



Determinación de un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador

Santillán Arias, Michelle Estefany

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

28 de enero del 2022

Resultado del Análisis de Copyleaks



Tesis Santillan Michelle para copyleaks.docx

Scanned on: 13:51 January 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found

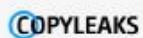


Total Words in Text

Identical Words	73
Words with Minor Changes	14
Paraphrased Words	148
Ommited Words	0



Report generated by:
MARIA CLAUDIA
SEGOVIA
SALCEDO



Website | Education | Businesses



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Determinación de un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador**” fue realizado por la señorita **Santillán Arias, Michelle Estefany** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de enero del 2022



Firmado electrónicamente por:
**MARIA CLAUDIA
SEGOVIA
SALCEDO**

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

C. C.: 1709055998



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Santillán Arias, Michelle Estefany** con cédula de ciudadanía n° 1720023108. declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Determinación de un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolauí. 28 de enero del 2022

Santillán Arias, Michelle Estefany

C.C.: 1720023108



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Autorización De Publicación

Yo, **Santillán Arias, Michelle Estefany**, con cédula de ciudadanía n° 1720023108 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Determinación de un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 28 de enero del 2022

Santillán Arias, Michelle Estefany

C.C.: 1720023108

Dedicatoria

A mi padre Guido Santillán, mi madre Ritha Arias y a mi hermano Guido Vinicio Santillán por ser mi apoyo incondicional, por estar a mi lado y velar por mi formación académica. Todos mis logros siempre serán dedicados a ustedes por todo su esfuerzo y amor.

Michelle Estefany Santillán Arias

Agradecimientos

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis amigas y amigos que me han acompañado durante años, por brindarme su amistad sincera llena de risas y enseñanzas.

A la Dra. María Claudia Segovia del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por permitirme ser parte del proyecto, por las incontables enseñanzas, consejos, reflexiones, ánimos, risas y demás apoyo brindado durante estos años.

A la MSc. Ana Gabriela del Hierro del Instituto Nacional de Biodiversidad -INABIO, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar mis habilidades de investigación contribuyendo a mi formación profesional.

A todas mis compañeras del proyecto BIO-GEEC por ser mi ancla en todos los momentos difíciles.

Índice de Contenido

Resultado del Análisis de Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización De Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	11
Abreviaturas.....	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I : Introducción.....	15
Antecedentes	15
Justificación o Importancia del Problema a Resolver	15
Objetivos.....	16
Objetivo General:.....	16
Objetivos Específicos	16

Capítulo II : Marco Teórico.....	17
Los Páramos, Ecosistemas Menospreciados y Amenazados	17
Características Generales de los Páramos	17
Relevancia de los Páramos Como Ecosistema	17
Actividades que Amenazan a los Páramos	18
Rosaceae, una Familia Vegetal Representativa de los Páramos.....	19
Generalidades de la Familia Rosaceae.....	19
Generalidades del Género Lachemilla (Focke) Rydberg	19
Importancia de las Especies de Lachemilla (Focke) Rydberg de Estudio	20
Descripción de Lachemilla hispidula (L.M. Perry) Rothm.	20
Descripción de Lachemilla holosericea (L.M. Perry) Rothm.	21
Descripción de Lachemilla mandoniana (Wedd.) Rothm.	21
Descripción de Lachemilla nivalis (Kunth) Rothm.....	21
Cultivo de Tejidos Vegetales.....	21
Hipótesis	22
Capítulo III : Metodología	23
Recolección y Tratamiento Preliminar del Material Vegetal	23
Identificación de las Especies.....	23
Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas.....	23
Pruebas de Viabilidad de las Semillas	24

	10
Pruebas de Desinfección de Semillas.....	24
Pruebas de Germinación <i>in vitro</i> de Semillas	25
Análisis Estadístico	27
Estadística Descriptiva de la Caracterización Morfológica	27
Estadística de las Pruebas de Desinfección y Germinación <i>in vitro</i>	27
Capítulo IV : Resultados	28
Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas	28
Pruebas de Viabilidad de las Semillas	32
Pruebas de Desinfección de Semillas.....	33
Pruebas de Germinación <i>in vitro</i> de Semillas	37
Capítulo V : Discusión	44
Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas.....	44
Pruebas de Viabilidad de las Semillas	45
Pruebas de Desinfección de Semillas.....	46
Pruebas de Germinación <i>in vitro</i> de Semillas	47
Capítulo VI : Conclusiones.....	49
Capítulo VII : Recomendaciones	50
Bibliografía	51
Anexos.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Tratamientos para la desinfección de semillas del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	25
Tabla 2. Tratamientos para la germinación <i>in vitro</i> de semillas del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	26
Tabla 3. Flor, fruto y semilla de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.....	28
Tabla 4. Descripción morfológica de frutos y semillas de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	31
Tabla 5. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	37
Tabla 6. Resultados de los tratamientos de germinación <i>in vitro</i> realizados a las semillas del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.....	38

Índice de Figuras

Figura 1. Caracterización morfológica de frutos y semillas de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	30
Figura 2. Resultados de viabilidad de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg...	32
Figura 3. Resultados de los tratamientos de desinfección aplicados en semillas de cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	34
Figura 4. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en los tratamientos de desinfección	35
Figura 5. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en los tratamientos de germinación	40
Figura 6. Porcentaje de germinación por día durante 60 días en cuatro especies del género <i>Lachemilla</i> (Focke) Rydberg.	42

Abreviaturas

BIO-GEEC: Consorcio Alemán-Ecuatoriano sobre Biodiversidad

TZ: Solución de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio

T1: Tratamiento 1

T2: Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3

T4: Tratamiento 4

T5: Tratamiento 5

T6: Tratamiento 6

Q-Q: Cuantil-Cuantil

Resumen

El género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) es considerado uno de los grupos de plantas más ecológicamente importantes y ricos en especies de los páramos andinos, sin embargo, no ha sido muy estudiado. La presente investigación es el primer reporte sobre morfología, viabilidad y cultivo *in vitro* de las especies *Lachemilla hispidula* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla holosericea* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla mandoniana* (Wedd.) Rothm. y *Lachemilla nivalis* (Kunth) Rothm., con el objetivo de determinar un protocolo de germinación *in vitro* de semillas para cada una de estas especies. En primer lugar, se realizó una caracterización morfológica de los frutos y semillas, obteniendo datos de peso, dimensiones y número de semillas por fruto. Seguido, se llevó a cabo pruebas de viabilidad, con resultados de 59, 63, 65 y 64% para *L. hispidula*, *L. holosericea*, *L. mandoniana* y *L. nivalis*, respectivamente. A continuación, se estableció el protocolo de desinfección, donde el tratamiento óptimo para *L. hispidula*, *L. holosericea* y *L. nivalis* fue utilizar una solución de NaClO al 2% y 10 min de tiempo de inmersión; mientras que *L. mandoniana* necesita NaClO al 2% y 15 min de tiempo de inmersión. Finalmente, para las pruebas de germinación *in vitro*, el mejor tratamiento fue con temperatura ambiente (9-20°C) y fotoperiodo de 12h, donde *L. mandoniana* presentó el mayor porcentaje de germinación de las cuatro especies con $63.3 \pm 10.4\%$ y *L. nivalis* el menor con $45.0 \pm 5.0\%$.

Palabras clave:

- PÁRAMO
- MORFOLOGÍA
- VIABILIDAD
- DESINFECCIÓN
- CULTIVO

Abstract

The genus *Lchemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) is considered one of the most ecologically important and species-rich groups of plants in the Andean moors, however, it has not been extensively studied. This research is the first report on the morphology, viability and *in vitro* culture of the species *Lchemilla hispidula* (L.M. Perry) Rothm., *Lchemilla holosericea* (L.M. Perry) Rothm., *Lchemilla mandoniana* (Wedd.) Rothm. and *Lchemilla nivalis* (Kunth) Rothm., with the aim of determining an *in vitro* seed germination protocol for each of these species. First, a morphological characterization of the fruits and seeds was carried out, obtaining data on weight, dimensions and number of seeds per fruit. Viability tests were then carried out, with results of 59, 63, 65 and 64% for *L. hispidula*, *L. holosericea*, *L. mandoniana* and *L. nivalis*, respectively. Next, the disinfection protocol was established, where the optimal treatment for *L. hispidula*, *L. holosericea* and *L. nivalis* was to use a 2% NaClO solution and 10 min of immersion time; while *L. mandoniana* needs 2% NaClO and 15 min of immersion time. Finally, for the *in vitro* germination tests, the best treatment was with room temperature (9-20°C) and a photoperiod of 12h, where *L. mandoniana* presented the highest percentage of germination of the four species with $63.3 \pm 10.4\%$ and *L. nivalis* the least with $45.0 \pm 5.0\%$.

Keywords:

- **PARAMO**
- **MORPHOLOGY**
- **VIABILITY**
- **DISINFECTION**
- **CULTURE**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El páramo presenta atributos ecológicos, geográficos y socioeconómicos que le dan un alto valor estratégico, como su importancia hídrica, su alto grado de endemismo y su uso para las poblaciones (Hofstede et al., 2002). En el Ecuador, este ecosistema tropical se encuentra comúnmente a una altitud promedio de 3300 msnm, valor que varía debido a condiciones geológicas, antrópicas y climáticas (Beltrán et al., 2009).

Existen diferentes formas de vida vegetal, donde cada una representa un plan de crecimiento único para enfrentar climas extremos, bajas temperaturas nocturnas, altos niveles de radiación y suelos generalmente pobres en nutrientes (Cuesta et al., 2014; Llambí, 2015). Como consecuencia de estas adaptaciones evolutivas, muchas de las plantas en el páramo no se encuentren en ningún otro ecosistema en el mundo (Mena et al., 2001; Morocho & Chuncho, 2019).

Justificación o Importancia del Problema a Resolver

Los páramos son uno de los hotspots más importantes del planeta al albergar gran diversidad de especies y tener un alto grado de endemismo (Eguiguren et al., 2015; Myers et al., 2000). Allí habitan alrededor de 125 familias, 500 géneros y 3400 especies de plantas vasculares (Caranqui et al., 2016). Entre sus familias más representativas se encuentran: Asteraceae, Cyperaceae y Rosaceae (Sabogal & Quinteros, 2013).

La familia Rosaceae contiene cerca de 100 géneros y 3000 especies distribuidas por todo el mundo, aunque la mayoría se encuentran en las zonas templadas del hemisferio norte (Pedraza et al., 2004). En esta familia se encuentra el género *Lachemilla* (Focke) Rydberg, el cual, aunque se encuentre ampliamente distribuido en las montañas neotropicales y en la región alto-

andina del norte de Sudamérica, existen escasos estudios taxonómicos y su ecología es prácticamente desconocida (Romoleroux, 2004).

Debido a esto, se desea realizar estudios de morfología, viabilidad, desinfección y germinación en este género, utilizando una de las aplicaciones de la biotecnología para la producción masiva de plantas llamada cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de plantas (Sharry, 2015).

Objetivos

Objetivo General:

- Determinar un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.

Objetivos Específicos

- Caracterizar el peso y las dimensiones de frutos y semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.
- Determinar la concentración y tiempo de inmersión de hipoclorito de sodio para la desinfección de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.
- Establecer la temperatura y condiciones de luz para la germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.

Capítulo II: Marco Teórico

Los Páramos, Ecosistemas Menospreciados y Amenazados

Características Generales de los Páramos

Los páramos están distribuidos dentro de la zona húmeda de los Andes ecuatoriales entre 11°N y 8°S de latitud, principalmente en Venezuela, Colombia, Ecuador y el norte de Perú, también en algunas zonas de Costa Rica y Panamá (Fernández et al., 2015). Su vegetación está muy adaptada a condiciones físico-químicas y climáticas como: temperaturas bajas, vientos fuertes, humedad relativamente alta, nubosidad alta, baja presión atmosférica, radiación ultravioleta intensa, y efectos de secado por el viento (Morocho & Chuncho, 2019).

Es posible, que las condiciones extremas de luz y temperatura hayan jugado un papel determinante en la selección y evolución de las características adaptativas de las plantas (Ríos & Cadenas, 2005). Por lo que, estas montañas albergan la flora tropical más diversa en el mundo, con un alto grado de endemismo a nivel de especies y géneros (MAE, 2018). Por otro lado, los páramos denotan gran importancia ecológica y económica, ya que varios millones de personas depende de éstos directa o indirectamente, generando recursos con la producción de alimentos agrícolas, la gestión de turismo y recreación (Hofstede et al., 2002; Morocho & Chuncho, 2019). En Ecuador, el páramo abarca cerca del 6% del territorio nacional, donde, entre 3500 especies de plantas vasculares han sido reportadas y posiblemente un 60% de ellas son endémicas (Reyes et al., 2015; Sklenář & Balslev, 2005). Desafortunadamente, menos del 40% de esta área está protegida formalmente (Carrillo et al., 2019).

Relevancia de los Páramos Como Ecosistema

Los páramos son ecosistemas de gran valor ecológico por sus servicios de agua, suelo y biodiversidad con la mayor heterogeneidad ambiental (Vargas, 2013). Su importancia

biogeográfica, evolutiva, ecológica y económica lo hacen único, y las especies que se han adaptado a él no se encuentran en ningún otro lugar, convirtiéndolo en un ambiente sumamente frágil (Fernández et al., 2015). Entre los ecosistemas alpinos tropicales el páramo es el más diverso, principalmente por su gran extensión geográfica, además de tener un elevado nivel de endemismo (Aguirre et al., 2015; Sklenář & Balslev, 2005). Aproximadamente, el 6.7% de las plantas endémicas del mundo se observan a lo largo del gradiente montañoso que se extiende entre 3200 y 4500 m s. n. m. (Carrillo et al., 2019).

La morfología de algunas plantas que actúan a manera de esponjas para retener el agua, hace que los páramos sean fundamentales para la regulación hidrológica, así el agua se almacena en periodos húmedos y se libera progresivamente en periodos secos (León Gordón, 2014; Podwojewski, 1999). Por otro lado, los páramos disponen grandes cantidades de carbono acumulado en sus suelos, convirtiéndose en la mayor reserva de carbono en el mundo (Ayala et al., 2014; Sklenář & Balslev, 2005).

Actividades que Amenazan a los Páramos

Los páramos son considerados como uno de los biomas más estratégicos y vulnerables del norte de Sudamérica y el Neotrópico (J. A. Morales & Estévez, 2006). Actualmente, es uno de los ecosistemas más amenazados debido a la expansión de las zonas de cultivo, prácticas pecuarias, quemas y sobrepastoreo, la introducción de especies no nativas, minería, cacería y el calentamiento global (Basantes, 2010; Beltrán, 2011; Fiallos, 2010).

La alteración de su vegetación hace que los suelos se vuelvan inestables, dejando de retener materia orgánica, agua y nutrientes (Reyes et al., 2015). Estos impactos afectan la capacidad de captación de agua y recreación, junto con la calidad de vida de la gente que depende de este ecosistema (Aguirre et al., 2013). Se estima que medio millón de personas

viven en los páramos del Ecuador, con poco acceso a servicios básicos como alimentación, vivienda, educación, capacitación y salud, haciendo que el manejo y conservación del ecosistema sean propuestas complicadas (Reyes et al., 2015).

Rosaceae, una Familia Vegetal Representativa de los Páramos

Generalidades de la Familia Rosaceae

La familia Rosaceae es la tercera familia de plantas más importante económicamente en las regiones templadas (Díaz, 2010). Sus productos tienen una gran demanda por sus valores nutricionales y estéticos, y su cultivo impulsa las economías regionales (Shulaev et al., 2008). Entre estos se incluyen particularmente frutos comestibles y flores vistosas u ornamentales, pero también algunos cultivos maderables y medicinales o nutracéuticos (Hummer & Janick, 2009).

En el Ecuador se han registrado 11 géneros y 70 especies nativas, en su mayoría distribuidas en la zona altoandina sobre los 2500 m de altitud (Romoleroux, 2017). De las 70 especies nativas 12 son endémicas, incluidas en los géneros *Polylepis*, *Rubus* y *Lachemilla* (León-Yáñez et al., 2019).

Generalidades del Género Lachemilla (Focke) Rydberg

En 1888, Focke consideraba a *Lachemilla* dentro del género *Alchemilla* de la familia Rosaceae, junto con *Eualchemilla* y *Aphanes* (Gaviria, 1997). Sin embargo, Rydberg (1908) y Rothmaler (1937) trataron a *Lachemilla* como un género distinto basándose en sus diferencias florales y distribución geográfica (Romoleroux, 2009). El género *Lachemilla* (Focke) Rydberg engloba aproximadamente 80 especies de hierbas y arbustos que se distribuyen en América del Sur y Central, desde México hasta el norte de Chile y Argentina, entre 2200 y 5000 m de altitud (Gehrke et al., 2008; Kalkman, 2004; Romoleroux, 2004). El área de mayor diversidad se

encuentra en la región entre Venezuela y Ecuador con 36 especies, de las cuales 27 están distribuidas en Ecuador (Samaniego et al., 2018).

Importancia de las Especies de Lachemilla (Focke) Rydberg de Estudio

Lachemilla (Focke) Rydberg es considerado uno de los grupos de plantas más ecológicamente importantes y ricos en especies de los páramos andinos (Gehrke et al., 2008). Éstos forman extensas asociaciones vegetales que trabajan como reservorios naturales de agua en páramos y superpáramos (Romoleroux, 2004). Por lo que, son empleados en proyectos de reforestación y para evitar la erosión de los suelos (Tanguila & Pico, 2020).

Este género es utilizado con fines medicinales y ambientales (Romoleroux, 2014). En Colombia y Ecuador son aprovechados en la medicina popular, empleándolos en infusiones para el tratamiento de la enteritis, diarreas, disenterías y hemorragias intestinales (González, 2011; González et al., 2012). Se han realizado varios estudios para analizar su potencial bioactivo, demostrando la presencia de compuestos fenólicos, principalmente taninos y flavonoides, y tienen gran actividad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, cicatrizante, entre otras (Álvarez et al., 2020; Ayca & Arias, 2012).

Descripción de Lachemilla hispidula (L.M. Perry) Rothm.

Según Fernanda Samaniego (2014), *Lachemilla hispidula* es un subarbusto de 30-40 cm de largo. Tallos erectos a ligeramente decumbentes, a veces ramificados hacia el ápice, toda la planta con tricomas hispídos, excepto las inflorescencias. Hojas distales reducidas, formando vainas verticiladas lobuladas alrededor del tallo, margen revoluto. Inflorescencias en cimas glomeruladas terminales o laterales, flores bisexuales, pedicelo ligeramente piloso, dos estambres, ovario ínfero y fruto aquenio ovoide.

Descripción de Lachemilla holosericea (L.M. Perry) Rothm.

Según Katya Romoleroux (2019a), *Lachemilla holosericea* es una hierba cespitosa, procumbente a ligeramente decumbente. Tallos ramificados, las ramas producen raíces. Hojas distales alternas, simples, lámina tripartida, margen revoluto. Inflorescencias en cimas glomeruladas, flores bisexuales, pedicelo seríceo-viloso, dos estambres, ovario ínfero y fruto aquenio ovoide-globoso.

Descripción de Lachemilla mandoniana (Wedd.) Rothm.

Según Katya Romoleroux (2019b), *Lachemilla mandoniana* es una hierba estolonífera, rastrera. Tallos en ramas ligeramente ascendentes, ocasionalmente con tricomas villosos. Hojas alternas compuestas, lámina deltoide-ovada con dos a tres pares de folíolos lobulados. Inflorescencias en cimas glomeruladas o flores solitarias, flores bisexuales, dos estambres, ovario ínfero y fruto aquenio semi ovoide-globoso.

Descripción de Lachemilla nivalis (Kunth) Rothm.

Según Katya Romoleroux (2019c), *Lachemilla nivalis* es un subarbusto hasta 60 cm de largo. Tallos erectos o ligeramente decumbentes, a veces ramificados hacia el ápice, con tricomas villosos-seríceos. Hojas distales reducidas, formando vainas verticiladas alrededor del tallo con 10 - 15 lóbulos, margen ligeramente revoluto. Inflorescencias en cimas glomeruladas terminales o laterales, flores bisexuales, dos estambres, ovario ínfero y fruto aquenio ovoide.

Cultivo de Tejidos Vegetales

Cultivo de tejidos es el cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas *in vitro* (Pierik, 1997). La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial con dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Castillo, 2004; Sharry, 2015).

Desde 1975, el cultivo *in vitro* de plantas vasculares ha mostrado un desarrollo espectacular (Pierik, 1997). Métodos para la germinación de semillas, micropropagación, cultivo de meristemas y cultivo de callos, dan como resultado la producción y regeneración de individuos viables de muchas especies vegetales (Fay, 1994; García et al., 2010). Estos métodos han adquirido una gran importancia industrial en el área de la propagación de plantas, eliminación de enfermedades, mejoramiento de plantas y producción de metabolitos secundarios (Leva & Rinaldi, 2012).

El utilizar métodos de cultivo *in vitro* para la germinación de semillas es una buena estrategia, debido a que, en algunas especies la germinación es baja o nula por factores como latencia o requisitos específicos de luz, humedad y temperatura (Fay, 1994). Esto puede ayudar a la conservación de plantas de páramos que se encuentran amenazadas. Además, la propagación de plantas por medio de semillas es de gran importancia, al intervenir en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies (Amador et al., 2013).

Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): No existe un protocolo para la germinación *in vitro* de las semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas del Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.

Hipótesis alternativa (H_1): Existe un protocolo para la germinación *in vitro* de las semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas del Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.

Capítulo III: Metodología

Recolección y Tratamiento Preliminar del Material Vegetal

El material vegetal se obtuvo en parcelas previamente seleccionadas y delimitadas por el proyecto Consorcio Alemán-Ecuatoriano sobre Biodiversidad (BIO-GEEC), dentro del Parque Nacional Cayambe Coca. Se recolectó en bolsas de papel frutos maduros de las especies: *Lachemilla hispidula* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla holosericea* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla mandoniana* (Wedd.) Rothm. y *Lachemilla nivalis* (Kunth) Rothm.

Se los etiquetó con el código de acceso fijado por el proyecto, su respectiva ficha de muestreo y fotografía. Se dejó secar el material vegetal a temperatura ambiente por dos días, posteriormente se extrajeron los frutos y semillas de los restos vegetales y fueron almacenados en frascos de vidrio a 5°C en oscuridad hasta ser utilizados.

Identificación de las Especies

Las especies recolectadas fueron correctamente identificadas utilizando las colecciones del Instituto Nacional de Biodiversidad – INABIO.

Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas

Para el pesaje, se pesó en una balanza analítica cinco lotes de 100 frutos y 100 semillas, obteniendo un promedio de dichos lotes. Para el dimensionamiento, se tomó fotografías de 100 frutos y 100 semillas con la cámara del estereoscopio MSHOT, luego se midió el largo y ancho utilizando el programa ImageJ 1.49v, obteniendo un promedio de las dimensiones.

Adicionalmente, se determinó el número de semillas por fruto, obteniendo la cantidad mínima, máxima y promedio de semillas en 30 frutos. Este procedimiento se realizó para las cuatro especies seleccionadas.

Pruebas de Viabilidad de las Semillas

La prueba de viabilidad con la solución de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TZ) fue preparada según el protocolo de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas-ISTA (2016). Las semillas fueron punzadas levemente con una aguja a un tercio de su longitud. Tras verificar que tienen embrión se las remojó en agua durante 18 h. Finalmente, se colocaron en tubos Eppendorf con la solución TZ al 1% y fueron incubadas a 30°C en oscuridad durante 20 horas. Al finalizar del tiempo de tinción, las semillas fueron enjuagadas con agua y examinadas en el estereoscopio. La presencia de coloración roja se considera como tejido viable, mientras que una falta de coloración representa que el embrión no es viable (Cottrell, 1948; Hartmann & Kester, 1975).

La variable evaluada fue el porcentaje de viabilidad en 100 semillas con embrión, se lo calculó según la fórmula: $\text{viabilidad (\%)} = \frac{\text{número de semillas teñidas}}{\text{número total de semillas con embrión}} \times 100$. Además, se obtuvo el porcentaje de semillas con embrión y semillas huecas presentes en 200 semillas escogidas al azar. Este procedimiento se realizó para las cuatro especies seleccionadas.

Pruebas de Desinfección de Semillas

Se realizó un lavado a las semillas con agua corriente, seguido de una solución de detergente al 1% durante 15 minutos en agitación, después, se las enjuagó dos veces en agua destilada y una última con agua estéril por 5 minutos. A continuación, se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) más 3 gotas de Tween-20 en agitación. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua estéril, y fueron sembradas en cajas Petri con medio Agar-Agar a 5 g/L dentro de una cámara de flujo laminar. Se realizaron seis tratamientos

variando la concentración y tiempo de inmersión del NaClO, como se detalla en la Tabla 1. Los resultados se observaron durante 4 semanas manteniéndolos a temperatura ambiente.

Tabla 1

Tratamientos para la desinfección de semillas del género Lachemilla (Focke) Rydberg.

Tratamiento	Concentración de hipoclorito	
	de sodio [%]	Tiempo de inmersión [min]
T1	0	10
T2	1	10
T3	2	10
T4	0	15
T5	1	15
T6	2	15

La unidad experimental fue una caja Petri con 25 semillas y se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. En total se necesitaron 75 semillas por tratamiento, 450 por especie. La variable evaluada fue el porcentaje de contaminación mediante la observación de semillas contaminadas por hongo o bacteria. El porcentaje se calculó según la fórmula: $\text{contaminación (\%)} = \frac{\text{número de semillas contaminadas}}{\text{número total de semillas}} \times 100$. Este procedimiento se realizó para las cuatro especies seleccionadas.

Pruebas de Germinación *in vitro* de Semillas

Se separaron las semillas huecas de las semillas con embrión al colocarlas en un frasco lleno de agua revolviendo vigorosamente. Las semillas con embrión tienden a ser más densas y se hunden hasta el fondo, mientras las semillas de mala calidad tienden a flotar, por lo que, los

escombros y semillas huecas se pueden desechar fácilmente (Ashworth et al., 2002). Con las semillas recolectadas, se realizó una escarificación mecánica punzándolas levemente con una aguja a un tercio de su longitud, perforando la testa, y finalmente fueron sembradas en cajas Petri con medio Agar-Agar a 5 g/L dentro de una cámara de flujo laminar.

Se analizó la influencia de temperatura y luz en la germinación de las semillas durante 60 días, utilizando tres temperaturas diferentes y dos condiciones de luz, como se detalla en la Tabla 2. La posición de las cajas Petri varió dentro de las cámaras de germinación cada semana, para minimizar las diferencias espaciales en iluminación y temperatura. Los tratamientos de oscuridad se realizaron cubriendo totalmente las cajas Petri con papel aluminio.

Tabla 2

Tratamientos para la germinación in vitro de semillas del género Lachemilla (Focke) Rydberg.

Tratamiento	Temperatura [°C]	Condiciones de luz
T1	5	Fotoperiodo de 12 h
T2	9 – 20*	Fotoperiodo de 12 h
T3	30	Fotoperiodo de 12 h
T4	5	Oscuridad
T5	9 – 20*	Oscuridad
T6	30	Oscuridad

Nota: *Temperatura ambiente en el Distrito Metropolitano de Quito, obtenido de la Red de Estaciones Automáticas Hidrometeorológicas del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), durante los meses de octubre y noviembre (2021).

La unidad experimental fue una caja Petri con 20 semillas, se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. En total se necesitaron 60 semillas por tratamiento, 360 por especie. La

variable evaluada fue el porcentaje por día y porcentaje final de germinación, considerando como germinado cuando el radical sobresalía 1 mm más allá de la cubierta de la semilla. El porcentaje se calculó según la fórmula: germinación (%) = número de semillas germinadas / número total de semillas sembradas \times 100. Este procedimiento se realizó para las cuatro especies seleccionadas.

Análisis Estadístico

Estadística Descriptiva de la Caracterización Morfológica

Para el peso se sacó el promedio y desviación estándar de cinco lotes de 100 frutos y 100 semillas. Para el dimensionamiento se sacó el promedio y desviación estándar de 100 medidas de largo y ancho para frutos y semillas.

Estadística de las Pruebas de Desinfección y Germinación in vitro

Las pruebas de desinfección y germinación *in vitro* presentan un Diseño Factorial Completo 3 \times 2 con tres réplicas. En primer lugar, se realizó un gráfico Q-Q (gráfico cuantil-cuantil) para verificar si los valores obtenidos se ajustan a una distribución normal. A continuación, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la homocedasticidad de la varianza (Valor - $p > 0.05$).

Si se cumplen estas dos pruebas de normalidad y homocedasticidad, se realizará una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con nivel de significancia del 95% y un análisis Tukey. Si no se cumplen, se realizará la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, con nivel de significancia del 95%. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software para análisis estadístico InfoStat versión 2020.

Capítulo IV: Resultados

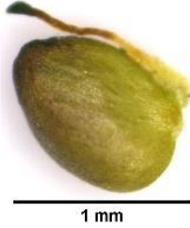
Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas

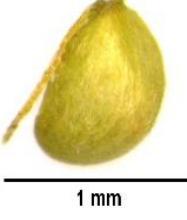
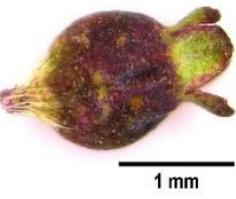
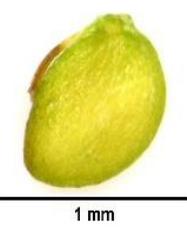
En la Tabla 3 se observa la fotografía de la flor, fruto y semilla de las especies: *Lachemilla hispidula* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla holosericea* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla mandoniana* (Wedd.) Rothm. y *Lachemilla nivalis* (Kunth) Rothm. Los frutos aquenios son diferentes entre sí variando el color, forma y textura; mientras que las semillas muestran gran similitud, solo variando en su color.

L. hispidula tiene el fruto morado con amarillo, de forma ovalada y pubescente; su semilla es semiovoide de color café con verde. *L. holosericea* tiene el fruto verde, de forma ovalada y pubescente; su semilla es semiovoide de color café claro. *L. mandoniana* tiene el fruto morado, de forma ovalada y liso; su semilla es semiovoide de color verde claro. *L. nivalis* tiene el fruto morado con blanco, de forma ovalada y pubescente; su semilla es semiovoide de color café oscuro.

Tabla 3

Flor, fruto y semilla de cuatro especies del género Lachemilla (Focke) Rydberg.

Especie	Flor	Fruto	Semilla
<i>L. hispidula</i>			

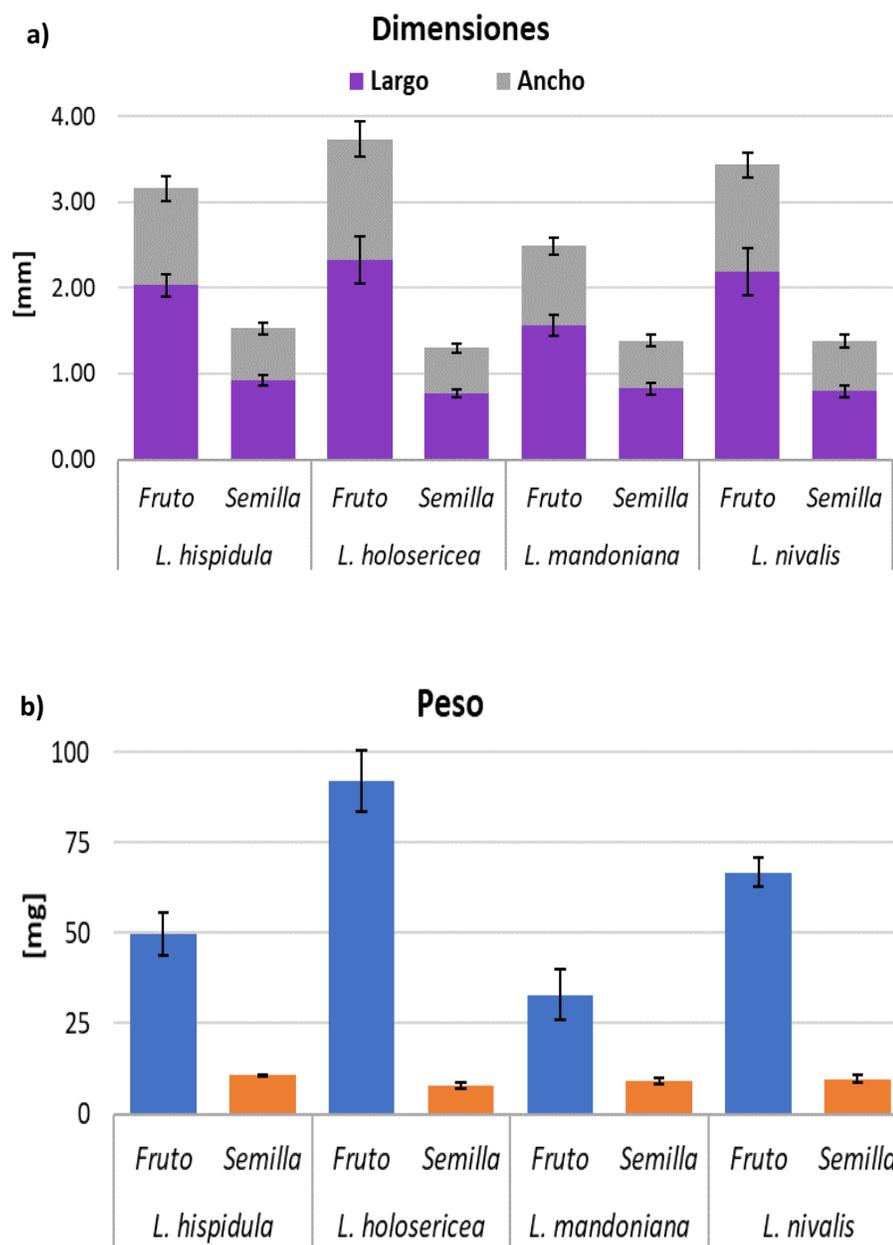
Especie	Flor	Fruto	Semilla
<i>L. holosericea</i>		 1 mm	 1 mm
<i>L. mandoniana</i>		 1 mm	 1 mm
<i>L. nivalis</i>		 1 mm	 1 mm

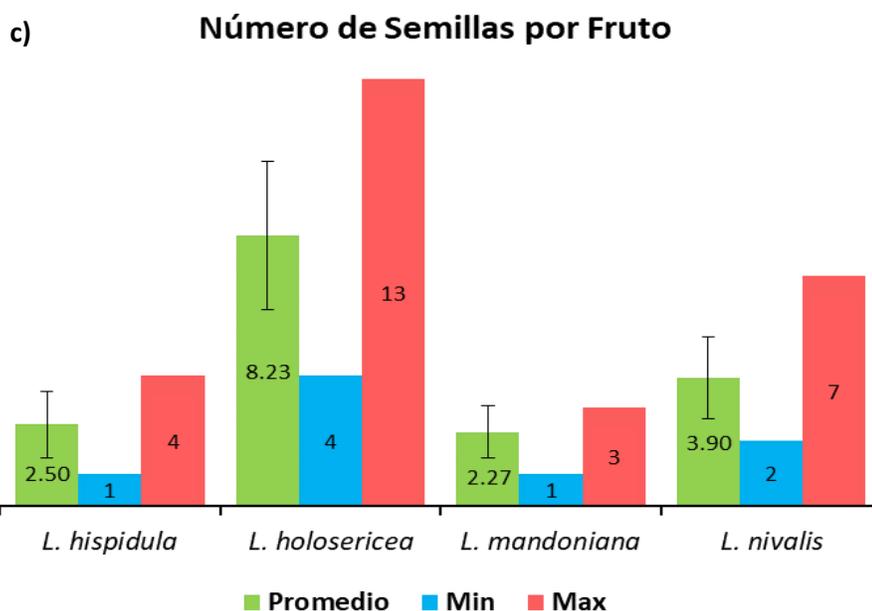
La diferencia principal entre estas especies se encuentra en el tamaño de los frutos, como se observa en la Figura 1a-1b y Tabla 4. El fruto más grande y pesado pertenece a *L. holosericea* con 2.33 mm de largo, 1.40 mm de ancho y 92.05 mg/100 frutos; a esta le sigue *L. nivalis*, después *L. hispidula* y finalmente *L. mandoniana* con 1.56 x 0.92 mm y 32.89 mg/100 frutos. Por otro lado, las semillas no difieren en gran medida entre especies. La semilla más grande y pesada le pertenece a *L. hispidula* con 0.93 x 0.60 mm y 10.61 mg/100 semillas; a esta le sigue *L. nivalis*, después *L. mandoniana* y finalmente *L. holosericea* con 0.77 x 0.52 mm y 7.87 mg/100 semillas. Adicionalmente, se determinó el número de semillas por fruto presentes en cada especie. Se puede observar en la Figura 1c que *L. holosericea* tiene un promedio de 8 semillas por fruto, sobrepasando a las otras especies por más del doble, ya que tienen un promedio de 2 a 4 semillas por fruto.

Figura 1

Caracterización morfológica de frutos y semillas de cuatro especies del género *Lachemilla*

(Focke) Rydberg.





Nota: a) Dimensiones de largo y ancho de frutos y semillas. b) Peso promedio de 100 frutos y 100 semillas. c) Número de semillas por fruto.

Tabla 4

Descripción morfológica de frutos y semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.

Especie	Estructura Vegetal	Largo [mm]	Ancho [mm]	Peso [mg]
<i>L. hispidula</i>	Fruto	2.0288 ± 0.1330	1.1341 ± 0.1438	49.8960 ± 5.9035
	Semilla	0.9256 ± 0.0643	0.6032 ± 0.0709	10.6100 ± 0.1219
<i>L. holosericea</i>	Fruto	2.3289 ± 0.2765	1.4040 ± 0.2055	92.0460 ± 8.5305
	Semilla	0.7748 ± 0.0465	0.5234 ± 0.0510	7.8780 ± 0.9533
<i>L. mandoniana</i>	Fruto	1.5632 ± 0.1270	0.9228 ± 0.0978	32.8860 ± 6.8990
	Semilla	0.8262 ± 0.0649	0.5622 ± 0.0727	9.0780 ± 0.7395
<i>L. nivalis</i>	Fruto	2.1861 ± 0.2717	1.2457 ± 0.1465	66.6300 ± 4.0260
	Semilla	0.7993 ± 0.0674	0.5754 ± 0.0768	9.6540 ± 1.0275

Nota: Valores de largo y ancho promedio de 100 frutos y 100 semillas. Peso promedio de cinco

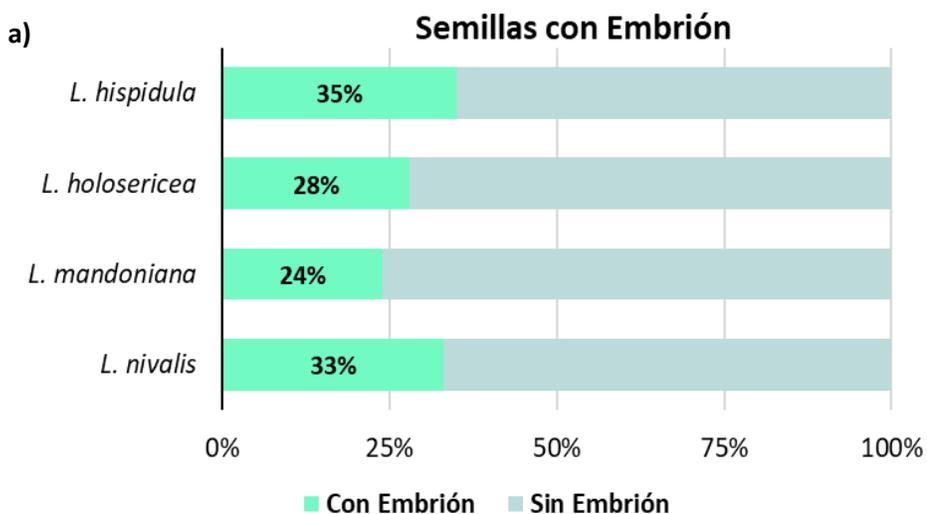
lotes de 100 frutos y 100 semillas.

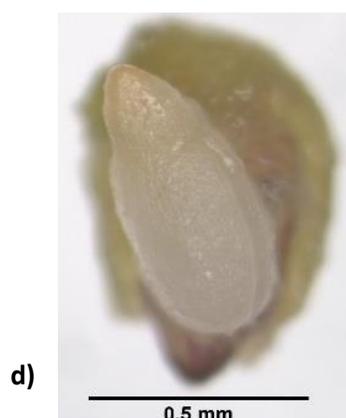
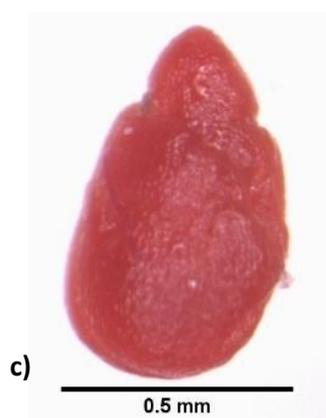
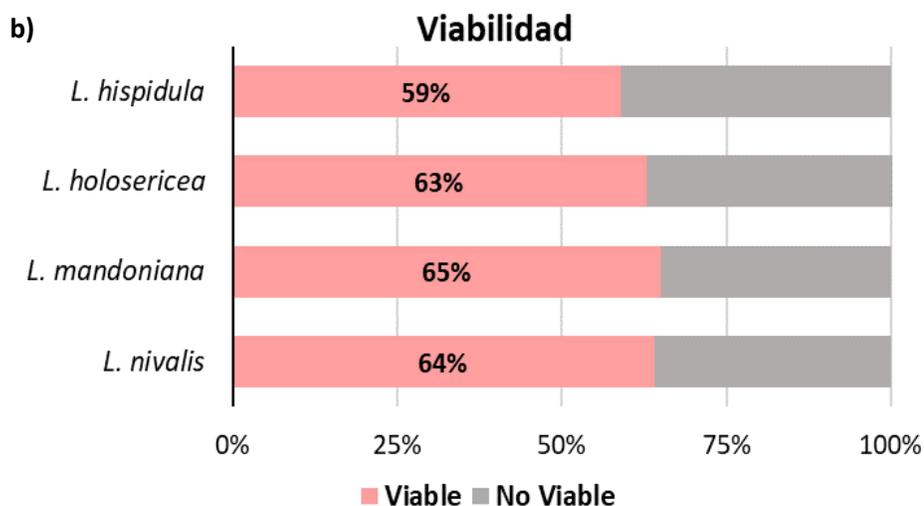
Pruebas de Viabilidad de las Semillas

Se obtuvo el porcentaje de semillas con embrión (Figura 2a), el cual es sumamente bajo, no superando el 35% en ninguna de las especies. Siendo *L. mandoniana*, la especie del menor porcentaje con un 24%. En la Figura 2b se observa que los porcentajes de viabilidad son muy cercanos entre las cuatro especies, yendo de un 59% en *L. hispidula* a un 65% en *L. mandoniana*. Considerando como viables a los embriones teñidos completamente (Figura 2c) y como no viables a aquellos que no muestran ninguna coloración (Figura 2d).

Figura 2

Resultados de viabilidad de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.





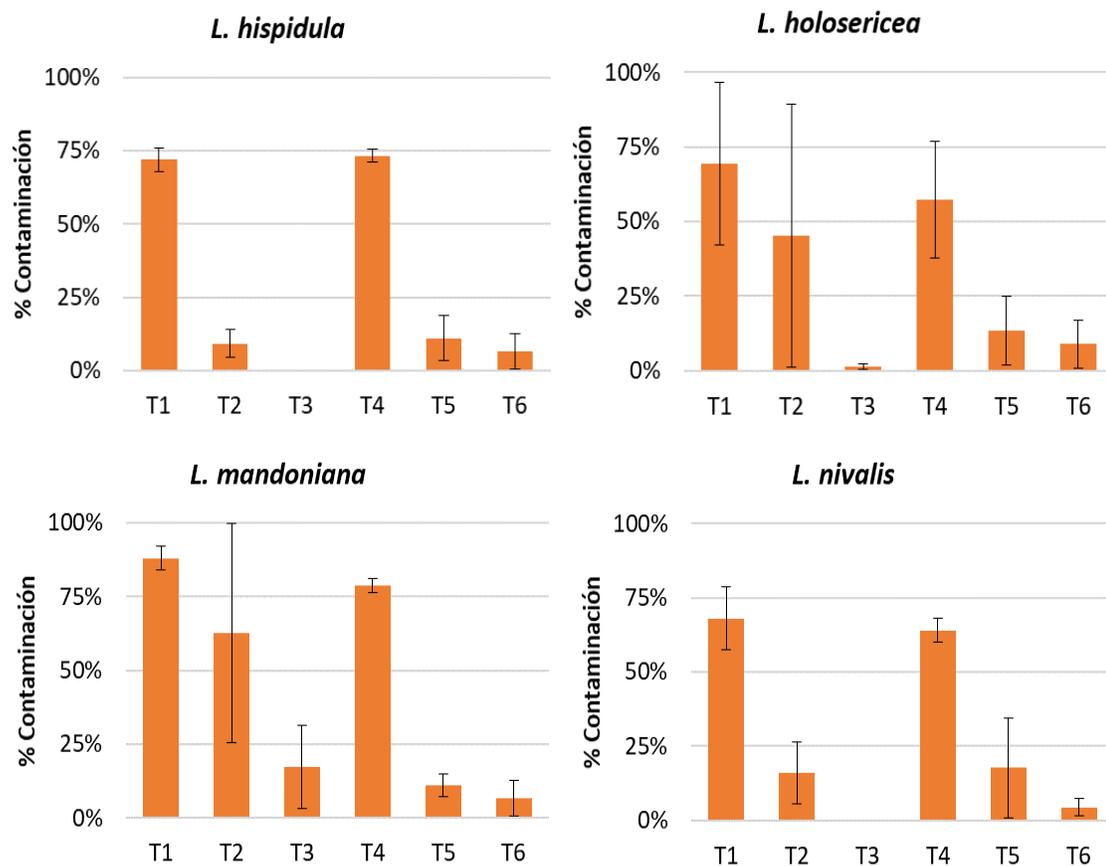
Nota: a) Porcentaje de semillas con embrión. b) Porcentaje de embriones viables. c) Embrión de semilla completamente teñido con la solución de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio representando que es viable. d) Embrión de semilla no teñido representando que es no viable.

Pruebas de Desinfección de Semillas

Los porcentajes de contaminación más altos (72 ± 4 ; 69.3 ± 27.2 ; 88 ± 4 ; $64 \pm 4\%$) corresponden a los tratamientos en los que se utilizó una solución de detergente como único agente desinfectante. Al añadir NaClO, el número de semillas contaminadas disminuyó considerablemente, como se observa en la Figura 3.

Figura 3

Resultados de los tratamientos de desinfección aplicados en semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.



Nota: Tratamientos: T1 = NaClO 0% y 10 min inmersión, T2 = NaClO 1% y 10 min inmersión, T3 = NaClO 2% y 10 min inmersión, T4 = NaClO 0% y 15 min inmersión, T5 = NaClO 1% y 15 min inmersión, T6 = NaClO 2% y 15 min inmersión.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Valor - $p > 0.05$) para determinar si los tratamientos son significativamente diferentes entre sí (Figura 4). Los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de contaminación (0 ; 1.3 ± 1 ; $6.7 \pm 6\%$) fueron T3 y T6; éstos utilizaron NaClO al 2%, variando el tiempo de inmersión. Por lo que, para *L. hispidula*, *L. holosericea* y *L. nivalis* el mejor tratamiento de desinfección fue el tercero, con NaClO al 2% y 10

minutos de tiempo de inmersión; mientras que para *L. mandoniana* el mejor tratamiento fue el sexto con NaClO al 2% y 15 minutos de tiempo de inmersión.

Figura 4

Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en los tratamientos de desinfección

a) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Contaminación T1		3	0.72	0.04	0.72	14.29	0.0116
% Contaminación T2		3	0.16	0.08	0.20		
% Contaminación T3		3	0.00	0.00	0.00		
% Contaminación T4		3	0.73	0.02	0.72		
% Contaminación T5		3	0.11	0.08	0.07		
% Contaminación T6		3	0.07	0.07	0.07		

Trat.	Ranks
T3	2.50 A
T6	6.00 A
T5	8.00 A B
T2	9.50 A B
T1	15.17 B
T4	15.83 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

b) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Contaminación T1		3	0.69	0.27	0.60	13.40	0.0188
% Contaminación T2		3	0.49	0.44	0.26		
% Contaminación T3		3	0.01	0.02	0.00		
% Contaminación T4		3	0.57	0.20	0.48		
% Contaminación T5		3	0.14	0.12	0.07		
% Contaminación T6		3	0.09	0.10	0.07		

Trat.	Ranks
T3	2.67 A
T6	5.33 A B
T5	7.67 A B C
T2	12.17 B C
T4	13.83 B C
T1	15.33 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

c) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Contaminación T1		3	0.88	0.04	0.88	13.40	0.0192
% Contaminación T2		3	0.65	0.36	0.68		
% Contaminación T3		3	0.17	0.14	0.16		
% Contaminación T4		3	0.79	0.02	0.80		
% Contaminación T5		3	0.11	0.04	0.13		
% Contaminación T6		3	0.07	0.07	0.07		

Trat.	Ranks
T6	3.50 A
T5	5.17 A B
T3	6.67 A B
T2	12.67 B C
T4	13.00 B C
T1	16.00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

d) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Contaminación T1		3	0.64	0.04	0.64	13.12	0.0196
% Contaminación T2		3	1.00	0.66	1.25		
% Contaminación T3		3	0.00	0.00	0.00		
% Contaminación T4		3	0.68	0.11	0.64		
% Contaminación T5		3	0.18	0.17	0.20		
% Contaminación T6		3	0.04	0.04	0.07		

Trat.	Ranks
T3	3.00 A
T6	5.33 A B
T5	7.00 A B C
T1	13.33 B C
T4	13.67 B C
T2	14.67 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Nota: a) *Lachemilla hispidula*, b) *Lachemilla holosericea*, c) *Lachemilla mandoniana* y d)

Lachemilla nivalis. Realizado en el software estadístico InfoStat. Tratamientos: T1 = NaClO 0% y

10 min inmersión, T2 = NaClO 1% y 10 min inmersión, T3 = NaClO 2% y 10 min inmersión, T4 =

NaClO 0% y 15 min inmersión, T5 = NaClO 1% y 15 min inmersión, T6 = NaClO 2% y 15 min

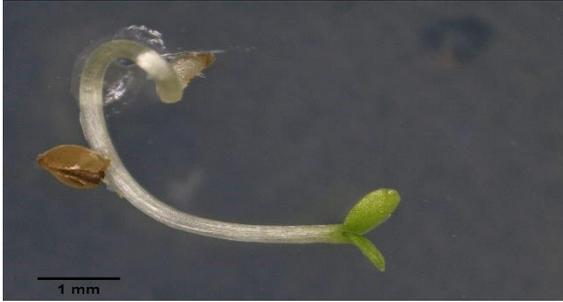
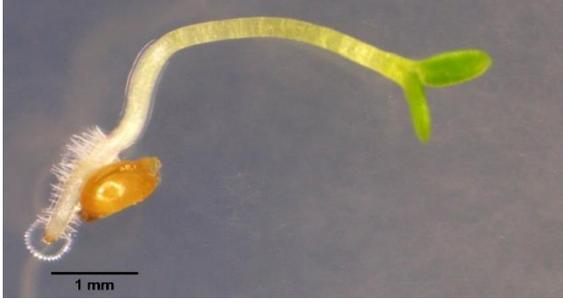
inmersión.

Pruebas de Germinación *in vitro* de Semillas

La germinación comenzó con el hinchamiento de las semillas y aparición de un radical a través de la parte perforada de la semilla por escarificación mecánica. En las siguientes semanas se observó el alargamiento del tallo y la formación de foliolos, sin embargo, no se obtuvo un crecimiento riguroso en ninguna de las especies al finalizar los 60 días (Tabla 5).

Tabla 5

Germinación *in vitro* de semillas de cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.

Especie	Semana 2	Semana 8
<i>L. hispidula</i>		
<i>L. holosericea</i>		
<i>L. mandoniana</i>		

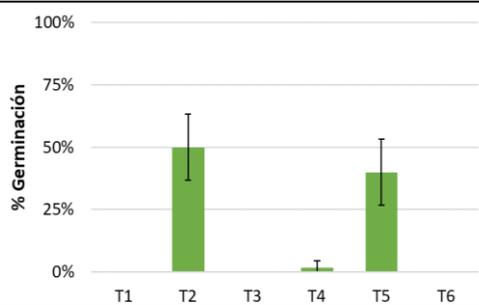
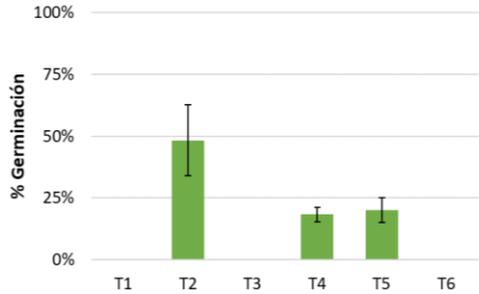


Los mayores porcentajes de germinación en las cuatro especies a los dos meses de sembrados (50.0 ± 13.2 ; 48.3 ± 14.4 ; 63.3 ± 10.4 ; $45.0 \pm 5.0\%$) correspondieron al tratamiento T2. Como se observa en la Tabla 6, *L. mandoniana* obtuvo el mayor porcentaje de germinación de las cuatro especies con 63.3% y *L. nivalis* el menor con 45.0%. Los tratamientos T1, T3 y T6 no obtuvieron ningún resultado positivo.

Tabla 6

Resultados de los tratamientos de germinación in vitro realizados a las semillas del género

Lachemilla (Focke) Rydberg.

Especie	Tratamiento	% Germinación	Gráfico de barras
<i>L. hispidula</i>	T1	0.0	
	T2	50.0 ± 13.2	
	T3	0.0	
	T4	1.7 ± 2.9	
	T5	40.0 ± 13.2	
	T6	0.0	
<i>L. holosericea</i>	T1	0.0	
	T2	48.3 ± 14.4	
	T3	0.0	
	T4	18.3 ± 2.9	
	T5	20.0 ± 5.0	
	T6	0.0	

Especie	Tratamiento	% Germinación	Gráfico de barras
<i>L. mandoniana</i>	T1	0.0	
	T2	63.3 ± 10.4	
	T3	0.0	
	T4	23.3 ± 7.6	
	T5	21.7 ± 11.5	
	T6	0.0	
<i>L. nivalis</i>	T1	0.0	
	T2	45.0 ± 5.0	
	T3	0.0	
	T4	23.3 ± 8.7	
	T5	5.0 ± 5.0	
	T6	0.0	

Nota: Porcentaje de germinación final a los 60 días de siembra. Tratamientos: T1 = 5°C y fotoperiodo 12h, T2 = 9-20°C y fotoperiodo 12h, T3 = 30°C y fotoperiodo 12h, T4 = 5°C y oscuridad, T5 = 9-20°C y oscuridad, T6 = 30°C y oscuridad.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Valor - $p > 0.05$) para determinar si los tratamientos son significativamente diferentes entre sí (Figura 5). Por lo que, el tratamiento con el mejor porcentaje de germinación para *L. holosericea*, *L. mandoniana* y *L. nivalis* fue T2. Mientras que, para *L. hispidula*, no hay una diferencia significativa entre T2 (temperatura ambiente y fotoperiodo de 12h) y T5 (temperatura ambiente y oscuridad).

Figura 5

Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en los tratamientos de germinación

a) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Germinación	T1	3	0,00	0,00	0,00	11,83	0,0091
% Germinación	T2	3	0,50	0,13	0,55		
% Germinación	T3	3	0,00	0,00	0,00		
% Germinación	T4	3	0,02	0,03	0,00		
% Germinación	T5	3	0,40	0,13	0,45		
% Germinación	T6	3	0,00	0,00	0,00		

Trat.	Ranks
T6	6,00 A
T3	6,00 A
T1	6,00 A
T4	8,00 A B
T5	14,67 B
T2	16,33 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

b) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Germinación	T1	3	0,00	0,00	0,00	14,23	0,0059
% Germinación	T2	3	0,48	0,14	0,40		
% Germinación	T3	3	0,00	0,00	0,00		
% Germinación	T4	3	0,18	0,03	0,20		
% Germinación	T5	3	0,20	0,05	0,20		
% Germinación	T6	3	0,00	0,00	0,00		

Trat.	Ranks
T6	5,00 A
T3	5,00 A
T1	5,00 A
T4	12,17 A B
T5	12,83 A B
T2	17,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

c) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Germinación T1		3	0,00	0,00	0,00	14,26	0,0059
% Germinación T2		3	0,63	0,10	0,60		
% Germinación T3		3	0,00	0,00	0,00		
% Germinación T4		3	0,17	0,08	0,15		
% Germinación T5		3	0,22	0,12	0,15		
% Germinación T6		3	0,00	0,00	0,00		

Trat.	Ranks
T6	5,00 A
T3	5,00 A
T1	5,00 A
T4	12,00 A B
T5	13,00 A B
T2	17,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

d) Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Germinación T1		3	0,00	0,00	0,00	13,11	0,0074
% Germinación T2		3	0,45	0,05	0,45		
% Germinación T3		3	0,00	0,00	0,00		
% Germinación T4		3	0,23	0,06	0,20		
% Germinación T5		3	0,05	0,05	0,05		
% Germinación T6		3	0,00	0,00	0,00		

Trat.	Ranks
T6	5,50 A
T3	5,50 A
T1	5,50 A
T5	9,50 A B
T4	14,00 A B
T2	17,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Nota: a) *Lachemilla hispidula*, b) *Lachemilla holosericea*, c) *Lachemilla mandoniana* y d)

Lachemilla nivalis. Realizado en el software estadístico InfoStat. Tratamientos: T1 = 5°C y fotoperiodo 12h, T2 = 9-20°C y fotoperiodo 12h, T3 = 30°C y fotoperiodo 12h, T4 = 5°C y oscuridad, T5 = 9-20°C y oscuridad, T6 = 30°C y oscuridad.

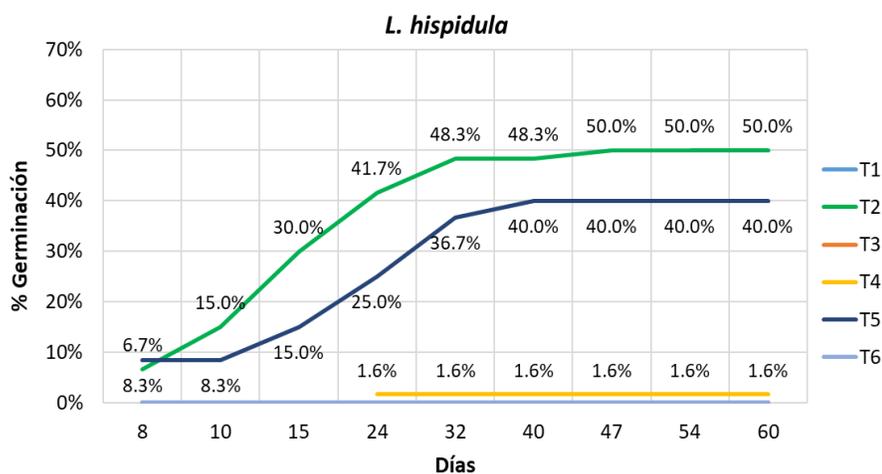
En la Figura 6 se puede observar el porcentaje de germinación por día en el periodo de dos meses. Para el tratamiento T2, *L. hispidula* tuvo la primera semilla germinada a los 8 días de ser sembrada; a partir de ahí fueron germinando progresivamente hasta el día 47 donde se

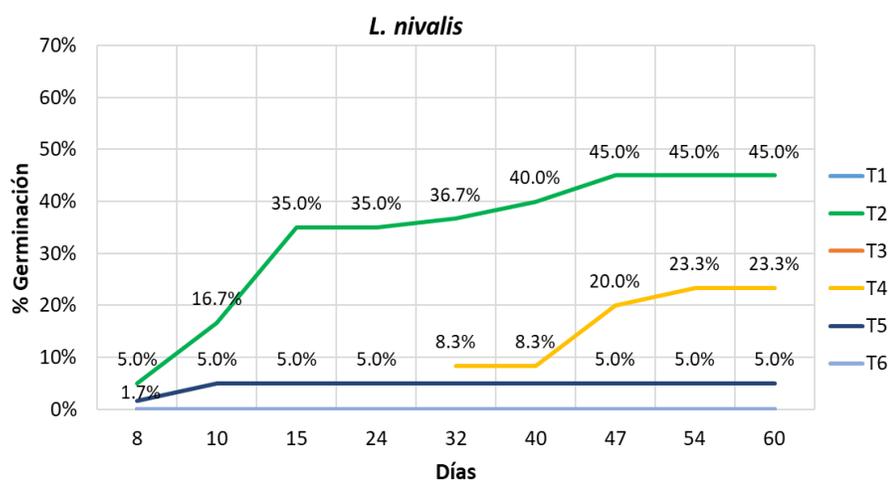
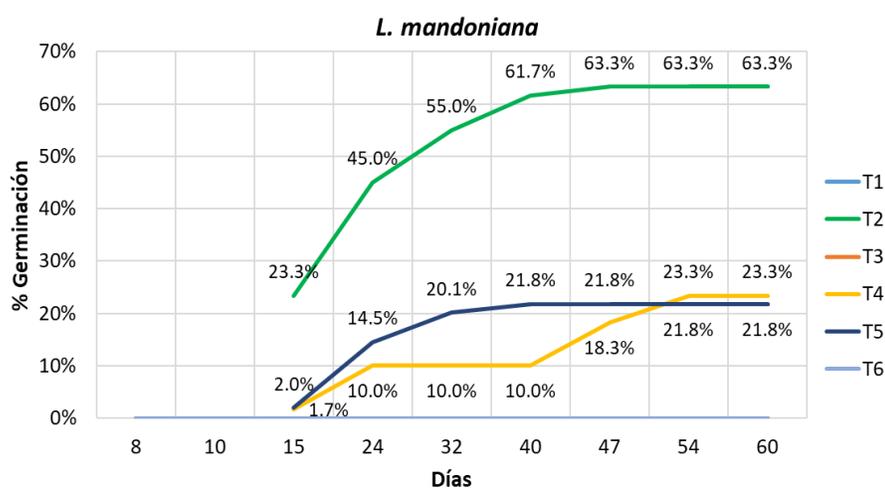
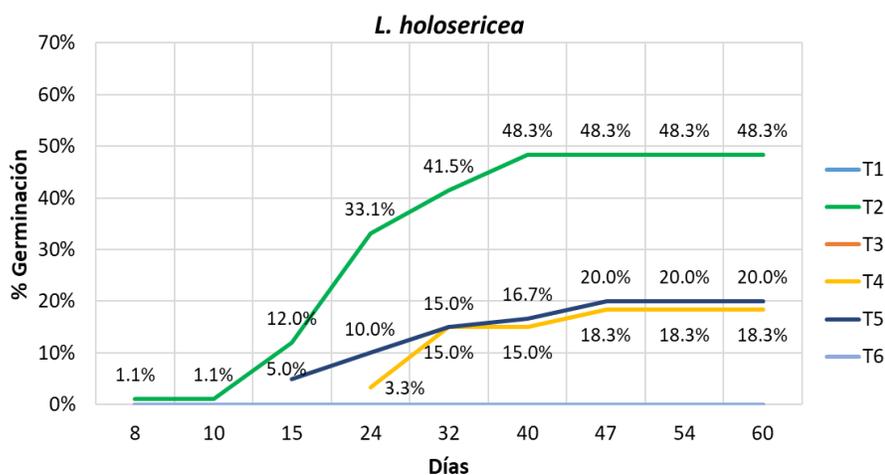
mantuvo estable en un 50%. *L. holosericea* también tuvo la primera semilla germinada a los 8 días, pero desde los 15 es donde empezó a crecer significativamente hasta el día 40 donde se mantuvo estable en 48.33%. *L. mandoniana* es la que mostró la mejor curva de crecimiento, empezando a los 15 días hasta el día 40 donde permaneció estable en un 63.33%. Finalmente, *L. nivalis* tuvo la primera semilla germinada a los 8 días y desde el día 47 se mantuvo estable en un 45%.

Con estos resultados se observa que el tratamiento con temperatura ambiente y fotoperiodo de 12h (T2) tuvo un mayor porcentaje de germinación a un menor tiempo que aquellos en oscuridad, por lo que, el mejor tratamiento de germinación *in vitro* para las cuatro especies del género *Lachemilla*, es a temperatura ambiente (9-20°C) con fotoperiodo de 12h.

Figura 6

Porcentaje de germinación por día durante 60 días en cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg.





Nota: Tratamientos: T1 = 5°C y fotoperiodo 12h, T2 = 9-20°C y fotoperiodo 12h, T3 = 30°C y fotoperiodo 12h, T4 = 5°C y oscuridad, T5 = 9-20°C y oscuridad, T6 = 30°C y oscuridad.

Capítulo V: Discusión

El presente trabajo es el primer reporte enfocado en estudios de morfología, viabilidad y cultivo *in vitro* de semillas de las especies *Lachemilla hispidula* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla holosericea* (L.M. Perry) Rothm., *Lachemilla mandoniana* (Wedd.) Rothm. y *Lachemilla nivalis* (Kunth) Rothm. Los resultados obtenidos marcan el inicio de futuros estudios para especies vegetales dentro del páramo ecuatoriano, el cual ha sido un área poco explorada.

Caracterización Morfológica de Frutos y Semillas

La descripción y uso de rasgos morfológicos funcionales de las plantas podrían mejorar el conocimiento de las relaciones entre las especies y su medio ambiente (Romero-Saritama & Pérez-Ruíz, 2016). Uno de estos rasgos es el tamaño de la semilla, un componente importante del rendimiento asociado con el vigor (Adkins et al., 2007). Otro, el peso de las semillas, rasgo asociado con el comportamiento de conservación y la capacidad de tolerar la deshidratación (Daws et al., 2005). Adicionalmente, el número de semillas por fruto es un rasgo básico y fundamental a conocer cuando se quieren llevar a cabo estrategias de conservación *ex situ* (Romero-Saritama & Pérez-Ruíz, 2016).

Lachemilla Focke (Rydb.) es un grupo morfológicamente muy variable (Morales & Tank, 2019). Sin embargo, entre especies los frutos y semillas parecen tener similares dimensiones. Los frutos varían entre 1.56 - 2.33 x 0.92 - 1.40 mm y las semillas entre 0.77 - 0.93 x 0.52 - 0.60 mm. Morales-Briones (2016) describe morfológicamente a *Lachemilla mexiquense*, presentando a sus frutos como aquenios ovoide-globosos de 0.9 - 1.1 x 0.6 - 0.8 mm, y a sus semillas como rosadas, ovadas y de 0.7 - 0.8 x 0.4 - 0.6 mm. Este pequeño tamaño de las semillas suele ser común en especies de hábitats perturbados, como lo es el páramo (Fenner, 2000). De manera que, todas las semillas del género *Lachemilla* presentan aproximadamente las mismas

dimensiones, considerando que el tamaño de las semillas no varía mucho entre especies (Basra, 2007; Fenner, 2000).

Varios estudios mencionan que el tamaño de la semilla determina en parte el número de semillas que se pueden producir, debido a que las plantas asignan una proporción relativamente fija de sus recursos a las semillas, existiendo una compensación entre el tamaño y el número de semillas (Basra, 2007; Fenner & Thompson, 2005). En este trabajo, se puede observar una relación directa entre el tamaño del fruto, el número de semillas por fruto y el tamaño de la semilla. En el caso de *L. holosericea*, las semillas más pequeñas se encuentran en mayor cantidad y el fruto es el más grande. Por otro lado, en *L. mandoniana* se encuentra una menor cantidad de semillas de mayor tamaño y el fruto es el más pequeño.

Pruebas de Viabilidad de las Semillas

El género *Lachemilla* se encuentra en constante floración y fructificación a lo largo del año (Samaniego, 2014). Y cada planta presenta una vasta cantidad de frutos. Sin embargo, a pesar de existir una enorme cantidad de semillas, solo del 24 - 35% se encuentran en buen estado. Las semillas vacías implican que su pericarpio ha crecido hasta su tamaño completo, pero no se ha producido el crecimiento del embrión (Renison et al., 2004). Demostrando que existe una relación entre la cantidad de semillas producidas y su desarrollo embrionario.

En la prueba de viabilidad, una solución incolora de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TZ) se utiliza como indicador (ISTA, 2016). Esta prueba correlaciona la viabilidad de la semilla con la alteración del color en su tejido (Souza et al., 2010). En esta reacción de oxidación-reducción, se reduce el TZ al colorante rojo formazán, cuya presencia indica respiración mitocondrial y permite la diferenciación entre tejido vivo de color rojo y tejido muerto incoloro (Bhojwani & Dantu, 2013).

Este es el primer estudio de viabilidad en especies del género *Lachemilla*, obteniendo valores entre 59-65%. Otros estudios se han realizado en varias especies altoandinas de la familia Rosaceae como: *Hesperomeles goudotiana* (Decne.) Killip, obteniendo un $61.3 \pm 7.7\%$ (Mancipe-Murillo et al., 2018). *Polylepis australis* Bitter con $23.0 \pm 15.7\%$ (Renison et al., 2004). *Polylepis incana* Kunth con 2.3% y *Polylepis pauta* Hieron con 6.0% (Cierjacks et al., 2008).

Pruebas de Desinfección de Semillas

La desinfección del material vegetal es el paso más importante del protocolo de cultivo de tejidos, aquí se intenta eliminar los contaminantes microbianos, dándole al explante la posibilidad de sobrevivir *in vitro* (Silva et al., 2015). Para esta prueba, se utilizó hipoclorito de sodio, el cual cumple con muchos requisitos de un desinfectante ideal, tiene una excelente acción de limpieza y se combina fácilmente con otros elementos de limpieza y detergentes (Fukuzaki, 2006). En general, utilizar bajas concentraciones de NaClO (1 – 5%) es suficiente para eliminar hongos de la superficie de las semillas (Escamilla et al., 2019). Por lo que, el utilizar NaClO al 2% fue idóneo para obtener los mejores resultados de desinfección.

Además, las semillas del género *Lachemilla* se encuentran dentro de un fruto aquenio que tiene adaptaciones para la dispersión por hidrocoria (Melcher et al., 2000). Es decir, dispersan sus frutos a través del agua por su capacidad de flotar (Vargas & Perez-Martínez, 2017). Debido a esto, sus semillas están protegidas de factores externos, como tierra o lluvia, y al ser un fruto seco, no presentan mayores inconvenientes con la desinfección, a comparación de otras especies dentro de la familia Rosaceae con frutos carnosos (Cárdenas, 2014; Vaccari, 2017).

La especie que presentó mayor contaminación ($6.7 \pm 6\%$) fue *L. mandoniana*, esto puede deberse al ser una hierba semiacuática y crecer en zonas húmedas (Pedraza et al., 2004).

El material vegetal que crece en el suelo suele ser más difícil de limpiar que el material vegetal aéreo (Smith, 2012). Mientras que para *L. holosericea*, *L. hispidula* y *L. nivalis* se logró obtener un 0% de contaminación, al ser una hierba cespitosa y subarbustos, respectivamente (Romoleroux, 2016).

Pruebas de Germinación *in vitro* de Semillas

Los mejores resultados de germinación *in vitro* en las cuatro especies del género *Lachemilla* se observaron en los tratamientos que se mantuvieron a temperatura ambiente (T2 y T5), en un rango de 9 a 20°C según los datos recopilados de INAMHI (2021). Estos porcentajes de germinación se relacionan con los porcentajes de viabilidad, donde *L. mandoniana* obtuvo la mayor viabilidad y germinación a temperatura ambiente, con 65% y $63.3 \pm 10.4\%$, respectivamente. Por otro lado, el mantener una temperatura constante de 5°C (T1 y T4) o 30°C (T3 y T6) no pareció ser muy favorable para estas especies.

Pérez-Martínez (2014) realizó un estudio similar de propagación por semilla con 13 especies de páramo utilizando termoperíodo y fotoperíodo de 12 horas; las temperaturas probadas fueron: 10/5°C, 20/10°C y 30/20°C, donde sus resultados muestran que la temperatura óptima para 9 de estas 13 especies fue de 20/10°C. Corroborando que para realizar estudios de germinación en especies del páramo, lo mejor es simular las condiciones de temperatura del día y la noche que son altamente contrastantes, como la temperatura del Parque Nacional Cayambe Coca que varía de acuerdo a su altitud con valores desde 5 a 25 °C (Díaz-Granados et al., 2005; Martinez & Alexander, 2021; Meza, 2016).

Otros estudios de germinación se realizaron por Cindrić (2016) en especies del género *Alchemilla*, planta herbácea de la familia Rosaceae que crecen en alta montaña, antiguamente se consideraba a *Lachemilla* dentro de este género, hasta que fue separado (Gaviria, 1997;

Gorgorov et al., 2011; Romoleroux, 2009). En este estudio, trabajaron con *Alchemilla vulgaris* L. y *Alchemilla velebitica* Borbás ex Janch donde incubaron semillas a un fotoperíodo de 16/8 y una temperatura de 25 ± 2 °C. Allí se encontró una germinación de semillas deficiente y poco confiable en ambas especies con valores de 10% para *A. velebitica* y 20% para *A. vulgaris* (Cindrić, 2016).

El siguiente parámetro evaluado en la germinación fue la influencia de la luz. Los resultados obtenidos mostraron que la germinación de semillas incubadas en oscuridad se redujo en todas las especies. Esto representaría que las semillas de: *L. holosericea*, *L. mandoniana* y *L. nivalis* son fotoblásticas positivas (requieren luz para germinar); mientras *L. hispidula* puede ser fotoblástica neutra (neutrales a la luz) (El-Keblawy, 2017).

Las semillas fotoblásticas positivas son comunes en las plantas herbáceas que producen una gran cantidad de semillas con muy poca materia alimenticia de reserva (Kathpalia & Bhatla, 2018). Además, varios modelos teóricos y estudios empíricos han informado que las semillas más pequeñas tienden a ser positivamente fotoblásticas, y que sufren una mayor mortalidad de plántulas en condiciones de sombra (El-Keblawy, 2017; M. Fenner, 2000).

Finalmente, en los páramos existe una enorme variedad de especies que no han sido documentadas ni estudiadas a profundidad, por lo que, el presente trabajo representa el uso de la biotecnología como herramienta clave para el estudio, análisis y conservación de especies vegetales. A partir de aquí, se marca el inicio de futuras investigaciones en cultivo *in vitro* para especies pertenecientes a zonas amenazadas en el Ecuador, lo que ayudará a la conservación y protección de la flora del páramo, por medio de técnicas como el establecimiento de bancos de germoplasma o la obtención de códigos genéticos.

Capítulo VI: Conclusiones

- Esta investigación es el primer estudio de germinación *in vitro* en especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) en Ecuador.
- Las cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydb. presentan frutos aquenios ovalados con dimensiones entre 1.56 - 2.33 x 0.92 - 1.40 mm y un peso entre 32.89 a 92.05 mg/100 frutos. Las semillas son semiovoides y miden entre 0.77 - 0.93 x 0.52 - 0.60 mm, con un peso de 7.87 a 10.61 mg/100 semillas.
- El tratamiento óptimo de desinfección para *L. hispidula*, *L. holosericea* y *L. nivalis* fue utilizando una solución de NaClO al 2% y 10 minutos de tiempo de inmersión; mientras que *L. mandoniana* necesita NaClO al 2% y 15 minutos de tiempo de inmersión.
- El tratamiento con los mejores resultados de germinación *in vitro* fue a temperatura ambiente (9-20°C) y fotoperiodo de 12h, obteniendo los mayores porcentajes de germinación al menor tiempo de sembrado para las cuatro especies del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg tratadas en este estudio.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Realizar más estudios sobre los rasgos funcionales de las semillas como: características morfológicas, fisiológicas y fenológicas, que están relacionados con su desarrollo y adaptación a su entorno natural.
- Realizar nuevos estudios de viabilidad en las semillas de las especies descritas, variando la concentración de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio y el tiempo de incubación para encontrar un método más óptimo.
- Utilizar medios enriquecidos o ácido giberélico en los medios de cultivo, para obtener un mayor crecimiento de las plántulas.
- Realizar pruebas con diferentes termoperiodos y fotoperiodos, para determinar efectivamente el rango de temperatura ideal para la germinación *in vitro* de las semillas.

Bibliografía

- Adkins, S. W., Navie, S. C., & Ashmore, S. (2007). *Seeds: biology, development and ecology*. CABI.
- Aguirre, N., Ojeda-Luna, T., Eguiguren, P., & Aguirre-Mendoza, Z. (2015). Cambio climático y Biodiversidad: Estudio de caso de los páramos del Parque Nacional Podocarpus, Ecuador. *Loja, Ecuador: Programa de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos. Universidad Nacional de Loja*.
- Aguirre, N., Torres, J., & Velasco, P. (2013). Guía para la restauración ecológica en los páramos del Antisana. *Volumen I, 9-13 Pp. Quito, Ecuador: Fondo de Protección Del Agua FONAG*.
- Álvarez, R., Hernández Reyes, R., Vargas Hernández, G., & Tovar Jimenez, X. (2020). Los géneros Alchemilla y Lachemilla: revisión de estudios fitoquímicos, farmacológicos y potencial terapéutico. *Laboratorio de Tecnología de Compuestos Bioactivos*.
- Amador, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de Ferocactus (Cactaceae). *Polibotánica, 35*, 109–131.
- Ashworth, S., Cavagnaro, D., & Whealy, K. (2002). *Seed to Seed Seed Saving and Growing Techniques for Vegetable Gardeners* (2 Edition).
- Ayala, L., Villa, M., Mendoza, Z. A., & Mendoza, N. A. (2014). Cuantificación del carbono en los páramos del parque nacional Yacuri, provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador. *Cedamaz, 4*(1).

- Ayca, D., & Arias, J. L. (2012). *Evaluación de la toxicidad aguda y efecto diurético del Lachemilla pinnata en animales de experimentación.*
- Basantes, D. A. (2010). *La aplicación de la Ley forestal y de conservación de áreas naturales y vida silvestre, para controlar la degradación de los páramos del Cantón Tisaleo, Provincia de Tungurahua, durante el período 2008-2009.*
- Basra, A. S. (2007). *Handbook of seed science and technology.* Scientific Publishers.
- Beltrán, K. (2011). Distribución Espacial y Caracterización Florística de los Páramos del Ecuador. *PARAMUNDI 2 Congreso Mundial de Páramos. Vida En Las Alturas.*
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., Cárdenas, A., & Velastegui, A. (2009). Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador. In *academia.edu*. Proyecto Páramo Andino y Herbario QCA. Quito.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.*
- Caranqui, J., Lozano, P., & Reyes, J. (2016). Composición y diversidad florística de los páramos en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, Ecuador. *Enfoque UTE*, 7(1), 33–45.
http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422016000100033
- Cárdenas, A. M. (2014). *Guía práctica de cultivo in vitro de especies vegetales (Bachelor's thesis).*
- Carrillo, G., Silva, B., Rollenbeck, R., Célleri, R., & Bendix, J. (2019). The breathing of the Andean highlands: Net ecosystem exchange and evapotranspiration over the páramo of southern Ecuador. *Agricultural and Forest Meteorology*, 265, 30–47.

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA, Uruguay*.
- Cierjacks, A., Rühr, N. K., Wesche, K., & Hensen, I. (2008). Effects of altitude and livestock on the regeneration of two tree line forming *Polylepis* species in Ecuador. *Plant Ecology*, *194*(2), 207–221.
- Cindrić, J. (2016). Metode uzgoja i svojstva različitih vrsta vrkute (*Alchemilla* spp.). *Odjel Za Biologiju*. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:102686>
- Cottrell, H. J. (1948). Tetrazolium salt as a seed germination indicator. *Annals of Applied Biology*, *35*(1), 123–131.
- Cuesta, F., Sevink, J., Llambí, L., De Bièvre, B., & Posner, J. (2014). Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos. *CONDESAN. Quito, Ecuador*.
- Daws, M. I., Garwood, N. C., & Pritchard, H. W. (2005). Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panamá: some ecological implications. *Functional Ecology*, *19*(5), 874–885.
- Díaz, G. J. (2010). *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.
- Díaz-Granados, M. A., Navarrete González, J. D., & Suárez López, T. (2005). Páramos: Sensitive Hydrosystems. *Revista de Ingeniería*, *22*, 64–75.
- Eguiguren, P., Santín, A., Vidal, E., & Aguirre, N. (2015). Reservorios de carbono en los páramos del Parque Nacional Podocarpus. *Cambio Climático y Biodiversidad: Estudio de Caso de Los*

Páramos Del Parque Nacional Podocarpus, Ecuador. Programa de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos, Universidad Nacional de Loja, 211–225.

- El-Keblawy, A. (2017). Germination response to light and temperature in eight annual grasses from disturbed and natural habitats of an arid Arabian desert. *Journal of Arid Environments*, 147, 17–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.08.002>
- Escamilla, D., Rosso, M. L., & Zhang, B. (2019). Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. *Food Science & Nutrition*, 7(10), 3194–3205.
- Fay, M. F. (1994). In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity & Conservation*, 3(2), 176–183.
- Fenner, M. (2000). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Cabi.
- Fenner, M. K., & Thompson, K. (2005). *The ecology of seeds*. Cambridge University Press.
- Fernández, D., Palacios, W., Freire, E., & Cevallos, M. P. (2015). *Plantas de los Páramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador*.
<https://www.researchgate.net/publication/303289702>
- Fiallos, V. H. (2010). *Alternativas para el manejo de páramos en la Parroquia Pasa del cantón Ambato*. Quevedo: UTEQ.
- Focke, W. O. (1888). Alchemilla. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 3, 43.
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157.

- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 37(3), 5–30.
- Gaviria, J. (1997). Sinópsis del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) para Venezuela. *Plantula*, 1(3), 189–212.
- Gehrke, B., Bräuchler, C., Romoleroux, K., Lundberg, M., Heubl, G., & Eriksson, T. (2008). Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) inferred from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with comments on generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(3), 1030–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.004>
- González, T. I. (2011). *Análisis de metabolitos secundarios de Lachemilla orbiculata (Ruiz & Pavón) Rydb. (Rosaceae) en dos localidades de los Andes del Ecuador*.
- González, T. I., Romoleroux, K., & Malagón, O. (2012). Análisis Cromatográfico y RMN de *Lachemilla orbiculata* en Dos Localidades de los Andes Ecuatorianos. *International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products 1030*, 31–38.
- Gorgorov, R., Stanilova, M., & Vitkova, A. (2011). In vitro cultivation of some endemic and rare *Alchemilla* species in Bulgaria. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6).
- Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (1975). *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall.
- Hofstede, R., Coppus, R., Vásquez, P. M., Segarra, P., Wolf, J., & Sevink, J. (2002). El estado de conservación de los páramos de pajonal en el Ecuador. *Ecotropicos*, 15(1), 3–18.

- Hummer, K. E., & Janick, J. (2009). Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In *Genetics and genomics of Rosaceae* (pp. 1–17). Springer.
- INAMHI. (2021, October). *Red de Estaciones Automáticas Hidrometeorológicas*.
<http://186.42.174.236/InamhiEmas/#>
- ISTA. (2016). International Rules for Seed Testing. *International Rules for Seed Testing*, 284(1), 1–384. <https://doi.org/10.15258/istarules.2016.f>
- Kalkman, C. (2004). Rosaceae. In *Flowering plants: dicotyledons* (pp. 343–386). Springer.
- Kathpalia, R., & Bhatla, S. C. (2018). Seed Dormancy and Germination. In *Plant Physiology, Development and Metabolism* (pp. 885–906). Springer.
- León Gordón, O. A. (2014). *Valoración del almacenamiento de agua y carbono entre las zonas intervenidas y no intervenidas de los humedales del Paramo de Sachahuayco del cantón Mocha*.
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitmam, N., Endara, L., Ulloa Ulloa, C., & Navarrete, H. (2019). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. Publicaciones Del Herbario QCA.
<<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>>.
- Leva, A., & Rinaldi, L. (2012). *Recent advances in plant in vitro culture*.
- MAE. (2018). *Actualización del plan de manejo del Parque Nacional Cajas*.
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., & Pérez-Martínez, L. V. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio / Assessment of seed viability of 17 high andean tropical species by germination and tetrazolium tests. *Caldasia*, 40(2), 366–382.

- Martinez, C., & Alexander, D. (2021). *Elaboración de un Book Trip interactivo con contenido multimedia ecoturístico en el Parque Nacional Cayambe Coca.*
- Melcher, I. M., Bouman, F., & Cleef, and A. M. (2000). Seed dispersal in páramo plants: epizoochorous and hydrochorous taxa. *Plant Biology*, 2(01), 40–52.
- Mena, V., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). Los Páramos del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas. In *portalces.org*. Abya Yala y Proyecto Páramo.
- Meza, J. E. (2016). *Efecto de la intervención antrópica en la situación territorial del parque Nacional Cayambe Coca, mediante herramientas SIG 2015.*
- Morales, D., & Tank, D. C. (2019). Extensive allopolyploidy in the neotropical genus *Lachemilla* (Rosaceae) revealed by PCR-based target enrichment of the nuclear ribosomal DNA cistron and plastid phylogenomics. *American Journal of Botany*, 106(3), 415–437.
- Morales, J. A., & Estévez, J. V. (2006). El páramo: ¿Ecosistema en vía de extinción? *Revista Luna Azul (On Line)*, 22, 1-de.
- Morales-Briones, D. F. (2016). *Lachemilla mexiquense* (Rosaceae), a new species from Mexico. *PhytoKeys*, 62(1), 25–32. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.62.7953>
- Morocho, C. C., & Chunchu, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71–83.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858.
- Pedraza, P., Betancur, J. B., & Rosselli, P. F. (2004). *Chisacá, un recorrido por los páramos andinos*. Inst. de Ciencias Naturales, Univ. Nacional de Colombia.

- Pérez-Martínez, L. V., Rodríguez, N. A., Melgarejo, L. M., & Vargas, R. O. (2014). Propagación por semilla de 13 especies de páramo. *Semillas de Plantas de Páramo: Ecología y Métodos de Germinación Aplicados a La Restauración Ecológica*. Bogotá, DC: Universidad Nacional de Colombia, 115–124.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science & business media.
- Podwojewski, P. (1999). Los suelos de las altas tierras andinas: los páramos del Ecuador. *Bol Soc Ecuator Cie Suelo*, 18(9), 14.
- Renison, D., Hensen, I., & Cingolani, A. M. (2004). Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Polylepis australis* mountain forests of central Argentina. *Forest Ecology and Management*, 196(2–3), 327–333.
- Reyes, A. P., Ramos, P. C., López, S. A., & López, I. H. (2015). Estudio de la diversidad florística del páramo de la comunidad Guangopud, Provincia Chimborazo, Ecuador. *REVISTA PERSPECTIVA*, 16(1–2).
- Ríos, M., & Cadenas, D. (2005). Variaciones en las características morfológicas de las especies del páramo que es condicones de luz y temperatura. *ECOLOGIA TROPICAL & CONSERVACION*, 65.
- Romero-Saritama, J. M., & Pérez-Ruíz, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*, 25(2), 59–65.
- Romoleroux, K. (2004). The genus *Lachemilla* (Rosaceae) in the northern Andes of South America. *Lyonia*, 7(1), 21–32.

- Romoleroux, K. (2009). New Species of *Lachemilla* (Rosaceae) from South America. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 19(4), 502–506. <https://doi.org/10.3417/2006054>
- Romoleroux, K. (2014). *Análisis cromatográfico y RMN de lachemilla orbiculata en dos localidades de los andes ecuatorianos*.
- Romoleroux, K. (2016). *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<https://books.google.com.ec/books?id=YX3YswEACAAJ>
- Romoleroux, K. (2017). *Familia: Rosaceae*. Libro Rojo de Plantas Endémicas Del Ecuador. Publicaciones Del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Quito.
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019a). *Lachemilla holosericea*. Plantas Vasculares de Los Bosques de Polylepis En Los Páramos de Oyacachi.
[https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla holosericea](https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla%20holosericea)
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019b). *Lachemilla mandoniana*. Plantas Vasculares de Los Bosques de Polylepis En Los Páramos de Oyacachi.
[https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla mandoniana](https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla%20mandoniana)
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019c). *Lachemilla nivalis*. Plantas Vasculares de Los Bosques de Polylepis En Los Páramos de Oyacachi.
[https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla nivalis](https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Lachemilla%20nivalis)
- Rothmaler, W. (1937). Systematische Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Alchemilla* (L.) Scop. VII. Aufteilung der Gattung und Nomenklatur. *Repertorium Novarum Specierum Regni Vegetabilis*, 42(11-15), 164–173.

- Rydberg, P. A. (1908). *Alchemilla, Aphanes, Lachemilla, Zygalthemilla* (Rosaceae). *North American Flora*, 22, 377–385.
- Sabogal, A., & Quinteros, Y. (2013). Diversidad vegetal y uso antrópico de los páramos de Samanga (Sectores Espíndola y El Toldo) y San Juan de Cachiaco (Caseríos San Juan y Totorá), Ayabaca, Piura. *Ecología Aplicada*, 12(1), 9–17.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162013000100002&script=sci_arttext
- Samaniego, F. (2014). *Biología reproductiva de Lachemilla hirta (LM Perry) Rothm. y Lachemilla hispidula (LM Perry) Rothm. en los Páramos de Oyacachi*. PUCE.
- Sharry, S. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E., Potter, D., & Veilleux, R. E. (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. In *Plant Physiology* (Vol. 147, Issue 3, pp. 985–1003). <https://doi.org/10.1104/pp.107.115618>
- Silva, J. A. T., Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of Anthurium. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14.
- Sklenář, P., & Balslev, H. (2005). Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 416–433.
- Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.
- Souza, C. R. de, Ohlson, O. de C., Gavazza, M. I. A., & Panobianco, M. (2010). Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(3), 163–169.

- Tanguila, N. N., & Pico, J. D. (2020). *Plan de restauración ecológica para mitigar Los Impactos Ambientales del Cerro Puñalica del Cantón Tisaleo, Provincia de Tungurahua.*
- Vaccari, M. C. (2017). *Desinfección de frutillas y zarzamoras frescas por nebulización con ácido peracético.*
- Vargas, O. (2013). Disturbios en los páramos andinos. *Visión Socioecosistémica de Los Páramos y La Alta Montaña Colombiana: Memorias Del Proceso de Definición de Criterios Para La Delimitación de Páramos*, 39–57.
- Vargas, O., & Perez-Martínez, L. (2017). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica.* Bogotá: La universidad,.

