación de cuatro especies de frailejón en condiciones de invernadero. Para ello, evaluó el efecto de diferentes tratamientos pregerminativos (control, inmersión en ácido giberélico, estratificación fría y estratificación fría e inmersión en ácido giberélico) en la germinación de las semillas. En su ensayo tuvo en cuenta la morfología de las semillas, su germinación y supervivencia, encontrando que *Espeletia corymbosa* presentó la germinación más alta (48%) y *Espeletia killipi* la mayor viabilidad (88%), no obstante, hubo un alto porcentaje de semillas vacías. En general las especies presentaron un crecimiento lento, con una altura máxima de 0,88 cm y una alta supervivencia, entre el 6 y el 90% cuatro meses después de la germinación.

Los trabajos anteriormente mencionados, evidencian la baja capacidad de germinación y viabilidad de las semillas de *Espeletia* spp. Y que está limitado por los mecanismos de dispersión, condiciones de germinación y disponibilidad de micrositios óptimos para su germinación. Sin embargo, una vez germinadas, las plántulas tienen a tener buenas tasas de supervivencia, de modo que confluyen diferentes factores en la propagación, iniciando con la calidad de la semilla, las condiciones ambientales y las características del lugar donde se

establecerá. Esto demuestra la importancia de utilizar métodos de laboratorio para aumentar la capacidad de germinación de los frailejones y garantizar su conservación.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Parque Natural Regional Siscunsi Ocetá.

El PNR Siscunsi-Ocetá se encuentra ubicado en la zona oriental del departamento de Boyacá entre los 5°25'51" y 5°47' 39" de latitud Norte y 72°54' 33" y 72°35' 43" de longitud oeste en jurisdicción de cuatro municipios principalmente, por el norte limita con los municipios Mongua y Mongui, por el oriente con Mongua, por el sur con Aquitania y por el occidente con Sogamoso y Mongui (Figura 1). Tiene una extensión de 49.745 hectáreas, con una altura que va desde 3000 a 4000 msnm, la cual abarca ecosistemas típicos de alta montaña, bosque andino y páramo (Corpoboyacá & Neotropical, 2010).

Fue declarado en el 2008 mediante el acuerdo 27 por la corporación autónoma de Boyacá (CORPOBOYACÁ), la cual ejerce como autoridad ambiental dentro del área protegida. En el proceso de declaratoria se delimitaron tres áreas de acuerdo con el uso del suelo y las necesidades de conservación del páramo: zona de preservación, zona de restauración y zona de uso sostenible (Figura 1), en las cuales se especifican las áreas que pueden ser usadas para producción y aquellas de uso estricto para conservación. El PNR constituye un área de gran importancia para el abastecimiento de agua y la conservación de especies endémicas amenazadas de fauna y flora, dentro de las especies vegetales se encuentran algunas especies de frailejón como *Espeletia nemekeni*, *Espeletia incana*, por otro lado, el venado de cola blanca,

el oso de anteojos, el puma y el tigrillo son especies que también se encuentran en alguna categoría de amenaza (Corpoboyacá & Neotropical, 2010).

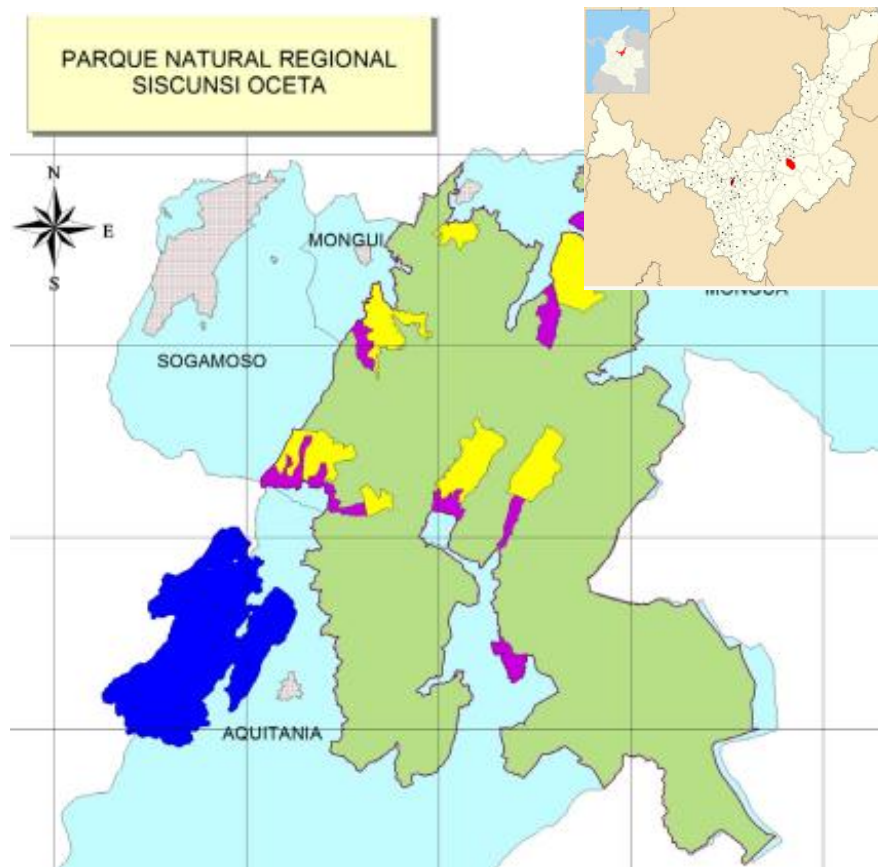


Figura 1 Ubicación y zonificación del parque Natural Regional Siscunsi – Ocetá (Corpoboyacá & Neotropical, 2010).

2.2.2. Ecosistema de páramo.

La zona que se ubica por encima del bosque alto andino caracterizada por una vegetación abierta de tipo arbustivo y herbácea es denominada región paramuna (Cleef, 2013). Esta puede encontrarse por encima de los 3000msnm hasta el límite con las nieves perpetuas a una altura de 4000m, en este rango altitudinal se encuentran tres franjas o zonas reconocidas

por el tipo de vegetación y su topografía presente. Según Rangel (2000) desde los 3200m hasta los 3600m se ubica el subpáramo o páramo bajo, caracterizado por una vegetación arbustiva con predominio de matorrales. Entre los 3600m y 4100 m se encuentra el páramo propiamente dicho, zona en la cual se presenta la máxima diversificación comunitaria, con predominio de rosetas y pastos, y finalmente se localiza el superpáramo por encima de los 4100m caracterizado por la disminución en la vegetación y el predominio del sustrato rocoso (Rangel, 2000).

En términos generales, los páramos se caracterizan por presentar bajas temperaturas en la noche (cercanas al punto de congelamiento) y altas en el día, bajos niveles de oxígeno, alta radiación solar, suelos ácidos y pobres en nutrientes, heladas, neblina y fuertes vientos (Cleef, 2013). Estas condiciones ambientales han determinado la fisonomía de las plantas como lo es su forma de crecimiento, generando hábitos en rosetas, macollas, bambusoides, cojines y arbustos siempreverdes (Cleef, 2013). De acuerdo con el tipo de cobertura las zonas herbazales representan un 45% de la vegetación paramuna, seguido por los bosques alto andinos (27%) y mosaicos de pastos y cultivos (13%), este último ha venido creciendo debido a las dinámicas antrópicas de intervención, uso y transformación, cambiando los procesos ecológicos naturales en lo que respecta a su función, composición y estructura (Cabrera y Ramírez, 2014).

Colombia es reconocido como el país con mayor superficie de páramos a nivel mundial, tiene aproximadamente el 50% de este ecosistema, correspondiente al 1,7% del área nacional (Rojas, Ramírez y Osher, 2018), se caracteriza por albergar una gran diversidad y endemismo de especies lo cual los hace objeto de protección especial (Morales et al., 2007).

2.2.3. *Espeletia grandiflora*.

E. grandiflora (Humb.y Bompl.) es una especie de frailejón endémica de los andes orientales de Colombia distribuida desde los 2900 a 4100 m de elevación, pertenece a la familia Asteraceae, subtribu Espeletiina y suele ser una de las especies más representativas de los páramos (Rojas, Ramírez y Osher, 2018). Llega a medir hasta 3 m de altura, cuyo tallo se caracteriza por mantener la necromasa adherida como estrategia adaptativa a las fuertes temperaturas. Sus hojas están cubiertas de un indumento lanoso de color blanco grisáceo, tienen forma elíptica o lanceolada, con un ápice agudo y base estrecha que termina en un corto o largo pseudopeciolo (Rojas, Ramírez y Osher, 2018). Presenta inflorescencias compuestas que sobrepasan la longitud de la roseta foliar finalizando en capítulos las cuales se encuentran cubiertas por indumento lanoso amarillo-blancuzco. Las semillas son un complejo fruto-semilla denominado cipsela (conocida comúnmente como aquenio), son pequeñas, por lo general de 1-2.5mm de longitud, de forma ovoide triangular y de color café oscuro, cubiertas por una testa delgada y quebradiza. Estas se dispersan por barocoria, al llegar a la madurez caen al suelo (dispersión primaria) y posteriormente son arrastradas por algún agente (dispersión secundaria), este mecanismo les confiere una distribución restringida al carecer de estructuras que las trasladen a largas distancias favoreciendo procesos de especialización alopátrica (Rojas, Ramírez y Osher, 2018).

De acuerdo con Rojas, Ramírez y Osher (2018) *E. grandiflora* es una especie emblemática y de gran importancia para los pobladores, históricamente han sido reconocidas como las plantas que “llaman el agua”, ya que al atrapar la humedad de la atmosfera contribuyen a la regulación del recurso hídrico, además juegan un papel clave a nivel biológico y cultural.

2.2.4. Semillas.

Las semillas son el producto de la reproducción sexual de las plantas vasculares (gimnospermas y angiospermas) que garantizan la perpetuidad y variabilidad genética de las plantas en los ecosistemas (Vargas y Pérez-Martínez, 2014). Son el medio principal por el cual las plantas viajan a través de los paisajes (Gallego, 2014) y logran colonizar distintos hábitats gracias a su interacción con el ambiente. Las semillas desempeñan una función trascendental en la regeneración y propagación de las especies, dado que constituyen una unidad única que mantiene la variación en la progenie (Vargas y Pérez-Martínez, 2014), es así como las plantas han logrado establecerse en distintos ambientes adaptándose a las condiciones propias de cada uno, principalmente por los mecanismos de dispersión que han desarrollado (anemocoria, autocoria, zoocoria, barocoria, hidrocoria), los cuales garantizan el movimiento de las plantas a grandes distancias.

La mortalidad de las semillas puede ocurrir antes o después de la dispersión y está relacionada con la depredación a la que están expuestas, luego de caer al suelo las semillas pueden germinar y establecerse en el lugar o formar bancos de semillas, los cuales reemplazarán las plantas adultas, manteniendo las poblaciones vegetales (Vargas y Pérez-Martínez, 2014), sin embargo, en los páramos, estos bancos suelen ser superficiales y fácilmente degradables. Esta capacidad de mantenerse viable por largos periodos de tiempo está determinada por factores fisiológicos y por las condiciones ambientales del lugar (Doria, 2010).

2.2.5. Germinación de las semillas.

En la alta montaña la germinación y el establecimiento de las plántulas son las etapas donde se da la mayor pérdida de individuos (Körner, 2003), debido a las fuertes restricciones ambientales del páramo. Por ejemplo, las bajas temperaturas ralentizan la actividad metabólica de la semilla lo cual ocasiona que el consumo de sus reservas nutricionales se haga a menores tasas, favoreciendo que las semillas permanezcan en el suelo por periodos de tiempo prolongados (Vargas y Pérez-Martínez, 2014), razón por la cual las semillas tienden a tener un bajo porcentaje de germinación como en *Espeletia grandiflora*. Se ha demostrado que las condiciones extremas pueden provocar cambios en la floración, fructificación y productividad de las plantas o alterar los procesos de polinización, y, en consecuencia, la cantidad y calidad de las semillas (Vargas y Pérez-Martínez, 2014).

El proceso de germinación de las semillas comprende una serie de cambios metabólicos y morfo genéticos que puede darse en tres etapas sucesivas: la absorción de agua por imbibición a través del micrópilo, provocando el hinchamiento y ruptura de la testa, en segundo lugar, el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo y finalmente el crecimiento y la división celular que conlleva a la emergencia de la radícula a través de la cubierta seminal, cuyo resultado final es la germinación de la semilla (Tintitango, 2019). Según Doria (2010) la germinación se completa una vez que la plántula comienza absorber agua y a foto sintetizar sin depender de las sustancias de reserva.

Para que la germinación ocurra las semillas deben superar una serie de barreras extrínsecas la cuales incluyen factores abióticos (se deben dar las condiciones favorables de agua, luz y oxígeno) y bióticos (depredación de las semillas, la acción de patógenos y

herbívoros), y también barreras intrínsecas (la semilla debe ser viable, madura y no presentar dormancia, el embrión debe encontrarse en óptimas condiciones). Uno de los factores intrínsecos más importantes es la viabilidad de las semillas, definido como el periodo en el cual las semillas conservan su capacidad para germinar dependiendo el tipo de semilla y las condiciones de almacenamiento (Gallego, 2014).

2.2.6. Dormancia y tratamientos pre germinativos.

Algunas semillas son incapaces de germinar aun cuando se encuentren en condiciones ambientales idóneas (Doria, 2010). Este estado de latencia o dormancia es una estrategia adaptativa que permite que las semillas se conserven viables en condiciones desfavorables, garantizando el éxito de las plantas (Vargas y Pérez-Martínez, 2014). En zonas de gran altitud, puede presentarse una mayor dormancia en las semillas como una estrategia para disminuir la competencia entre los individuos por los recursos (Vargas y Pérez-Martínez, 2014). Existen dos tipos de latencia que pueden presentarse de forma individual o combinada, latencia exógena y endógena, la primera es inducida por las características de la cubierta seminal (dormancia física, química y mecánica), en tanto que la latencia endógena está determinada por las características anatómicas, fisiológicas y morfológicas del embrión (Doria, 2010). Esta distinción es importante a la hora de seleccionar los tratamientos pre germinativos adecuados para romper el letargo, entre los métodos más comunes se encuentran:

- Escarificación: se refiere a cualquier proceso de desgaste o ablandamiento (mecánico o químico) de la cubierta seminal para hacerla permeable al agua y a los gases. Se han

utilizado tratamientos con agua caliente, inmersión en ácido, cambios de temperatura, exposición a la luz entre otros (Varela y Arana, 2011).

- **Estratificación:** se emplea para romper la latencia fisiológica del embrión causada por una maduración tardía (Varela y Arana, 2011). Para ello se utiliza la exposición de las semillas a temperaturas cálidas o frías en condiciones de humedad, la cual promueve el desarrollo de los embriones (Vargas y Pérez-Martínez, 2014).

2.2.7. Almacenamiento y conservación de semillas.

El almacenamiento de las semillas permite asegurar la preservación de especies por largos periodos de tiempo contribuyendo a la conservación exsitu del germoplasma vegetal. Este procedimiento se debe realizar teniendo en cuenta las condiciones específicas de cada especie y dependiendo del tipo de semilla (Doria, 2010). Las semillas ortodoxas pueden almacenarse en porcentajes de baja humedad debido a que son tolerantes a la desecación, por el contrario, las semillas recalcitrantes son sensibles a la desecación y a las bajas temperaturas de modo que requieren altos contenidos de humedad (Vargas y Pérez-Martínez, 2014). Es de gran importancia seleccionar un método adecuado de almacenamiento pues de eso dependerá que se mantengan viables hasta su siembra (Doria, 2010), de lo contrario pueden o no germinar antes de lo previsto o pueden contaminarse por agentes patógenos (Vargas y Pérez-Martínez, 2014).

De acuerdo con Mancipe-Murillo (2020) las semillas de *Espeletia* pueden tener un comportamiento ortodoxo, esto se debe a que por lo general el tamaño y peso de las semillas

pueden estar relacionados con la tolerancia a la desecación, por tanto, las semillas más pequeñas, como las del frailejón, toleran la deshidratación sin perder la viabilidad.

Conocer los requerimientos específicos de almacenamiento y las condiciones óptimas de las semillas, contribuye a la conservación exsitu de especies cuyas poblaciones se encuentran amenazadas y es una medida para asegurar la diversidad genética contra la pérdida de poblaciones in situ (Gold, León-Lobos y Way, 2004).

2.2.8. Rizosfera y organismos asociados.

La rizosfera constituye la interfaz de raíz-suelo en donde se presenta una gran cantidad de interacciones y especializaciones entre los microorganismos, el suelo y las raíces, estas relaciones pueden ser por competencia, mutualismo, comensalismo, amensalismo, depredación y parasitismo (Pedraza et al., 2010). Esta región adyacente a las raíces es la zona de mayor actividad microbiana cuya influencia condiciona la nutrición y salud de las plantas debido a la gran diversidad de interacciones nombradas anteriormente (Pedraza et al., 2010). Es considerada un área dinámica con características físicas, químicas y biológicas propias, incluso por algunos autores es denominada como un criptoecosistema fundamental para el funcionamiento global de la biosfera.

El tipo de vegetación y los compuestos orgánicos liberados por las raíces de las plantas modifican las poblaciones de microorganismos del suelo brindándoles exudados ricos en carbohidratos, azúcares, y otros elementos producto de la fotosíntesis que utilizan para su

desarrollo, estos a su vez contribuyen al crecimiento vegetal aumentando la cantidad de nutrientes que son tomados por las plantas (Pedraza et al., 2010).

2.2.9. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Debido a su potencial biotecnológico, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPB (por sus siglas en inglés) (Kopler et al 1988) (Bashan Y, Holguin G. 1998) constituyen una alternativa para mejorar y aumentar las especies vegetales mediante su inoculación al suelo o a la planta (Pedraza et al., 2010). Se pueden encontrar de forma libre o en asociación con las raíces, las cuales estimulan, mejoran y facilitan su desarrollo por medio de mecanismos como: síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico), fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos, interacción sinérgica con otros microorganismos y control de fitopatógenos del suelo (Loredo-Osti, López-Reyes & Espinosa-Victoria, 2004). Dentro de las PGPB *Azospirillum brasilense* ha sido uno de los microorganismos más estudiados y utilizados para la promoción del crecimiento en las plantas, su importancia se debe a que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en formas disponibles para las plantas, por otro lado tienen la capacidad de sintetizar metabolitos o sustancias reguladoras de crecimiento promoviendo el incremento de la raíz para la toma de agua y nutrientes (Loredo-Osti, López-Reyes & Espinosa-Victoria, 2004). Es por ello que las PGPB prometen muchos beneficios para las plantas evitando el uso de fertilizantes químicos y generando un menor impacto en los ecosistemas.

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es la mejor forma para llevar a cabo el almacenamiento y germinación de las semillas de *E. grandiflora*?

3.1 Hipótesis

La mejor Forma de llevar a cabo el almacenamiento y germinación de *E. grandiflora* es Inoculando sus semillas con *Azospirillum brasilense* y guardando las semillas previamente separadas del capítulo en sobres de papel

4. Justificación

Prácticamente todo sistema hídrico, fluvial de sur América, más específicamente de los andes tienen su origen en ecosistemas de alta montaña como los páramos y que de estas estrellas hídricas se alimentan los sistemas de riego, acueductos y redes de agua potable y hasta las hidroeléctricas que son la base de la generación de la energía en nuestras naciones , todos estos sistemas antrópicos dependen de la capacidad de los páramos para regular los flujos hídricos (Hofstede,2014). Es importante resaltar que el páramo y los bosques altoandinos tienen una estrecha relación que se fundamenta en su integridad ecológica, en su estructura- función y que procesos como la regulación hídrica están estrechamente asociadas a la conexión de estos dos ecosistemas.

Es muy notoria la presión que se ejerce a estos ecosistemas, actividades que limitan los procesos claves hidrológicos, además de que estos ecosistemas tienen unas extensiones relativamente pequeñas en comparación a la superficie acompañado de un alto grado de endemismo, estos factores hacen que las coberturas vegetales de especies emblema como *Espeletia grandiflora* se vean afectadas (Calderon et al., 2005)

De esta manera surge la necesidad de establecer estudios que permitan no solo la conservación en los propios ecosistemas, si no que también la conservación ex situ es necesaria, estudiado a detalle el comportamiento de las especies, sus ciclos reproductivos y de desarrollo podemos garantizar óptimos resultados de reproducción de estas especies lo que daría paso a una reintroducción de individuos en zonas intervenidas, buscando procesos de restauración y fortaleciendo la resiliencia de los ecosistemas. (Calderon et al., 2005)

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el almacenamiento y germinación de semillas de *Espeletia grandiflora*, y el efecto de diferentes tratamientos en su germinación.

5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los tratamientos físicos pregerminativos en semillas de *E. grandiflora* .
- Obtener bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizosfera de *E. grandiflora*
- Evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* y de las bacterias aisladas de la rizosfera de *E. grandiflora* en la germinación de semillas de *E. grandiflora*.

6. Métodos

6.1. Fase de campo

EL estudio de campo tuvo lugar en el páramo de Ocetá localizado en el Parque Natural Regional Siscunsi Ocetá en el segundo periodo del año 2019 con dos salidas realizadas en agosto y noviembre. Las muestras se tomaron en un área del páramo lejana y con la menor intervención antrópica, en las coordenadas N 5 ° 42.389'0 O 72 ° 48.434'0, identificando individuos de *Espeletia grandiflora* al azar, que tuvieran características de madurez sexual.



Figura 2 Lugar de tomas de muestras en el PNR Siscunsi Ocetá

Se realizó una toma de suelo cercana a la base usando una pala de jardinería de la siguiente forma, se removió la primera capa vegetal, dejando el suelo desnudo y se hizo un hueco con una profundidad de 20 cm, estas muestras se almacenaron en bolsas plásticas con sellado hermético y transportadas en neveras para conservarlas entre 2 y 4 grados centígrados siguiendo la metodología propuesta por Salazar & Luters (2000). Para las muestras vegetales se siguió el método propuesto por Tintinago (2019) tomando los capítulos florales de los individuos y almacenados en bolsas de pape(Ailstock et al., 2010; Cummins & Miller, 2000; Müller et al., 2011)l para absorber la humedad y de igual manera se dispusieron en las neveras para su debido transporte.



Figura 3 A) Colecta de capítulos florales, B) almacenamiento del material vegetal, C) almacenamiento de muestras de suelo.

6.2. Fase de laboratorio

La fase de laboratorio fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones de Biología de la Universidad El Bosque (INBIBO) en la ciudad de Bogotá. Esta a su vez se dividió en la caracterización y almacenaje de los capítulos florales y las semillas, tratamientos pregerminativos y germinación de las semillas de *E grandiflora*

6.2.1. Almacenamiento de las semillas.

El material colectado fue transportado en bolsas de papel INBIBO, para un posterior tratamiento de almacenaje, una fracción de las semillas fue germinada una vez llegaron al laboratorio por otro lado, el almacenamiento se realizó de dos maneras; a) los capítulos enteros y b) las semillas extraídas de los capítulos, en los dos casos se guardaron en bolsas de papel. El almacenamiento de las semillas fue durante un año antes de su germinación, las muestras botánicas se sometieron a un agente insecticida para eliminar cualquier organismo que pudiera consumirlas durante el largo periodo de almacenado.



Figura 4 Extracción de las semillas de los capítulos de *E. grandiflora* para su posterior almacenamiento

6.2.2. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera de *E. grandiflora*.

Se realizó un preenriquecimiento tomando 10 gramos de suelo en 90 ml de solución salina previamente esterilizada al 0.85% e incubándola por 24 a 48 horas a 37°C en botellas ámbar estériles (Holguin et al., 1996). Se realizaron diluciones seriadas y se tomó 0.1 ml de las últimas dos diluciones sirviéndose en agar OAB (Okon et al., 1977) (Anexo 1), este medio selectivo libre de nitrógeno, usado para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno. Las cajas inoculadas se incubaron a 37°C y observando el crecimiento a partir de las 72 horas después de la siembra por 2 semanas. Al obtener crecimiento bacteriano, se realizó un repique a las colonias diferentes entre sí, en un medio de cultivo estéril OAB (Okon et al., 1977)) por el método de estría cruzada, para obtener un cultivo puro. (Collins y Lyne, 1989).



Figura 5 Preenriquecimiento del suelo en botellas ámbar.

6.2.3. Caracterización Bacteriana.

La clasificación de las bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó por medio de morfotipos diferenciados por características macroscópicas, microscópicas e identificación del grupo funcional por medio de la extracción de ADN y aplicación de PCR de punto final.

6.2.3.1. Preparación de los inóculos bacterianos.

Azospirillum brasilense fue elegida como bacteria control por ser una bacteria promotora del crecimiento vegetal y con la característica de fijar de nitrógeno atmosférico (Levanony et al, 1989), al igual que las bacterias que se aislaron de la rizosfera de *E. grandiflora*, la cepa de *A. brasilense* fue proporcionada por INBIBO, la cual se encontraba en estado de criogenización, por lo cual fue reactivada en medio enriquecido BTB y medios selectivos OAB (Bashan, et al., 2011). Después de activar la bacteria modelo y tener los tres

morfotipos aislados se prepararon diferentes repiques (Anexo 2) en medio enriquecido BTB (Bashan, et al., 2011) y OAB (Okon et al, 1977)



Figura 6 A) Inóculos en medio BTB B).Viales de criogenia *A. brasilense* y sus medios de cultivo

Las bacterias que proliferaron en el medio para fijadoras de nitrógeno OAB (Bashan, et al., 2011) se diferenciaron por morfotipo según sus características que presentaban cada colonia con observación directa al estereoscopio se evaluó la forma de la colonia, el borde, coloración y consistencia permitiendo diferenciar cada aislamiento bacteriano como un morfotipo diferente.

6.2.3.5. Características microscópicas.

A las colonias previamente identificadas y aisladas, se les realizó tinción de Gram (Collins & Lyne, 2004, p.90.) tomando una porción de la colonia con un asa microbiológica, se extendió en una lámina de vidrio junto a 50 µl de agua destilada, creando una mezcla homogénea, dejando secar por completo para poder proceder con la tinción de Gram para luego poder ser observadas en el microscopio previamente las láminas fijadas (Anexo 3) y de esta forma evidenciar si pertenecen al grupo de las Gram positivas o Gram negativas junto a

descripción de la forma celular vista al microscopio. Con la caracterización macroscópica se podía ratificar que se trataban de morfotipos diferentes o por el contrario agruparlos según correspondiera.

6.2.3.6. Conservación de inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos y *Azospirillum brasilense* se preservaron en criogenia, siguiendo con la siguiente metodología:

Se mezclan cantidades iguales del cultivo bacteriano y el crioprotector. La mezcla se hace en los viales criogénicos, estos viales se colocan en las cañas y se sumergen en hielo para transportarse al congelador en donde deberán permanecer 2 horas. También pueden ser precongelados en el cuello del termo de nitrógeno líquido durante 15 minutos, transcurrido este tiempo la temperatura del vial es de -70 °C. Los viales pueden ser sumergidos en el nitrógeno líquido a -196 °C . En estas condiciones se pueden mantener durante varios años.(Carrillo et. Al, 1998)

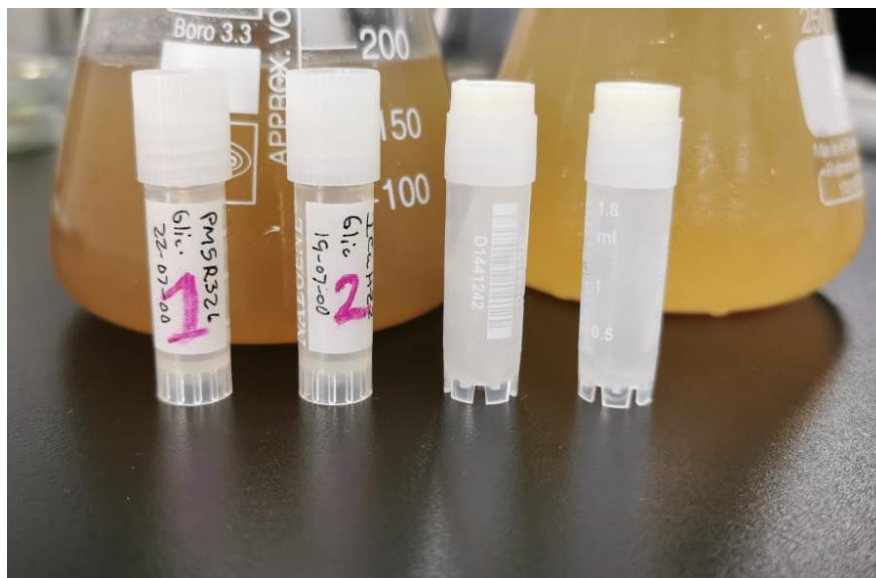


Figura 7 Inóculos preparados en viales para almacenamiento en criogenia

6.2.4. Extracción de ADN y Caracterización molecular

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de tratamiento térmico de extracción para bacterias (Dashti, et al., 2009) (Anexo 4). El cual consiste en suspender una colonia bacteriana en 1 ml de agua destilada, por lo cual se hizo una previa modificación centrifugando 1 ml del inóculo líquido de cada morfotipo por 5 minutos a 6.500 rpm para obtener el botón celular (Anexo 5), retirando el sobrenadante, la masa celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada y luego llevada a hervir en baño de agua durante 10 minutos, para luego ser centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos y usando el sobrenadante (5 µl).

Con la extracción concluida se procedió a realizar una comprobación de la extracción por medio de un gel de calidad de ADN y corriendo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (0,4 g de agarosa) suspendido en 40 ml de Buffer TBE geles 1x (Tris-Borato EDTA) a unos

50°C para lograr una mezcla homogénea del TBE y la agarosa, a esta mezcla se agregaron 2 µl del colorante SafeView™ que pondrá en evidencia el material genético depositado sobre el gel, esta mezcla se vierte en el molde de la cámara de electroforesis, después de que se solidificara se sirvió el ADN junto a 2 µl buffer de carga mezclados previamente. Con las muestras preparadas, se cubrió el gel con el buffer de corrida TBE 1X, se cerró la cámara de electroforesis Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B1A (Anexo 6), los parámetros de la fuente de electroforesis PowerPac™ Basic Power Supply (Anexo7) fueron: un tiempo de corrida de 30 minutos al tener dos carriles de pocillos, para un carril sencillo se programó la cámara con 45 minutos, para ambos intervalos de tiempo se colocó un voltaje de 100v y una intensidad de corriente de 400 mAh. Al terminal el proceso, el gel se lleva a al transiluminador para ser observado bajo luz UV y evidenciar la presencia de ADN.

6.2.4.1. Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Para la confirmar que los morfotipos aislados fueran fijadoras de nitrógeno se optó por la prueba de PCR de punto final con la extracción previa de ADN, se empleó el cebador que amplifica a 168 pb Forward: GTTCTCAAGATCGGCTACAAGG y Reverse: AGCACGTCGTAGGAGACGTAGT las cuales dejaron a una concentración 15 µM para poder ser reincorporados a una sola solución de 2 ml, el primer seleccionado corresponde al gen NifH secuenciado de *A. brasilense* (Szymanska,S., Baum,C., Vogts,A. and Hryniewicz,K., 2017).

Para corroborar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Para la preparación del ADN y el primer se tomaron las muestras

obtenidas en la verificación de calidad de ADN, se agregó 12.5 µl de (master mix), 5 µl del cebador para el gen NifH, seguidamente del ADN (2 µl) de los tres morfotipos aislados, la bacteria modelo que a su vez hace de control positivo, y por último el control negativo, el volumen de las mezclas se completaron con 5.5 µl de agua desionizada y se dispusieron en tubos eppendorf estériles para PCR, se colocaron en el termociclador (C1000 Touch™ Thermal Cycler - BioRad) (Anexo 8) con el protocolo NifH (Mirza et al., 2006) (Anexo 9) 4

6.2.5 Prueba de viabilidad por flotabilidad

La prueba en si no es un tratamiento pregerminativos, es un primer paso aconsejable para depurar impurezas y semillas vacías (Arriaga et al., 1994). Las semillas se colocaron en un recipiente de 250 ml con 200 ml de agua destilada por 24 horas, procurando no colocar semillas en exceso o el procedimiento no será efectivo; las semillas que están completas o con un supuesto potencial fisiológico de germinación se hundirán y las vacías o inviables flotarán (Schmidt, 2000).

6.2.6. Prueba de viabilidad por tetrazolio

La prueba de TZ se llevó a cabo antes de los dos tiempos de germinación TZ1 y TZ2, a las semillas que no pasaban la prueba de flotabilidad, y a las semillas no germinadas, para llevar a cabo la prueba TZ se preparó una solución 1% con 5 gramos de TZ y 500 ml de agua destilada, las semillas se sumergieron en esta solución durante 24 horas (ISTA, 1993), luego se procedió a

realizar cortes longitudinales y transversales, y detallar lo sucedido en el estereoscopio. La prueba TZ fue empleada por que permite estimar de forma rápida la viabilidad de la semilla cuando: Las semillas presentan algún tipo de latencia, o latencia profunda, cuando se requiere estimar el potencial de germinación rápidamente, para comprobar las semillas finalizada las pruebas de germinación (ISTA 2003)

- Las semillas presentan latencia profunda. - Las semillas son de germinación lenta. - En casos donde se requiere una estimación muy rápida del potencial de germinación. - Para determinar la viabilidad de las semillas al final de una prueba de germinación.

6.2.7. Tratamiento de las semillas: germinación e inoculación de las semillas.

De las semillas colectadas y almacenadas se escogieron, mediante la observación por estereoscopio, aquellas que presentaban características visuales y físicas optimas tales como, firmeza, coloración oscura, que las semillas estuvieran completas (Anexo 10) a las semillas previamente escogidas se les realizo un proceso de higienizado, el cual consta de sumergir las semillas en el detergente Tween 20 a una concentración de 2% por 10 minutos, seguidamente se agregó hipoclorito sódico al 3% por 5 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron con abundante agua destilada para eliminar cualquier residuo y olor a cloro cloro (Hernández et al 2005).

6.2.7.1 Primera Germinación: No inoculados

La germinación tuvo lugar en dos tiempos con una diferencia de un año entre cada tiempo. La primera germinación se llevó a cabo en la última semana de agosto, donde se prepararon 380 semillas a las cuales se les realizó la prueba de flotación. Las semillas se colocaron en un recipiente de 250 ml con 200 ml de agua destilada; las semillas que están completas o con un supuesto potencial fisiológico de germinación se hundirán y las vacías o inviables flotarán (Schmidt, 2000; Sosa-Luria et al. 2012). Transcurridas 24 horas se tenía dos grupos de semillas, las semillas que flotaron y las semillas que se depositaron en el fondo, se tomaron 105 semillas al azar para comprobar la viabilidad del lote mediante la prueba de Tetrazolio (ISTA, 1993). Las 105 semillas al azar se componían de la siguiente manera: 35 semillas que flotaron, 35 semillas del fondo y 35 semillas del fondo se les escarificó previo la prueba de tetrazolio.

El grueso de semillas de la primera germinación que pasaron la prueba de flotabilidad fue repartido en los siguientes tratamientos: Semillas completas y semillas con escarificación física, la cual consistió en la ruptura de la testa manualmente, estos dos grupos de semillas se mantuvieron las 24 horas del día con luz, de la misma forma dos grupos de semillas se dispusieron en oscuridad total.

6.2.7.2 Segunda Germinación: Inoculados

La segunda fase de germinación, tuvo lugar un año después de colectado el material, se tomaron 600 semillas que estaban almacenadas en los capítulos enteros y 600 semillas en sobres de papel (Anexo11) , se les realizó el mismo proceso de higienizado, prueba de flotabilidad (Anexo 12) y de tetrazolio, a las semillas almacenadas por un año, además de los tratamientos de

escarificación (anexo 13) se les sumo los tratamientos con las bacterias aisladas de la rizosfera de *E grandiflora*, y la bacteria modelo. La inoculación de las semillas con los morfotipos bacterianos se dio posteriormente a la higienización de las semillas y pruebas de flotabilidad, las semillas se sumergieron en los medios líquidos y se mantuvieron en agitación constante durante dos horas (Bashan et al., 2013), para luego ser retiradas y disponerlas en las cajas Petri de germinación.

La germinación en oscuridad fue descartada para esta segunda fase. Además de eso para comprobar la efectividad de la prueba de flotación, las semillas que eran supuestamente inviables se dispusieron igualmente a germinar en las dos fases (recién colectadas y con un año de almacenamiento).

En la primera fase de germinación los tratamientos a evaluar fueron: Capitulo (C), Capitulo escarificado (C.E), Capitulo en oscuridad (C.O) y Capitulo escarificado en oscuridad (C.E.O). además de los cuatro tratamientos anteriores, se quiso comprobar la eficacia de la prueba de flotabilidad con el siguiente tratamiento: Capitulo Flotabilidad (C.F)



Figura 8 Muestras de la primera fase de germinación de las semillas de *E. grandiflora*.

Los tratamientos obtenidos en la segunda fase fueron dieciséis, y se componen de las siguientes variables : la forma en que se almacenaron, sea en sobre o en el capítulo, si fue escarificada o no y por último si tiene inoculo bacteriano o si carece de este. Dicho lo anterior los tratamientos usados fueron:

Bacteria	Capítulo (C)	Capítulo Escarificado (C.E)	Sobre (S)	Sobre Escarificado (S)
M1	(C. M1)	(C.E M1)	(S. M1)	(S. M1)
M2	(C. M2)	(C.E M2)	(S. M1)	(S. M2)
M3	(C. M3)	(C.E M3)	(S. M1)	(S. M3)
<i>Azospirillum brasilense</i>	(C. AB)	(C.E AB)	(S. AB)	(S.E AB)

Tabla 1 Tratamientos planteados para la segunda germinación

Además de los veinte tratamientos, se quiso comprobar la eficacia de la prueba de flotabilidad con los siguientes tratamientos: las semillas que flotaron provenientes directamente

del capítulo, Capítulo Flotabilidad (C.F) y las semillas que flotaron proveniente del almacenamiento en sobres (S.F)

Todos los ensayos de germinación fueron realizados sobre papel filtro humedecido en cajas Petri de vidrio en condiciones estériles. Se pusieron 35 semillas por tratamiento con 10 ml de agua destilada y cada tercer día se verificaba el nivel de humedad del papel filtro y se agregaba agua destilada ligeramente cuando fuera necesario esto se realizó durante 30 días. A medida que iban germinando las semillas, se anotaba el numero acumulado de semillas, se considera que una semilla había germinado cuando la radícula tenía 1mm de proyección.

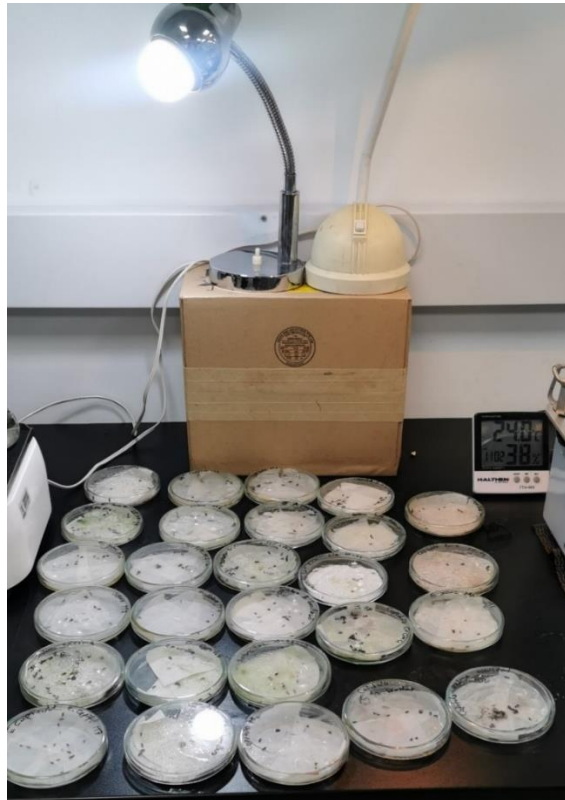


Figura 9 Segunda fase de germinación de las semillas de E. grandiflora.

6.2.8. Análisis de los datos de germinación de las semillas de *E*.

Los datos se analizaron con el programa SPSS de IBM, todas las pruebas estadísticas tuvieron un valor de significancia del 0.05% la primera germinación se analizó con una prueba t-Student para comparar las dos condiciones donde se dio germinación, la cual no arrojó diferencias estadísticas significativas y esto se representó mediante un grafico de error estándar, en el cual se sobreponen indicando similitudes entre los tratamientos.

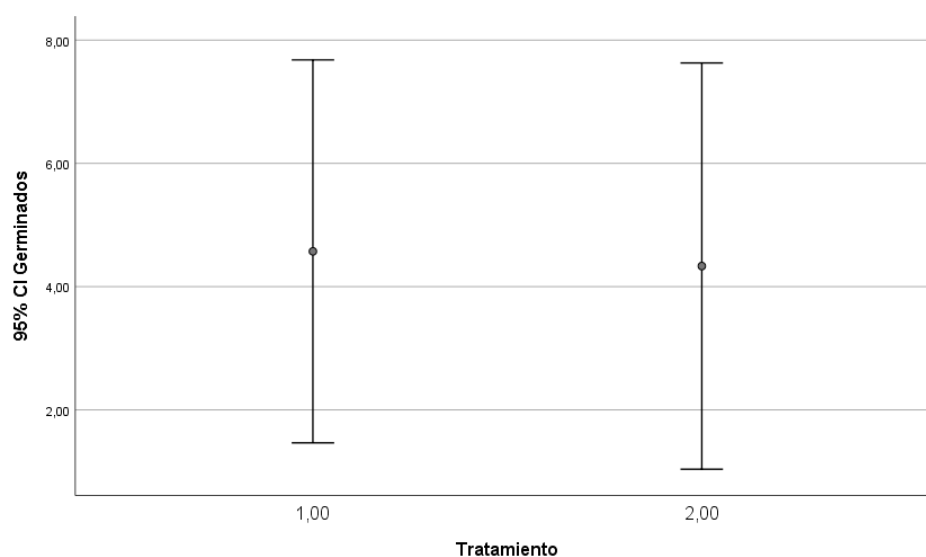


Figura 10 Error estándar para la prueba T de Student entre los germinados de luz y oscuridad con semillas escarificadas

La segunda germinación se analizó con dos pruebas ANOVA, una prueba para para comprar los tratamientos control, la cual no arrojo diferencias estadísticas.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Germinados
HSD Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-2,30159	1,12651	,196	-5,3708	,7676
	3,00	,26984	1,12651	,995	-2,7994	3,3390
	4,00	,15556	1,02708	,999	-2,6427	2,9538
2,00	1,00	2,30159	1,12651	,196	-,7676	5,3708
	3,00	2,57143	1,19485	,161	-,6839	5,8268
	4,00	2,45714	1,10160	,139	-,5442	5,4585
3,00	1,00	-,26984	1,12651	,995	-3,3390	2,7994
	2,00	-2,57143	1,19485	,161	-5,8268	,6839
	4,00	-,11429	1,10160	1,000	-3,1156	2,8870
4,00	1,00	-,15556	1,02708	,999	-2,9538	2,6427
	2,00	-2,45714	1,10160	,139	-5,4585	,5442
	3,00	,11429	1,10160	1,000	-2,8870	3,1156

Figura 11 Comparación entre los tratamientos control. ANOVA

Para los tratamientos inoculados y sus controles se analizó con una prueba ANOVA junto a un test de Tukey para agrupar los tratamientos entre los que tienen diferencias estadísticas y los que no. Como resultado se observaron dos grupos, los inóculos bacterianos grupo (1) y los tratamientos control (2), donde se sobreponen los tratamientos control 1 (C), 3 (S) y 4 (S.E) con los inóculos, siendo el control 2 (C.E) el único control que no comparte diferencias significativas con ninguno, haciéndolo estadísticamente la mejor manera para germinar las semillas de *E. grandiflora*

El número de semillas germinadas se representaron en conteos totales y parciales que generaron gráficos de líneas, además de esto se calculó el porcentaje de germinación, el porcentaje de viabilidad por la prueba de tetrazolio (TZ) y se compararon entre si la curva de germinación obtenida para cada uno de los tratamientos, se tomó el tiempo de retardo

germinativo (Bachetta et.al., 2008), que se define como el tiempo necesario para observar la primera semilla germinada .calcularon los siguientes índices germinativos, con el objetivo de establecer el tratamiento óptimo de germinación

Germinados

HSD Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8,00	7	,5714	
7,00	5	,6000	
9,00	7	1,1429	
10,00	8	1,2500	
6,00	7	1,4286	
5,00	6	1,5000	
3,00	7	2,2857	2,2857
4,00	10	2,4000	2,4000
1,00	9	2,5556	2,5556
2,00	7		4,8571
Sig.		,639	,278

Figura 12 Test Tukey Subconjuntos entre tratamientos bacterianos (1) y control (2).

7. Resultados y discusión

7.1 Aislamientos de bacterias de la rizosfera de *E. grandiflora*

Se aislaron tres morfotipos, que cumplieran con las características deseadas de los aislamientos bacterianos, (2 bacilos Gram negativos y 1 coco bacilo Gram positivo).

En las dos zonas estudiadas los bacilos Gram negativos fueron el grupo más abundante, similar a lo obtenido por Lizarazo-Medina et al., (2015) quienes obtuvieron 11 aislados Gram negativos de la rizosfera de *Espeletia* spp.

Morfotipos	Características macroscópicas	Tinción Gram
M1	Colonias de forma regular, redondas, de color crema blanco con centro amarillento tenue, mucoides, elevación convexa	Bacilo Gram Negativo
M2	Colonias irregulares, bordes redondos ramificados de color blanco, viscosas, mucoide de superficie convexa,	Bacilo Gram Positivo
M3	Colonias circulares de color Amarillo borde definido, mucoides, con poca elevación	Cocos Gram Positivos
<i>Azospirillum brasilense</i>	Colonia circular de color rosa, mucosa, superficie plana	Bacilo Gram Negativo

Tabla 2 Caracterización de los morfotipos fijadores de nitrógeno aislados de la rizosfera de *E. grandiflora*

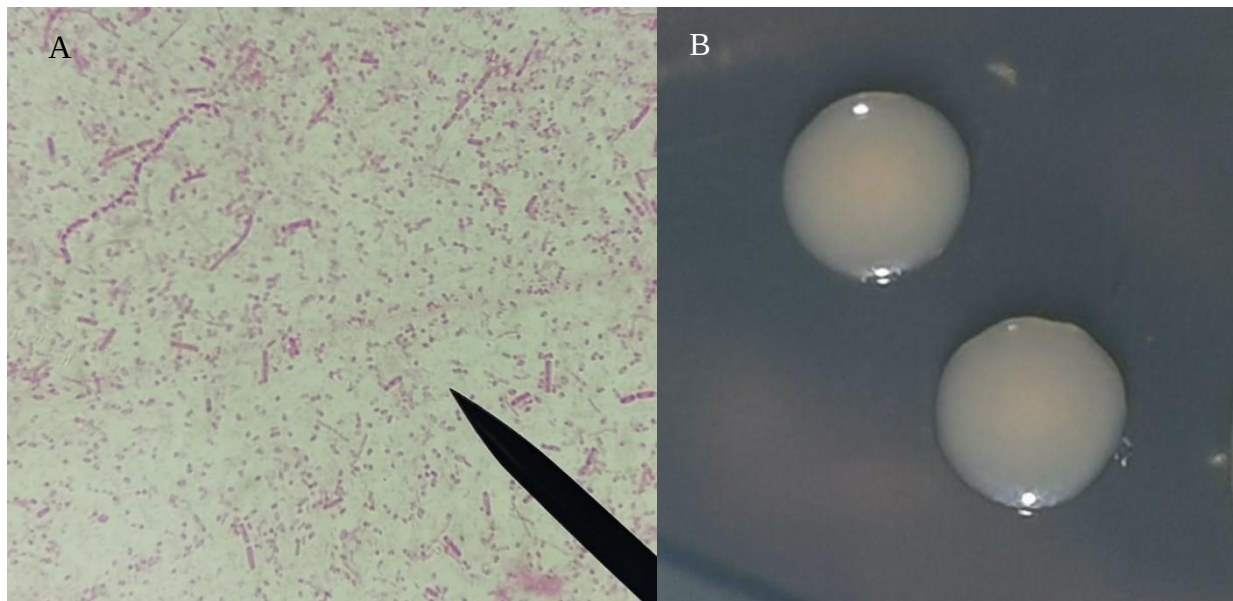


Figura 13 Morfotipo1 (M1) A) Vista microscopio 1000 aumentos, bacilos gran negativos B) Colonia a simple vista en agar BTB.

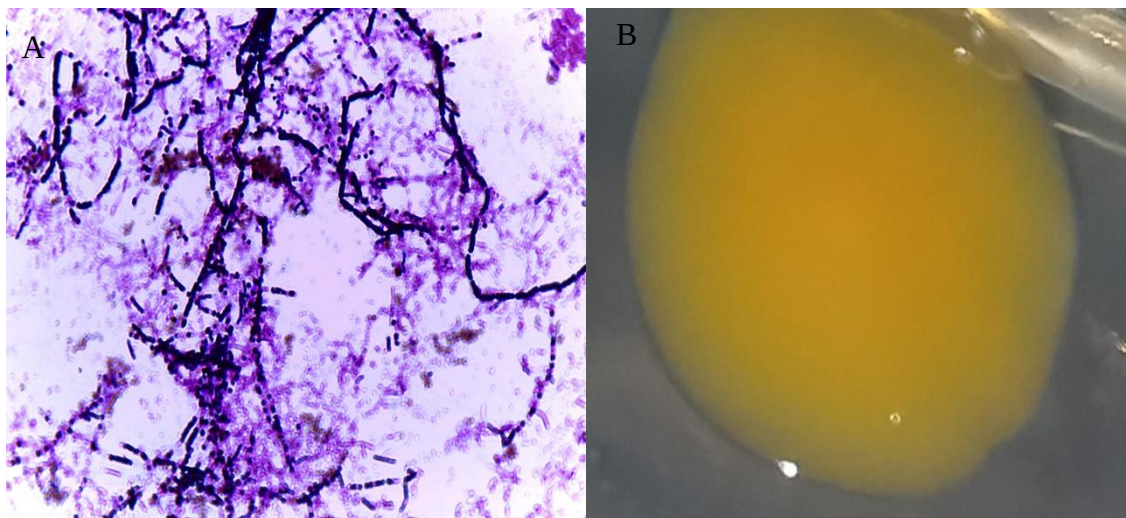


Figura 14 Morfotipo 2 (M2) A) Vista microscopio 1000 aumentos, bacilos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB.

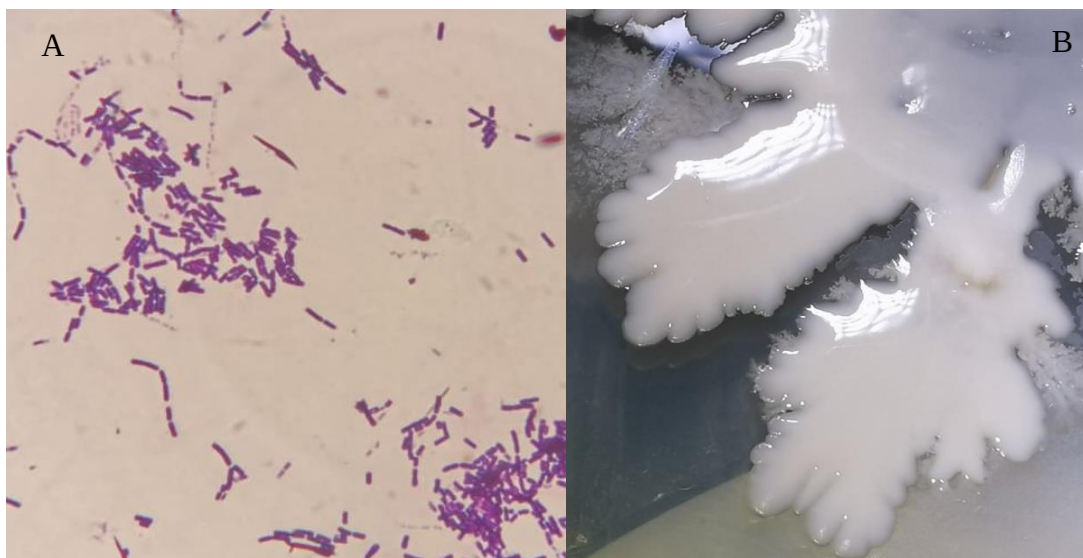


Figura 15 Morfotipo 3 (M3) A) Vista microscopio 1000 aumentos, cocos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB.

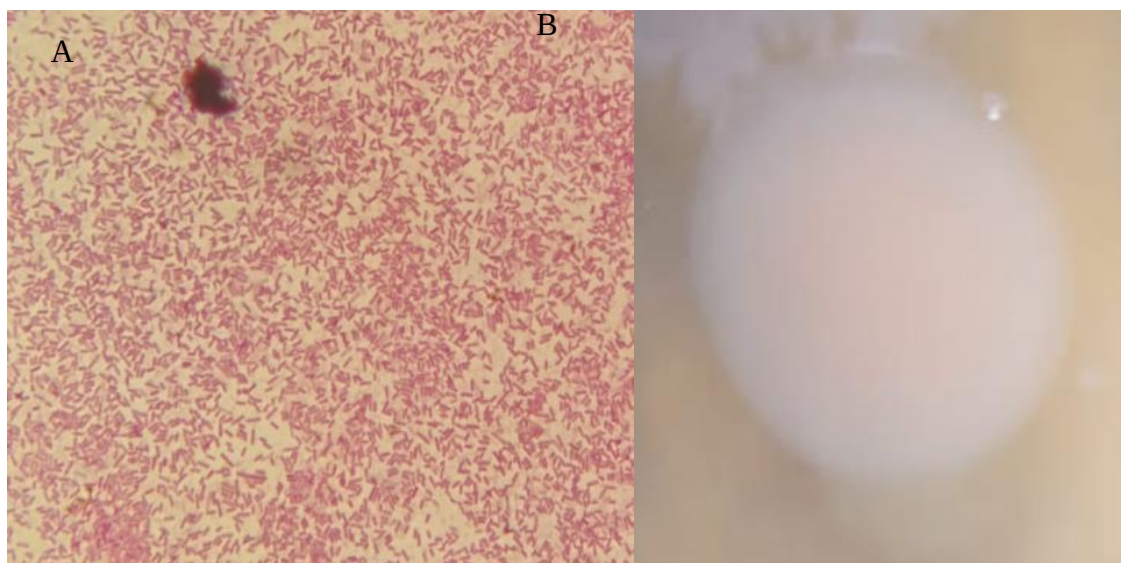


Figura 16 *Azospirillum brasilense* (Bacteria control) A) Vista microscopio 1000 aumentos, cocos gran positivos B) Colonia a simple vista en agar BTB

7.1.2 Extracción de ADN de los morfotipos aislados

La extracción por el método térmico fue el más eficiente, logrando recuperar el ADN de las 4 muestras, del cual las bacterias se obtuvieron de un medio líquido, por ello se llevó a centrifugar antes de implementar la metodología de extracción propuesta por Dashti y colaboradores (2009), además de eso se implementó esta metodología por lo rápida y sencilla, con resultados suficientes para llevar a término otros procesos como secuenciación o amplificación del material genético

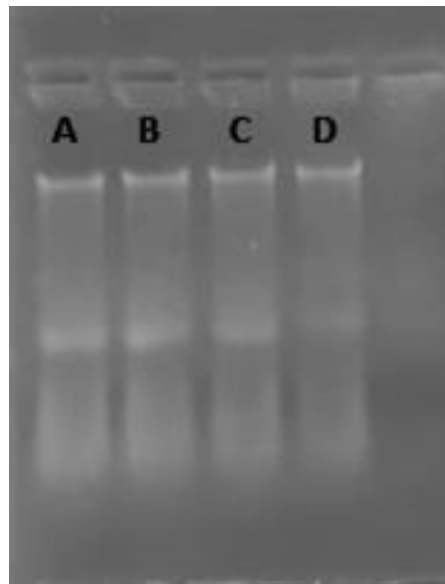


Figura 17 Visualización del gel de agarosa con cuatro carriles de resultados positivos

7.2 Confirmación de grupo funcional por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue exitosa usando el primer seleccionado correspondiente al gen NifH secuenciado de *A. brasilense* (Szymanska,S. et al, 2017). Es posible observar la amplificación del material genético a 168 pares de bases indicando que todos morfotipos presentan el gen NifH, soportado por el mismo resultado de la bacteria control que corresponde a los carriles A, B y E, los carriles F, G y H corresponden a los morfotipos M1 , M2 y M3 respectivamente, los carriles C y D son el control negativo, por lo cual no debería haber ninguna amplificación del material genético.

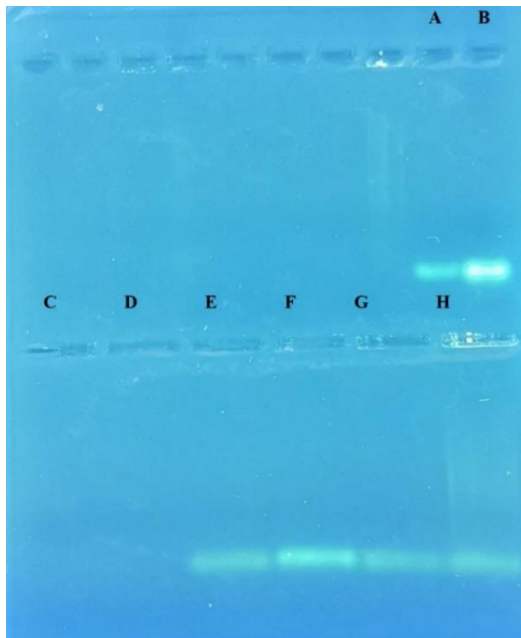


Figura 18 Visualización del gel de agarosa de PCR de 16 carriles, los cuales se usaron 8 carriles, 3 para control positivo, 2 para control negativo y 3 para los morfotipos aislados de la rizosfera de *E. grandiflora*.

7.3 Observación de las características de las semillas

Las semillas fueron clasificadas manualmente teniendo en cuenta que fueran semillas enteras, con coloración oscura, testa firme y compacta, bordes en buen estado, sin lesiones, roturas o indicios de haber sido consumidas

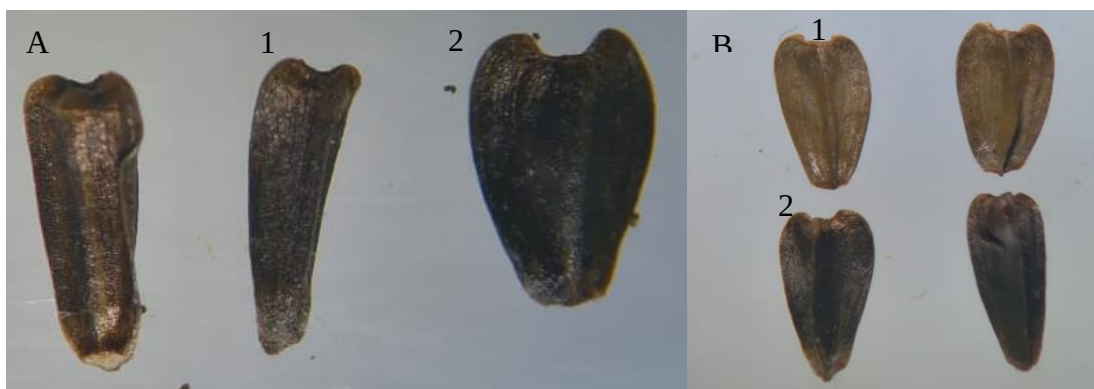


Figura 19 Clasificación de las semillas A) forma de las semillas B) coloración de las semillas

Se encontraron semillas con bordes irregulares (A), semillas alargadas y asimétricas (1), se dio preferencia a las semillas de buen tamaño y forma redondeada y con coloraciones oscuras (2), las semillas (B) de color más claro (1) presentaban fragilidad y con frecuencia estaban vacías, la condición de testas vacías es común dada a la alta cantidad de semillas que produce *Espeletia* en sus inflorescencias, como lo menciona Mancipe-Murillo (2020) que encontró hasta el 65% de semillas vacías en varias especies de *Espeletia* y *Espeletiopsis* por lo cual fueron descartadas. En la obtención de las semillas se evidencio que por capitulo podían haber más de cien semillas, Körner (2003) que propuso que la germinación de las semillas y el establecimiento de plántulas son probablemente los procesos en los cuales se da la mayor pérdida de individuos en alta montaña, por ende, se tienen altos números de semillas por capítulos

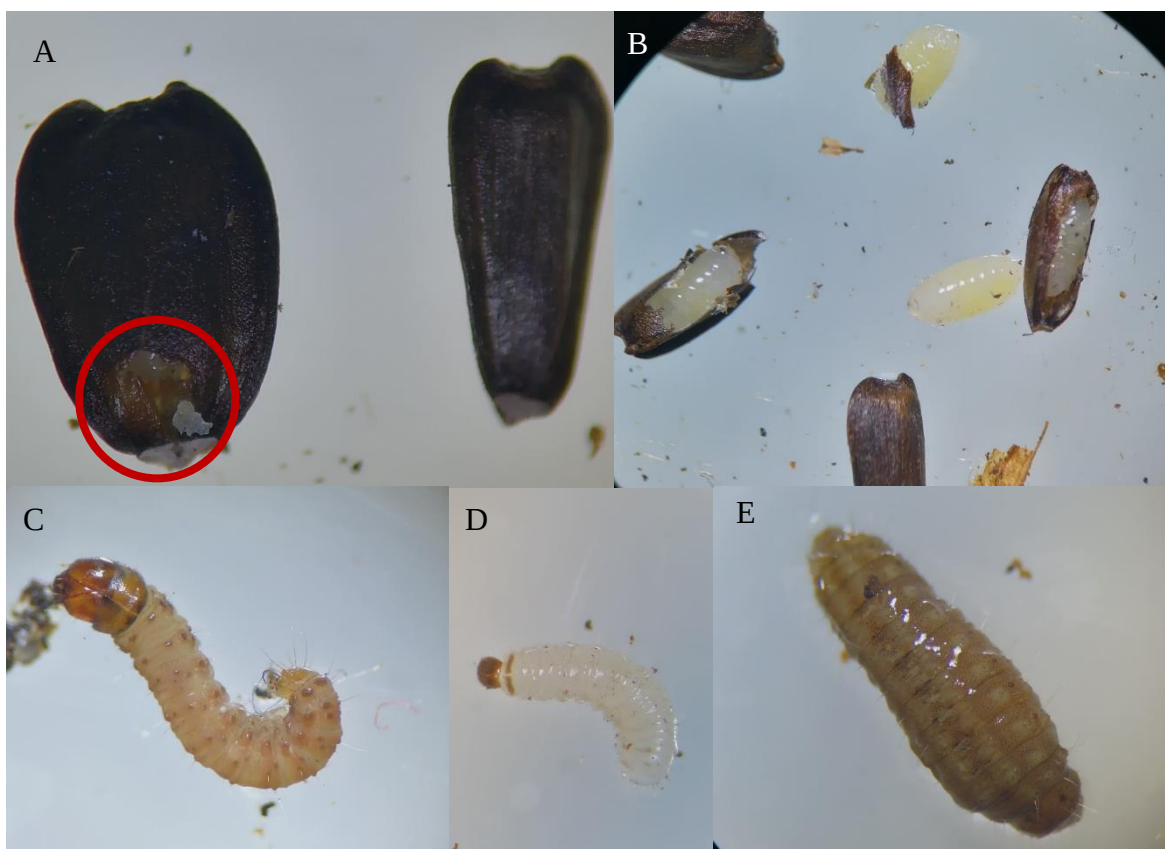


Figura 20 A) Presencia de depredación de las semillas de las semillas 1) semilla con tamaño inusual 2) Semilla de tamaño normal B) extracción de las larvas. C) larvas encontradas en los capítulos y dentro de las semillas)D y E)

En la primera etapa de selección y exploración de las semillas, se evidencio la presencia de larvas que consumían las semillas, se encontraron semillas inusualmente grandes(1) , que a simple vista no parecían estar afectadas, después de abrir varias semillas con estos tamaños, se procedió a realizar una pequeña abertura (1: círculo rojo) y así revisar si la semilla estaba parasitada o no, se extrajeron algunos organismos para observar que tipo de larvas eran, Suaza (2020) reporto la presencia de larvas de dípteros, coleópteros y lepidópteros en los aquenios e inflorescencias de *E. grandiflora* resaltando que en zonas de poca intervención antrópica las comunidades de artrópodos se ve beneficiada.

7.4. Evaluación de los tratamientos de germinación de las semillas de *E. grandiflora*

7.4.1. Primera Germinación: No inoculado

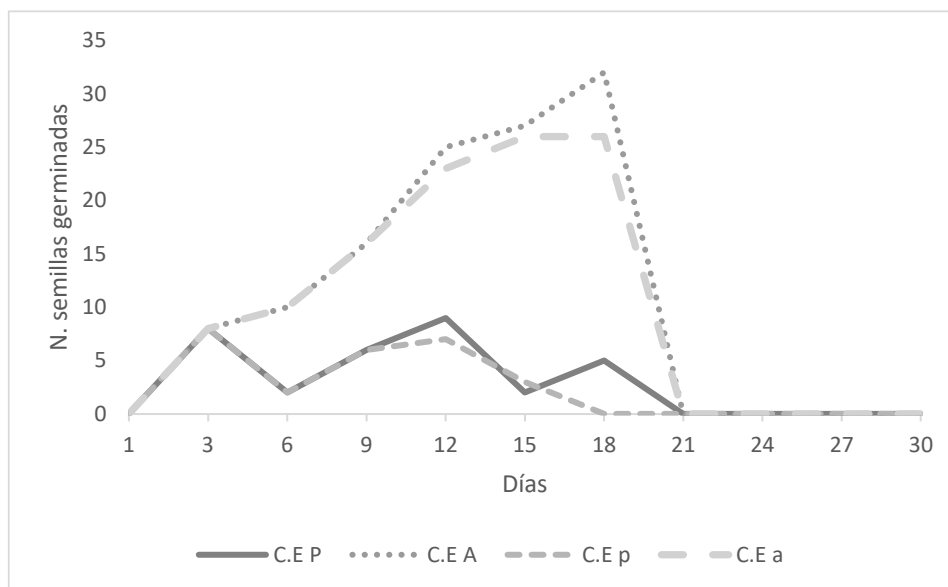


Figura 21 Numero de semillas germinadas en el primer tiempo de germinación comparación del conteo parcial y el conteo acumulado entre luz y oscuridad , La letra P y p corresponde a conteos parciales y la letra A y a corresponden a conteos acumulados, las líneas mas oscuras son de semillas sin luz y las líneas claras en semillas con presencia de luz

En el primer evento de germinación, la luz y la oscuridad fueron las variables determinantes Figueroa y Cárdenas (2015) resaltan factores importantes en la germinación de *E. grandiflora*, entre los cuales destacan la luz por ello las semillas se dispusieron en dos condiciones diferentes (luz y oscuridad) con y sin tratamiento pregerminativos de escarificación física, el número total de germinados en ambas condiciones no presenta diferencias estadísticamente significativas, sin embargo el porcentaje de germinación y los conteos totales era un factor a considerar, el cual para las semillas de oscuridad escarificadas fue del 74.29% y para la condición de luz fue de 91.43%, los conteos parciales de germinación también fueron mayores en luz dado estos porcentajes, por esta razón la segunda fase de germinación se dio únicamente en condiciones de luz.

7.4.2. Primera Germinación: Prueba de flotabilidad

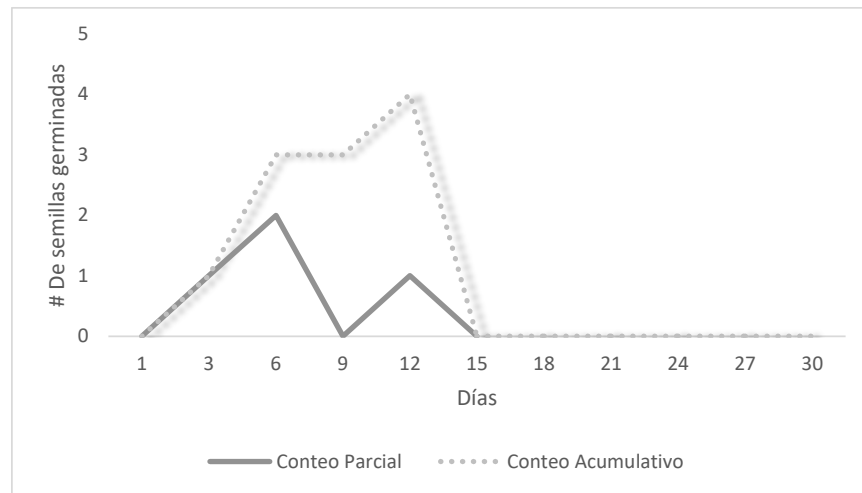


Figura 22 Numero de semillas germinadas Capitula (C) que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado

Tras realizarse la prueba de flotabilidad, de las 35 semillas se obtuvo una tasa de germinación del 11,43 % , se dio un retardo germinativo de 3 días, hasta el día 12 se evidencio germinación, con el pico de germinación en el 6 día.

7.4.3. Segunda Germinación: Prueba de flotabilidad

Se presentan curvas de germinación acumulada y parcial, de los veinte tratamientos probados en la segunda fase de germinación solo la mitad obtuvo germinación, los diez tratamientos restantes presentaron todas sus semillas en descomposición.

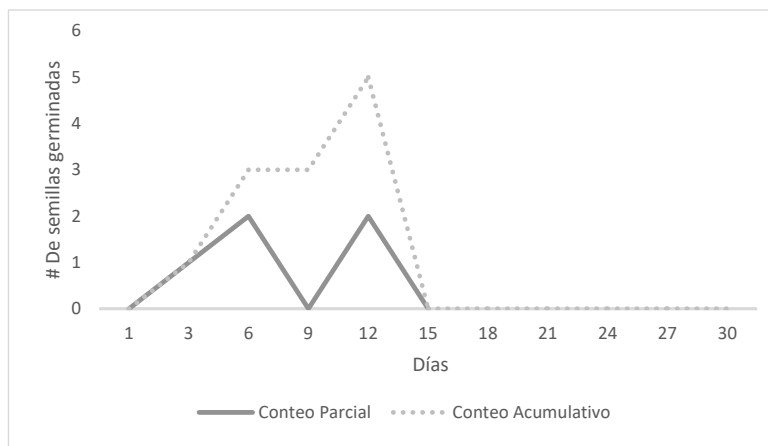


Figura 23 Numero de semillas germinadas Capitulo (C) post almacenaje que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado

La tasa de germinación para las semillas (C) que no pasaron la prueba de flotabilidad fue ligeramente superior 14.29 % que la misma prueba realizada hace un año , se dio un retardo germinativo de 3 días, hasta el día 12 se evidencio germinación, en el día 6 y 12 se dieron los picos de germinación.

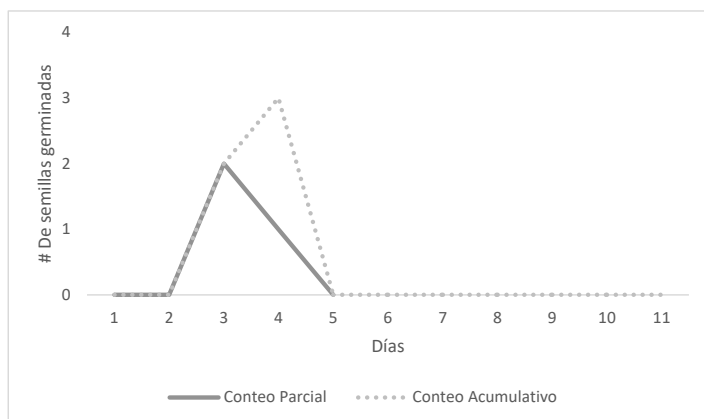


Figura 24 Numero de semillas germinadas Sobre (S) que no pasaron la prueba de flotabilidad, se muestran dos líneas, el conteo parcial y el conteo acumulado

La tasa de germinación para las semillas (S) que no pasaron la prueba de flotabilidad fue 8.57% , el valor más bajo entre las pruebas de flotabilidad, se dio un retardo germinativo de 3 días y se evidencio germinación hasta el quinto día, se dio el pico de germinación en el día 3.

7.4.4. Segunda Germinación: inoculados

La prueba ANOVA diferencias entre los grupos, sin embargo, el porcentaje de germinación fue mayor para Capitulo escarificado (C.E) 97.14 %, seguido por Capitulo 71.87% , Sobre escarificado (S.E) 51.43% y sobre (S) 62.86% . La prueba ANOVA entre todos los tratamientos que presentaron germinación (10) presentaron diferencias significativas, agrupando los tratamientos bacterianos en un sub conjunto esto debido al bajo número de semillas germinadas, los tratamientos control fueron agrupados en otro subconjunto. por último, lugar, los demás tratamientos no se tuvieron en cuenta ya que no presentaron porcentaje de germinación.

7.4.4.1. Tratamiento Capitulo (C)

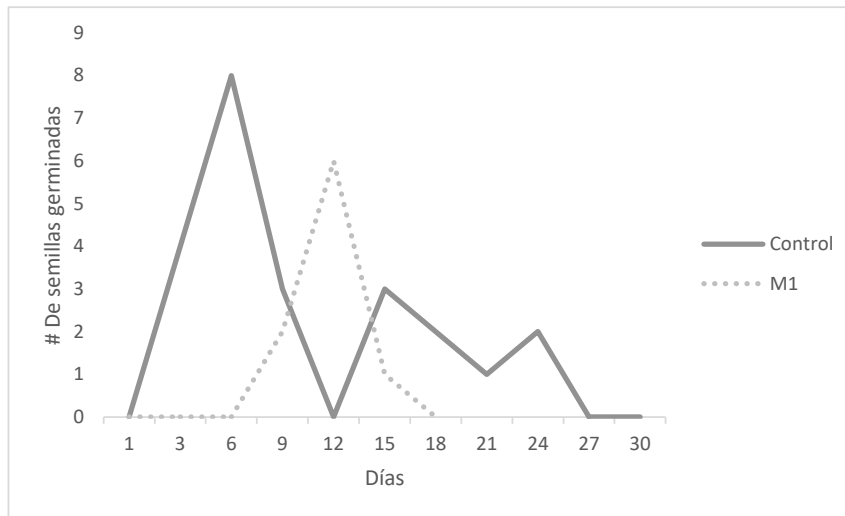


Figura 25 conteo parcial de germinación por las condiciones de semillas Capitulo (C), M1 y AB.

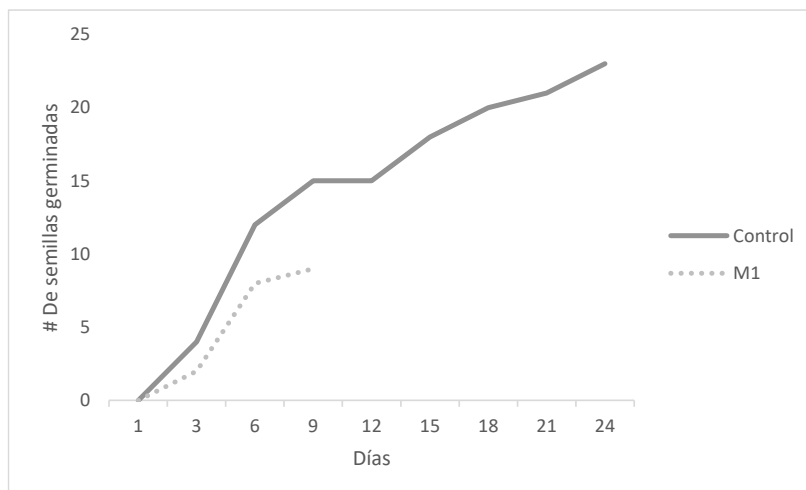


Figura 26 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones de semillas Capitulo (C), M1 y AB

La tasa de germinación para las semillas (C) como control fue del 71,87 %, para la germinación con el inoculo M1 fue de 25,71 %, para AB no se presentó ninguna germinación , el retardo germinativo fue de 3 días para (C) y 9 días para M1, los picos de germinación también estuvieron corridos, 6 días para (C) y 12 para M1

7.4.4.2. Tratamiento Capitulo Escarificado (C.E)

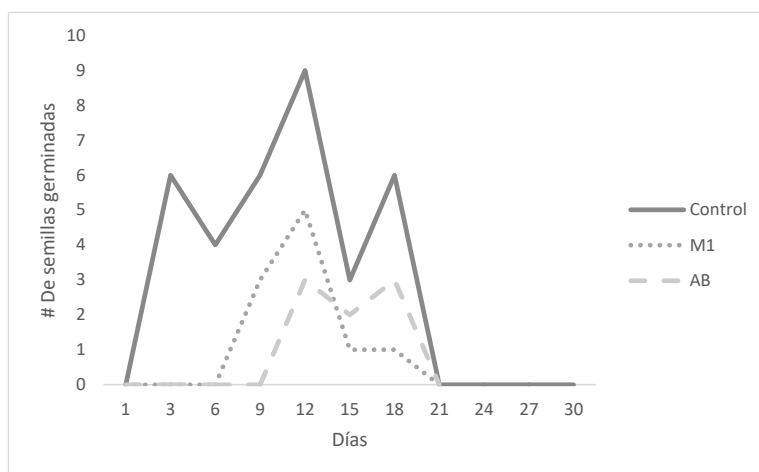


Figura 27 Conteo parcial de germinación por las condiciones de semillas Capitulo escarificado (C.E), C. M1 y C. AB

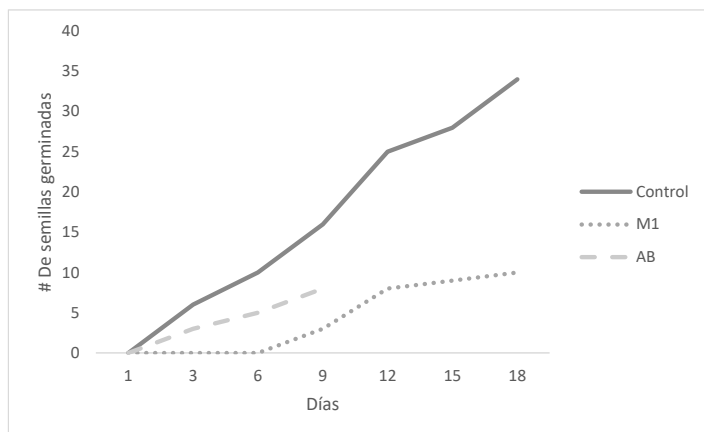


Figura 28 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas de Capitulo escarificado (C.E), C.E M1 y C.E AB

La tasa de germinación para las semillas (C.E) como control fue del 97,14% siendo el porcentaje más alto entre todos, para la germinación con el inoculo M1 fue de 28.57 %, para AB fue de 22.86%, el retardo germinativo fue de 3 días para (C.E) y 9 días para M1 y 12 días para AB , el pico de germinación de (C.E) fue de 12 días igual que M1, para AB fueron dos días el 12 y 18

7.4.4.3. Tratamiento Sobre (S)

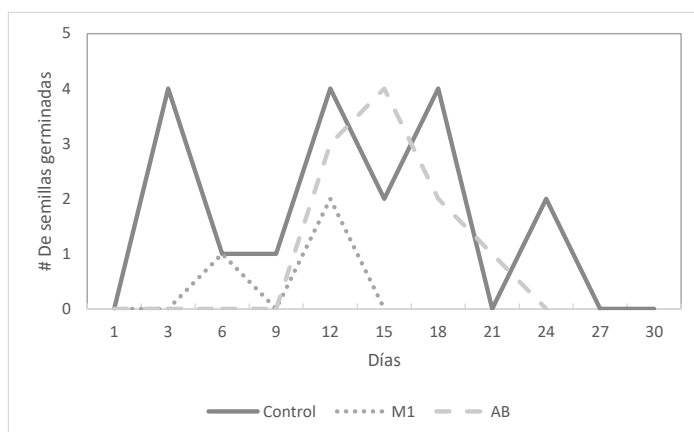


Figura 29 Conteo parcial de germinación por las condiciones semillas Sobre (S), M1 y AB

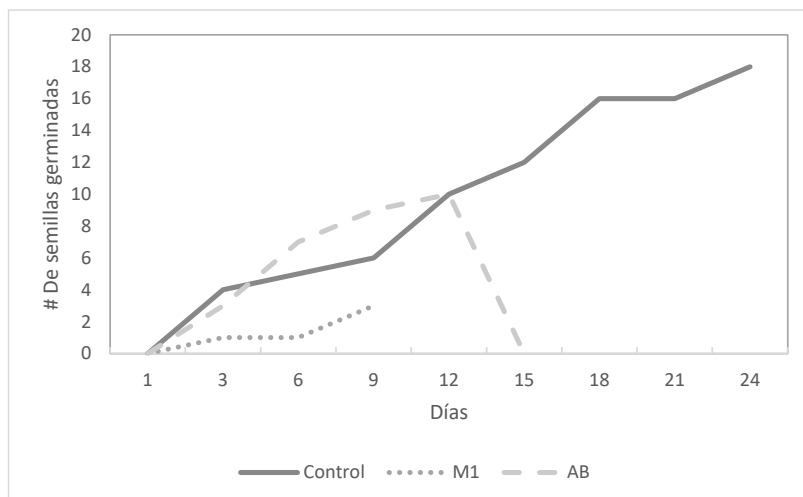


Figura 30 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas Sobre (S), S. M1 y S. AB

La tasa de germinación para las semillas (S) como control fue del 51.43%, para la germinación con el inoculo M1 fue de 8.57 %, para AB fue de 28.57%, el retardo germinativo fue de 3 días para (S), 6 días para M1 y 12 días para AB , el pico de germinación de (S) fueron tres: al día 3, al día 12 y al día 18, de M1 fue el día 12 y para AB fue el día 15

7.4.4.4. Tratamiento Sobre Escarificado (S.E)

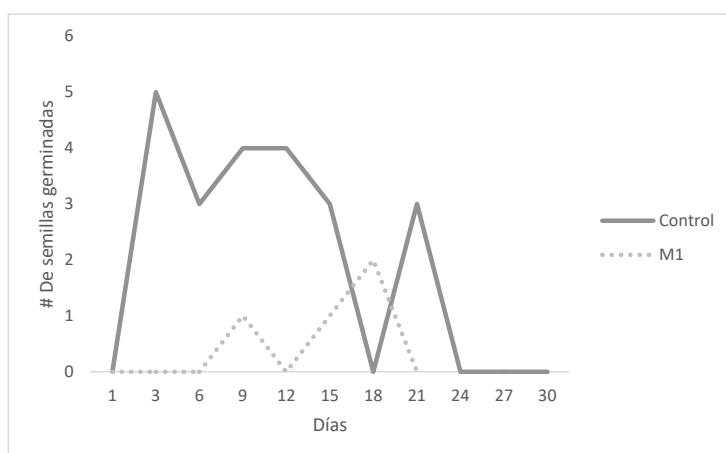


Figura 31 Conteo parcial de germinación por las condiciones semillas Sobre escarificado (S.E), M1 y AB

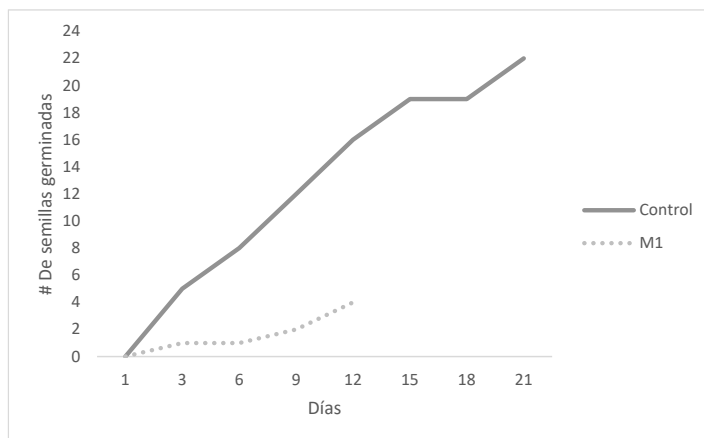


Figura 32 Conteo total de semillas germinadas por las condiciones semillas Sobre escarificado (S.E), M1 y AB

La tasa de germinación para las semillas (S.E) como control fue del 62.86%, para la germinación con el inoculo M1 fue de 11.43 %, AB no tuvo germinación el retardo germinativo fue de 3 días para (S.E), 9 días para M1. el pico de germinación de (S.E) fue le día 3 y para M1 fue el día 18. Ochoa en 1994, obtuvo porcentajes germinativos del 5% al 25% en *E. grandiflora*. Estos valores fueron muy inferiores a los obtenidos, ya que se alcanzó hasta un 97.14% de germinación en *E. grandiflora*, el retardo germinativo tuvo un tiempo mínimo de 3 días, esto quiere decir que las semillas tenían un tiempo de maduración adecuado, Moreno (2008) reportó una duración en el tiempo de germinación superior, pero in situ entre 11 a 53 días

Mancipe-Murillo (2020) encontró indicios de que las especies de *Espeletia* pueden ser de tipo ortodoxas, la semillas de *E. grandiflora* evaluadas en este estudio tuvieron un tiempo de almacenamiento considerable (1 año), en condiciones de escasa humedad antes de ser germinadas, lo que puede dar mayor fuerza a este supuesto, sin embargo, Mancipe- Murillo recomienda realizar ensayos de germinación con diferentes niveles de Humedad. Según Baskin

y Baskin (2001) comentan que lo más recomendable es aplicar los tratamientos poco después de colectadas las semillas, entre 7 a 10 días, ya que los procesos de germinación pueden empezar antes de finalizar la maduración de las semillas, o puede haber cambios en la respuesta a la germinación durante el almacenamiento en seco, en este trabajo donde los tiempos de germinación inicial no se vieron modificados por el tiempo de almacenamiento. Guariguata y Azócar (1988) encontraron que la mitad de las semillas de *Espeletia timotensis* conservan su viabilidad después de un año de enterradas, lo que les dio indicios que para esta especie existe algún tipo de latencia; controlando las condiciones de almacenamiento de las semillas *E. grandiflora* se presentó la misma viabilidad y capacidad germinativa pasado el año de almacenadas.

En definitiva, se obtuvo un porcentaje de germinación más alto (97.14%) que los reportados anteriormente por otros autores en *Espeletia* spp. 13.6 % Tintinago (2019), Maldonado (2016) 50% usando medios enriquecidos, 19.4 % Gallego (2014), 12% Moreno (2018) en *E. grandiflora*, Mancipe-Murillo (2020) del 48%

Los porcentajes de germinación con las bacterias inoculadas fueron bajos comparados con los controles, para capitulo escarificado morfotipo 1 (C.E M1) fue el más alto 28,57 %, donde el control (C.E) también corresponde al valor más alto 97.14%, seguido del control Capitulo (C) 71,87% el valor más bajo fue 8.57 % que también corresponde al morfotipo bacteriano M1 con el tratamiento de sobre (S. M1) , el tratamiento control Sobre (S) tuvo el porcentaje de germinación mas bajo entre los controles 51.43 %, seguido de sobre escarificado (S.E) con 62.86 %.

Rueda-Puente (2009) obtuvo una mejoría en la germinación de semillas de especies de la familia Asteraceae usando *Azospirillum* sp, Dobbealaeres *et al.*(1999) demostraron que *A. brasilense* tiene un efecto benéfico en varias especies en las etapas de germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas, Díaz *et al* (2001) reportó un incremento del 36.5% en la germinación de semillas de lechuga al usa inóculos de bacterias promotoras del crecimiento. Bashan y Levanovy (1991) mencionan diversos parámetros que mejoran al usar *Azospirillum* tales como la germinación temprana y alta tasa de germinación. Estos resultados contrastan los obtenidos en el presente trabajo donde *Azospirillum* no tuvo buenos porcentajes de germinación , y las semillas que no lograron germinar en los tratamientos de inóculos entraron en un estado de descomposición. Este resultado desfavorable puede ser explicado según Bashan (1996) cuando *Azospirillum* se encuentra en concentraciones iguales o superiores a 1×10^8 - 10^{10} ufc/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular, es decir un inoculo debe cumplir con una adecuada concentración bacteriana que difiere entre especies vegetales, además de cumplir con un correcto almacenamiento (Bashan, 1998).

7.5 Prueba de viabilidad de Tetrazolio (TZ)

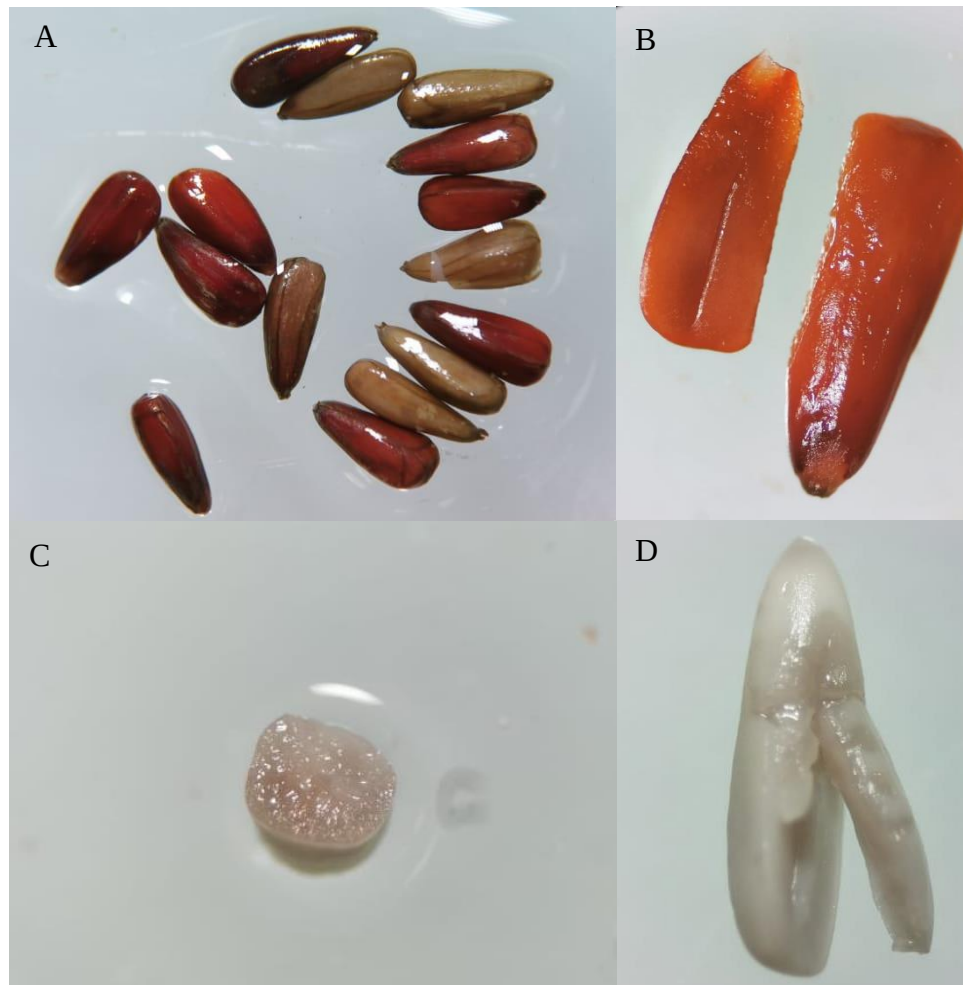


Figura 33 Prueba de viabilidad por tetrazolio A) semillas después de sumergidas en tetrazolio B) semilla viable con un corte longitudinal, cotiledones separados C) semilla inviable con un corte transversal D) semilla inviable vista lateral.

Al observar las semillas no teñidas y teñidas, en *E. grandiflora* no es posible identificar las estructuras germinativas como lo describió Mancipe-Murillo, además de no poseer endospermo, Gallego y Bonilla (2016) hablan de una testa muy frágil en *Espeletia uribei*, contrario a lo observado, la testa de *E. grandiflora* es resistente e impermeable cuando las semillas están recién colectadas, estas propiedades se pierden con transcurso del tiempo, como se evidencio el porcentaje de semillas teñidas recién colectadas no llego ni al 10%, resultado

contrastado con un 82% de semillas teñidas después del periodo de almacenamiento, condición que puede ser explicada según Velasco (2018), ya que especies de *Espeletia* son pioneras después de disturbios, necesitando resistencia para soportar las condiciones iniciales de establecimiento, en espera a que se dé el momento propicio para germinar

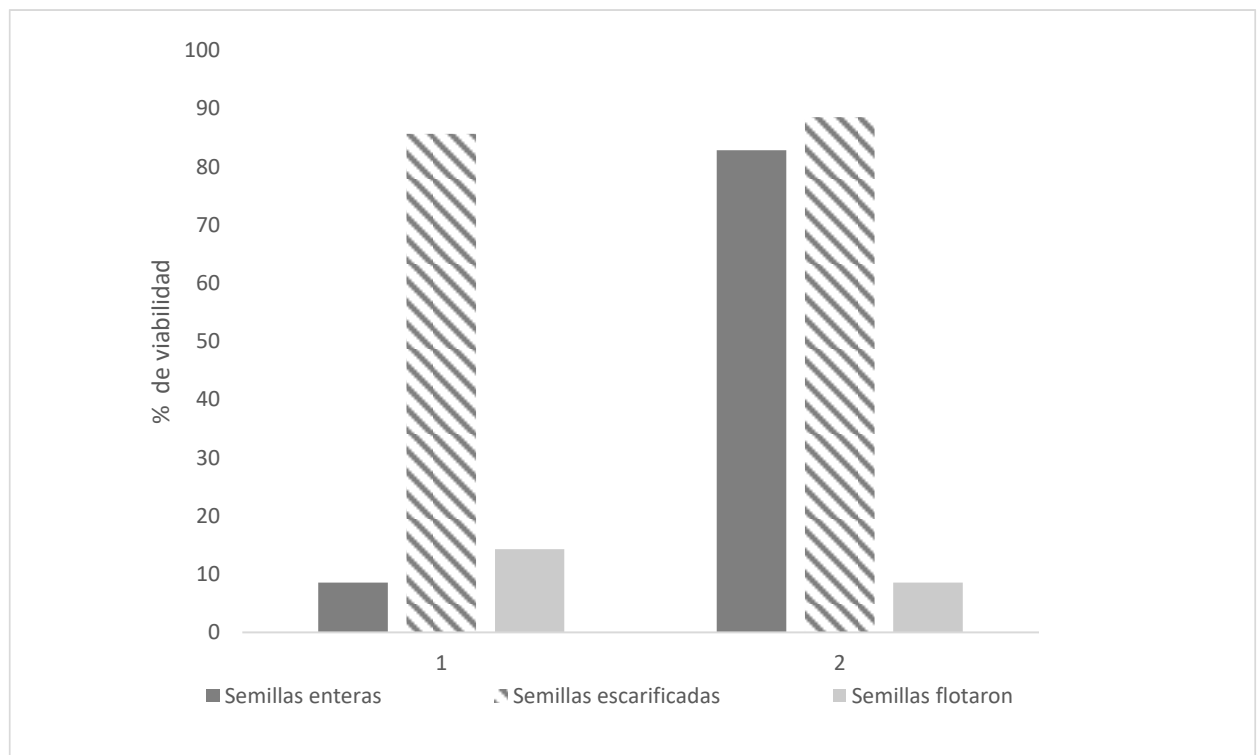


Figura 34 Prueba TZ de los lotes a germinar. 1) corresponde a la prueba TZ 1 antes de la primera germinación de las semillas 2) Corresponde a la prueba TZ 2 antes de la segunda germinación.

La prehumidificación (Gilles A, 2007) , proceso por el cual se busca reblandecer las cubiertas de las semillas haciendo más cómodo y precisos la perforación, los cortes, permitiendo de esta forma la adecuada penetración del tetrazolio, además la humidificación promueve la actividad de los sistemas enzimáticos, el incremento de la actividad del embrión

aumentando la afinidad de la tinción. Sin embargo, en el caso de semillas débiles, es necesario reducir el tiempo de humidificación para reducir el excesivo deterioro de los tejidos. En el estudio la prehumidificación equivale a la prueba de flotabilidad, la cual resulto insuficiente cuando las semillas están recién colectadas, ya que la impermeabilidad de la testa no se vio afectada por el agua, cuando las semillas cumplieron un año de germinadas, la impermeabilidad ya no fue un factor limitante para la tinción de tetrazolio y la germinación.

Para TZ es necesario acondicionar la semilla para garantizar la penetración de la sal con los tejidos (Milošević, et al.,2010), por ello Mancipe- Murillo y colaboradores (2018) indican que para *Espeletia* el procedimiento tan solo es necesario hacer una pequeña ruptura, además de la rotura de la testa esto explica que las semillas recién colectadas y no escarificadas no presentaran coloración en sus tejidos, dando un indicio de lo impermeable que puede ser la testa en *Espeletia grandiflora*.

En un estudio de viabilidad de *Espeletia curialensis* Velasco(2018), reporto un alto porcentaje de viabilidad con la prueba de tetrazolio (100 , 87 y 65 %), para *E. grandiflora* se obtuvieron hasta el 88 % (T2) de viabilidad siempre y cuando las semillas pasaran por el proceso mecánico de escarificación. Moreno (2008) obtuvo porcentajes inferiores de viabilidad para *E. grandiflora* del 80%

7.5.1 Prueba de viabilidad de Tetrazolio de las semillas no germinadas

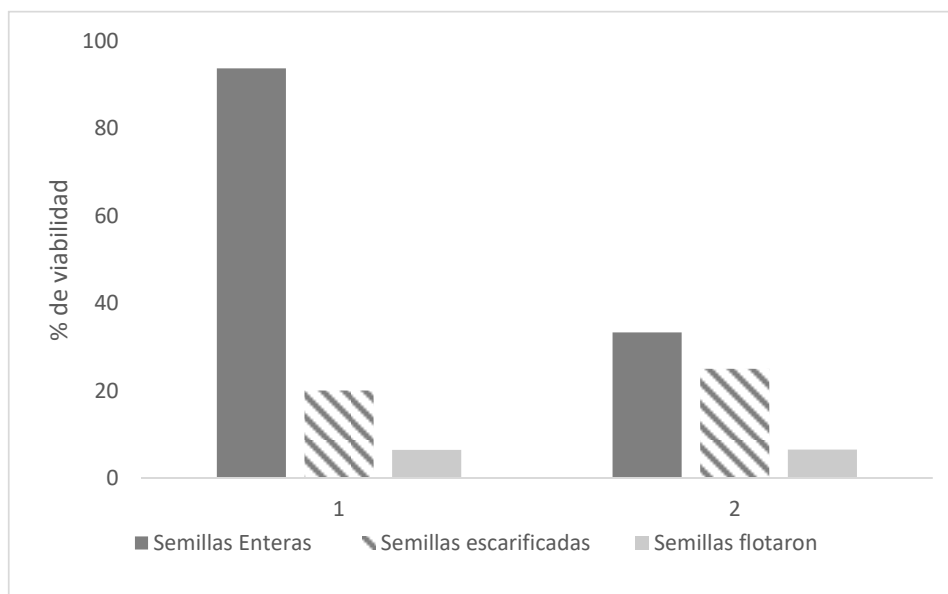


Figura 35 Prueba TZ a las semillas no germinadas, concluido el experimento de germinación 1) corresponde a la germinación recién colectadas las semillas 2) corresponde a la germinación pasado 1 año de su almacenamiento

La prueba TZ a semillas no germinadas también evidencio la impermeabilidad de las semillas cuando están recién colectadas, esto explica el 93.75% de viabilidad que corresponden a 30 de 32 semillas enteras provenientes de la primera germinación, a estas semillas se les rompió la testa para verificar porque no habían germinado, este resultado contrasta el menor porcentaje de semillas no germinadas enteras en la segunda germinación el cual llego a 33.3% de semillas y que corresponde únicamente a 3 de 6 semillas no germinadas eran viables. En las semillas de *Ruta montana* el Test de TZ subestima la viabilidad ligeramente ya que se obtuvieron porcentajes de germinación superiores a los porcentajes de viabilidad, para *E. grandiflora* la permeabilidad causo que el test TZ subestimara el % de viabilidad antes de su germinación, datos que fueron contrarrestados por la prueba finalizado el tiempo de

germinación. Otra razón por la cual las semillas que no tenían latencia física y al quitar su testa no germinaron, pero se tiñeron es que TZ da positivo para semillas inmaduras debido a que las células están vivas pero la semilla no es germinable (Schmidt, 2000)

Las semillas no germinadas de los inóculos bacterianos M2 y M3 no se les pudo hacer la prueba TZ ya que todas estas semillas presentaron putrefacción.

7.5.2 Prueba de viabilidad de Tetrazolio comparado con el porcentaje de germinación

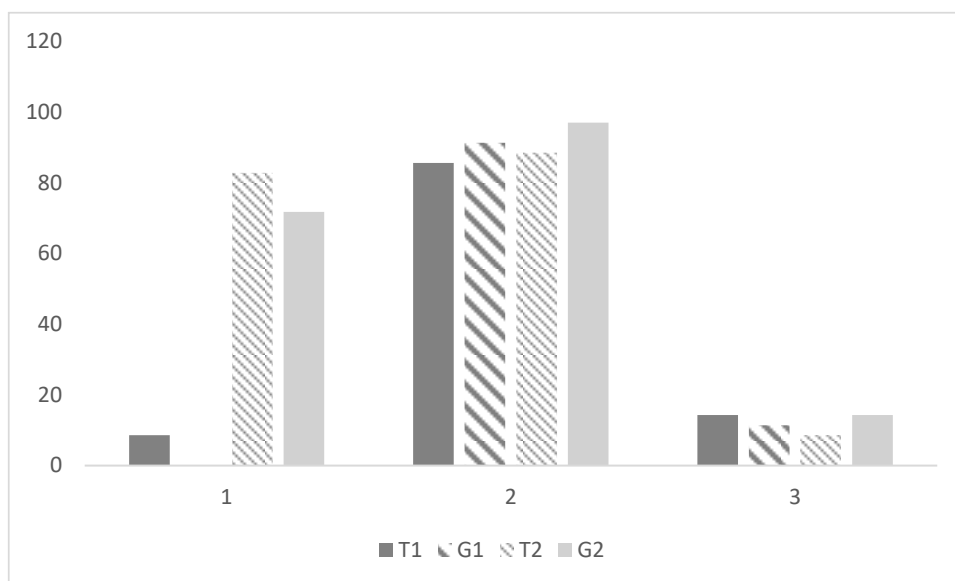


Figura 36 Comparación entre el porcentaje de germinación y el porcentaje de viabilidad TZ 1) corresponde a semillas enteras decantadas 2) corresponde a semillas escarificadas decantadas 3) semillas que flotaron, T1 corresponde a prueba TZ en tiempo 1 , T2 a prueba TZ en tiempo 2 , G1 a la primera germinación y G2 a la segunda germinación.

Los porcentajes de germinación y viabilidad se comportan de igual manera las pocas semillas teñidas en el tratamiento y la nula germinación, evidencian una dormancia por una barrera física, lo que corresponde a una testa impermeable cuando las semillas están recién colectadas, ya que el tiempo debilita la testa de las semillas permitiendo su tinción y germinación aunque no se hubieran escarificado, Moreno (2008) menciona que *E. grandiflora* está adaptada al páramo lluvioso y que requiere condiciones como la humedad para interrumpir la dormancia de sus semillas.

8. Conclusiones

La mejor forma de almacenar semillas de *E. grandiflora* es con los capítulos enteros en bolsas de papel, se demostró que un año después las semillas tienen la misma viabilidad y presentan los mas altos porcentajes de germinación cuando se acompaña de una escarificación.

La escarificación da mejores porcentajes de germinación junto a el almacenamiento con el capítulo C.E 97.14 % y Sobre S.E 62.86%

La prueba de flotabilidad, aunque no es un paso obligado, se recomienda ya que elimina las semillas inviábiles, a pesar de que las semillas de *E. grandiflora* son tan pequeñas y ligeras , la prueba da buenos resultados ya que se evidenciaron porcentajes bajos (11.43% ,8.57 %y 14.29%) de germinación.

Para este trabajo, los inóculos bacterianos no influyeron de manera positiva en la germinación de semillas de *E. grandiflora*, por el contrario, provocaron que las semillas no germinadas entraran en procesos de putrefacción

9 recomendaciones

Es necesario para futuros estudios evaluar el efecto de la presencia de insectos y diferentes etapas del ciclo de vida en los capítulos, semillas y demás estructuras de *E. grandiflora* con el objetivo de identificar las repercusiones o función que cumple esta relación de especies.

Para usar *A. brasilense* en semillas de *E. grandiflora* es necesario hacer ensayos con diferentes concentraciones y diferentes técnicas de inoculación

La continuidad a este trabajo se puede dar mediante pruebas de desarrollo y crecimiento en las plántulas de *E. grandiflora*

Medir la eficacia de más grupos funcionales aislados de la rizosfera de *E. grandiflora* combinando los inóculos entre sí en pruebas de germinación para *E. grandiflora*

Además de las pruebas de viabilidad de tetrazolio y flotabilidad implementar las pruebas de Catalasa, Test de Electrolitos o Conductividad

10 Bibliografía

Arriaga, V.; Cervantes, V.; Vargas-Mena, A. 1994. Manual de reforestación con especies nativas. Secretaria de Desarrollo Social, Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 186 pp.

Bachetta, G., Bueno, A., Fenu, G., Jimenez, B., Mattana, E., Piotto, B., y Virevaire, M. (2008). Conservación ex situ de plantas silvestres. La Caixa, Principado de Asturias

Bashan, Y., Trejo, A. and de-Bashan, L., 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8), pp.963-969.

Bashan, Y., de-Bashan, L., Prabhu, S. y Hernandez, J. (2013). Avances en la tecnología de inoculantes bacterianos que promueven el crecimiento de las plantas: formulaciones y perspectivas prácticas (1998-2013). *Planta y suelo* , 378 (1-2), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2001). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, California: Academic Press.

Bashan Y, Holguin G. (1998) PROPOSAL FOR THE DIVISION OF PLANT GROWTHPROMOTING RHIZOBACTERIA INTO TWO CLASSIFICATIONS:

BIOCONTROL-PGPB (PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA) AND PGPB Mexico. DOI: 10.1016 / s0038-0717 (97) 00187-9.

Bashan, Y, y Levanony, H. (1991). Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 137: 99-103

Bohórquez-Quintero, M. A., Araque-Barrera, E. J., & Pacheco-Maldonado, J. C. (2016). Propagation in vitro of *Espeletia paipana* S. Díaz and Pedraza, a critically endangered endemic frailejon. *Actualidades Biológicas*, 38(104), 23-36.

Cabrera, M., & Ramírez, W. (Edits.). (2014). Restauración ecológica de los paramos de Colombia: Transformación y herramientas para su conservación. Bogotá, D.C: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Calderón, E., Galeano, G., & García, N. 2005. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 2: Palmas, Frailejones y Zamias. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt. Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia–Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 454 pp

Carrillo, A., Puente, M., Castellanos, T., & Bashan, Y. (1998). Aplicaciones biotecnológicas de Ecología Microbiana. Manual de laboratorio.

Cleef, A. M. (2013). Origen, evolución, estructura y diversidad biológica de la alta montaña colombiana. En J. Cortés-Duque, C. E. Sarmiento Pinzón, & A. P. Suárez Mejía (Eds.), *Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos* (pp. 3-21). (Contribución Instituto de

Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; N.º 488). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Collins CH Lyne P. (1989), Microbiological methods. 6th ed. Londres; Butterworth

Collins CH Lyne P. (2004), Microbiological methods. 8th ed. Londres; Butterworth.

p.90

Côme, D. (1970). Les obstacles a la germination. Masson, París

CORPOBOYACÁ. (2010). Corpoboyacá - Corporación Autónoma Regional de Boyacá. Plan de manejo Parque natural regional unidad biogeográfica Siscunsi – Ocetá

Díaz V., P.; Ferrara C., R.; Almaraz S., J.; Alcantar G., G. (2001). Inoculación de

bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra 19:327-335.

Dobbelaeres A. A Thys, S Vande. J Vanderleyden. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant and Soil. 212, 155-164.

Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Cultivos tropicales, 31(1), 00-00.

Figuerola K. y Cárdenas J. (2015) Aspectos de la propagación sexual de *Espeletia grandiflora* en un sector intervenido del páramo de Chisacá (P.N.N Sumapaz, Colombia)

Gallego, A. & Bonilla, M. (2016). Caracterización de micrositios para el establecimiento de plántulas de *Espeletia uribei* (Asteraceae). Acta Biológica Colombiana.

Gallego Maya, A. M. (2014). Oferta de semillas, germinabilidad y micrositios de establecimiento de *Espeletia uribei* Cuatrec. 1978. en el Parque Nacional Natural Chingaza – Cundinamarca (tesis de maestria). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Gilles Adamas 2007 GERMINACIÓN, VIGOR, VIABILIDAD, CALIDAD Y MEJORA DE SEMILLAS DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.) Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España

Gold, K., León-Lobos, P., Way, M. (2004). Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para la conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile. Boletín INIA N° 110, 62.

Guariguata, M. R., & Azocar, A. (1988). Seed bank dynamics and germination ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an andean giant rosette. Biotropica, 20(1), 54.

Hernández, J. V. (2005). Manual de laboratorio: utilización biotecnológica de microorganismos benéficos. Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste, S.C., Dirección de posgrado , La paz. México.

Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A. & Cerra, M. 2014. Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. UICN, Quito, Ecuador.

Holguin, G., Bashan, Y. and Ferrera-Cerato, R. 1996. Interactions between plants and beneficial microorganism: III. Methodsfor isolation and characterization of mycorrhizal fungi and plant growth-promoting microorganisms.

Körner, C. (2003). Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems (2nd ed.). Berlin, Alemannia: Springer-Verlag.

ISTA (1993). International Rules for Seed Testing Association. Edition 1993/5: 1200 copies. Zürich. ISBN: 3-906549-27-5./9ty|62

ISTA. (2003). Working Sheets on Tetrazolium Testing. Agricultural, Vegetable and Horticultural Species. International Seed Assosiation, 176pp.

Kopler, J.; Lifshitz, R., and Schroth, M. 1988. Pseudomonas inoculants to benefit plant production. In: ISI. Atlas of Sciences: Animal and Plant Sciences.

Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Plant growth-promoting bacteria in association with graminaceous species: A review. Terra: Órgano Científico de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, AC.

Levanony, H., & Bashan, Y. (1989). Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Botany, 67(7), 2213-2216.

Mancipe-Murillo, C. (2020). Propagation of *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis*, and *Espeletia killipii* in greenhouse conditions. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 44(172), 780-793.

Mendoza Arias, A.L., Martínez, J. E. (2011). Propagación, adaptación y crecimiento del frailejón "*Espeletia conglomerata*" en vivero (tesis de especialización). Universidad Pontificia Bolivariana. Bucaramanga, Colombia.

Mirza, M., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., Bally, R. y Malik, K. (2006). Caracterización molecular y detección por PCR de una cepa de *Pseudomonas* fijadora de nitrógeno que promueve el crecimiento del arroz. *Biología y fertilidad de suelos* , 43 (2), 163-170.

Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, E., Pedraza, C., . . . Cárdenas, L. (2007). Atlas de páramos de Colombia. Bogotá, D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Alexander von Humboldt.

Moreno, L.A. 2008. Estrategias de Reclutamiento de *E. killipii* y *E. grandiflora* en el Parque N. N. Chingaza. Trabajo de Grado, Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Okon, Y., Albrecht, S., & Burris, R. (1977). Methods for Growing *Spirillum lipoferum* and for Counting It in Pure Culture and in Association with Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 85-88. doi: 10.1128/aem.33.1.85-88.1977

Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., ... & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 11(2), 155-164.

Rangel Churio, O. (2000). Colombia, diversidad biótica III la región de vida paramuna. Bogotá, Colombia: Instituto de ciencias naturales, Universidad Nacional de Colombia.

Rincón, L. N. (2015). Los páramos en Colombia, un ecosistema en riesgo. Ingeniare. Universidad Libre Barranquilla, 127-136 .

Rojas Rojas, J., Varela Ramírez, A., & Osher Altsjor, K. (2018). Plan de Conservación y Manejo de las especies de freilejones presentes en el territorio CAR. Bogotá.

Sarmiento Pinzón, C., Cadena Vargas, C., Sarmiento Giraldo, M. and Zapata Jiménez, J., 2013. Aportes A La Conservación Estratégica De Los Paramos De Colombia. Bogotá.

Rueda-Puente, Edgar O., & Villegas-Espinoza, Jorge A., & Gerlach-Barrera, Luis E., & Tarazón-Herrera, Mario A., & Murillo-Amador, Bernardo, & García-Hernández, José Luís, Y Troyo-Diéguez, Enrique y Preciado-Rangel, Pablo (2009). EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Salicornia bigelovii*. Terra Latinoamericana.

Salazar, J. C., & Luters, A. (2000). Soil Quality Test Kit Guide. Argentina.

Schmidt, L. (2000). Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Humlebaek, Denmark: Danida Forest Seed Centre.

Suaza E. V. (2020) CARACTERIZACIÓN DE LOS RASGOS DE HISTORIA DE VIDA DE *Espeletia grandiflora* Y LOS GRUPOS FUNCIONALES DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS Y FIJADORAS DE NITRÓGENO, ASOCIADOS AL SUELO DE UNA ZONA CONSERVADA E INTERVENIDA DEL PARQUE NATURAL REGIONAL SISCUNSI- OCETÁ. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Szymanska, S., Baum, C., Vogts, A. and Hryniewicz, K. (2017) High tolerance of salt stress in the nitrogen fixation of *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from roots of the halophyte. *Salicornia europaea* L.

Tintinago Majin, N. (2019). Evaluación de cuatro sustratos de tipo tradicional en la reproducción del frailejón (*Espeletia hartwegiana*) en vivero, para el repoblamiento en el páramo de barbillas, Pancitará-Cauca (tesis de maestría). Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.

Varela, S. A., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistemas Forestales Integrados*, 3, 1-10.

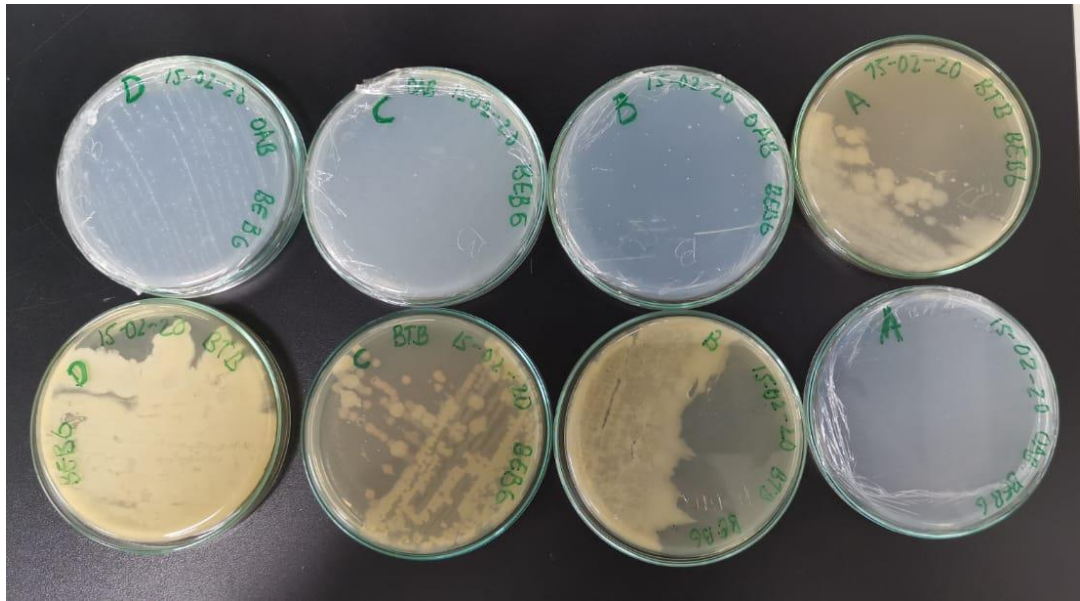
Vargas, O. y Pérez-Martínez, L. V. (Eds.). (2014). Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Grupo de Restauración Ecológica. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

Velasco, V.M. (2018). Biología reproductiva de una población *Espeletia curialensis* var. *Exigua* Rodr.-Cabeza y S. Díaz (cordillera Oriental, Colombia). Tesis de maestría. Manejo, uso y conservación del bosque. Universidad Distrital de Colombia.

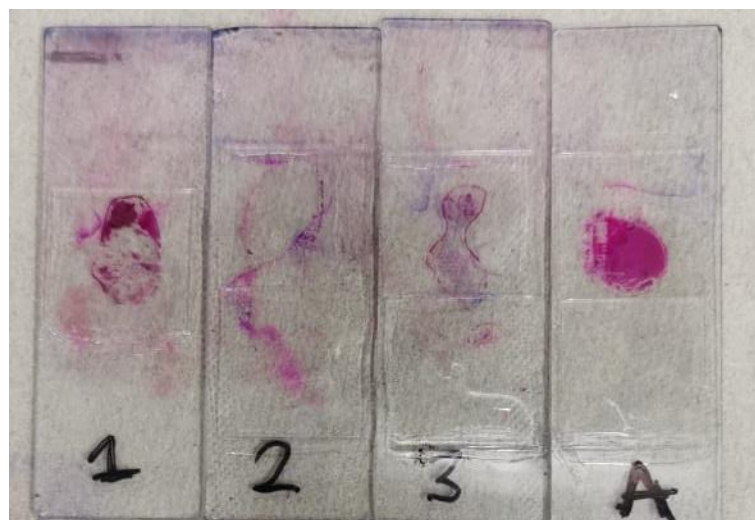
11 Anexos

SOLUCION	GRAMOS POR 995 ml		GRAMOS POR 497.5 ml	
KOH	4.8		2.4	
Acido málico	5		2.5	
NaCl	1.2		0.6	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25		0.125	
K ₂ HPO ₄	0.13		0.065	
CaCl ₂	0.22		0.11	
K ₂ SO ₄	0.17		0.085	
Na ₂ SO ₄	2.4		1.2	
NaHCO ₃	0.5		0.25	
Na ₂ CO ₃	0.09		0.045	
Fe(III)EDTA	0.07		0.035	
STOCK	Gr./L	ml/L	Gr./L	ml/L
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0.0002	1	0.0002	0.5
H ₃ BO ₃	0.0002	1	0.0002	0.5
ZnCl ₂	0.00015	1	0.00015	0.5
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.00002	1	0.00002	0.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.002	1	0.002	0.5

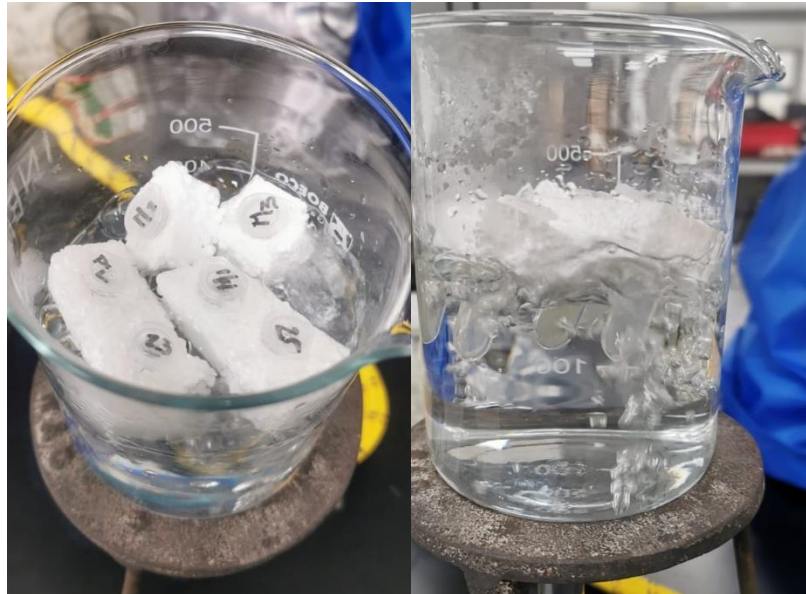
Anexo 1 Formula de preparación del medio OAB para bacterias fijadoras de nitrógeno.



Anexo 2. Repiques bacterianos en medios OAB y BTB) previos a los inóculos finales.



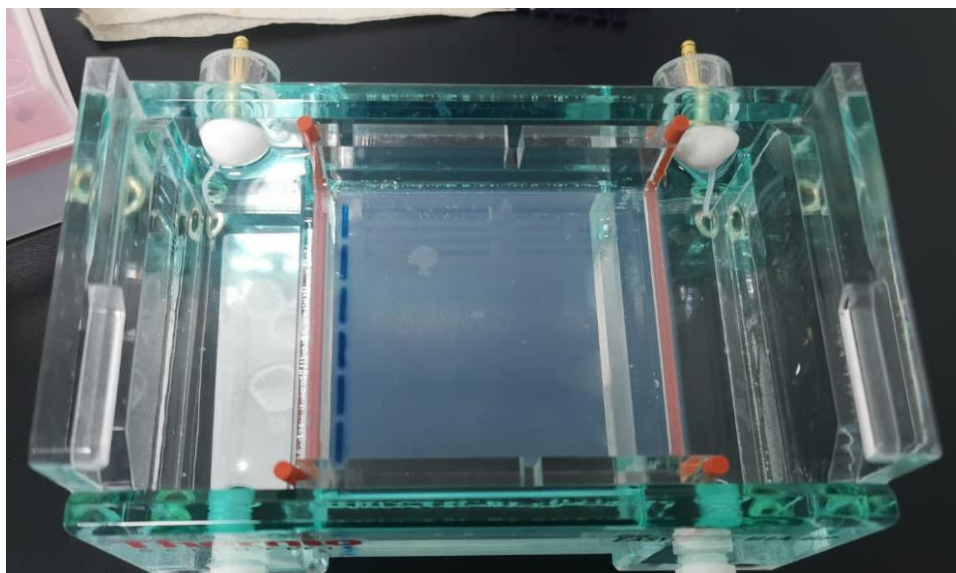
Anexo 3 Morfotipos fijados y teñidos con tinción de Gram.



Anexo 4 Extracción de ADN tratamiento térmico de extracción para bacterias



Anexo 5 Botón de *Azospirillum brasilense* celular obtenido por centrifugado



Anexo 6 Cámara de electroforesis con el gel y las muestras cargadas.



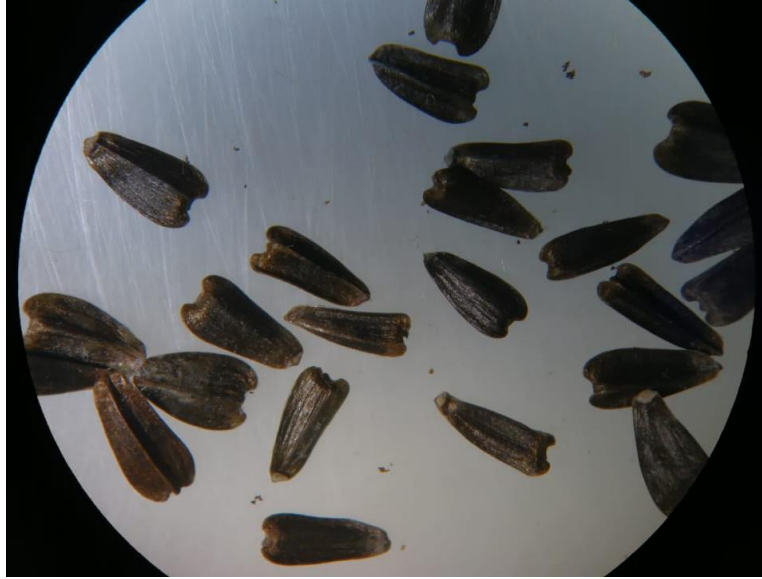
Anexo 7 Fuente de alimentación básica PowerPac™



Anexo 8 C1000 Touch™ Thermal Cycler - BioRad

La desnaturalización inicial es de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos que consisten en desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 60°C durante 30 segundos y elongación a 72°C por 5 minutos. Para terminar la extensión se realizó a 72°C por 5 minutos. Después de retirar las muestras fueron guardadas a -20°C.

Anexo 9 Protocolo NifH



Anexo 10 Observación y selección de semillas de *E. grandiflora*



Anexo 11 Lote de semillas *E. grandiflora*



Anexo 12 Prueba de flotabilidad de semillas *E. grandiflora*



Anexo 13 Semillas escarificadas de *E. grandiflora*