



**“Establecimiento *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana”**

Balseca Campaña, Karol Denisse

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Ingeniería en Biotecnología

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

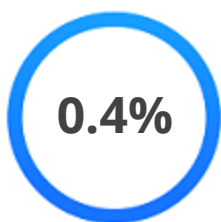
PhD. Jadán Guerrero, Mónica Beatriz

18 de Agosto del 2022



## Tesis Karol Balseca.docx

Scanned on: 16:42 July 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	26
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	20
Omitted Words	2286



Firmado electrónicamente por:  
**MONICA BEATRIZ  
JADAN GUERRERO**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación: **“Establecimiento *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana”** fue realizado por la señorita **Balseca Campaña, Karol Denisse**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 28 de julio 2022**



Firmado electrónicamente por:  
**MONICA BEATRIZ  
JADAN GUERRERO**

**Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.**

C. I. 1802278562



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Karol Denisse Balseca Campaña**, con cédula de ciudadanía n° 1726608019, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Establecimiento *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana**" 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.

**Sangolquí, 22 de julio de 2022**

**Balseca Campaña Karol Denisse**

C.I.: 1726608019



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Balseca Campaña Karol Denisse**, con cédula de ciudadanía n° 1726608019, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Establecimiento *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 22 de julio de 2022**

**Balseca Campaña, Karol Denisse**

C.I.: 1726608019

**Dedicatoria**

*A mi familia que siempre estuvo apoyándome en los buenos y malos momentos*

*A mis padres quienes me educaron e hicieron que sea la persona que soy hoy*

*A mis hermanas que son mis mejores amigas y me apoyaron en todo*

*A mis profesores quienes me guiaron en la vida estudiantil*

*A mis amigos quienes me dieron su apoyo*

*A mis compañeros de Laboratorio*

*A Luna*

*Karol Denisse Balseca Campaña*

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por poner en vida a personas que han servido como guía y apoyo en cada uno de los momentos de mi vida.

Agradezco a mi familia que siempre estuvo apoyándome en los buenos y malos momentos, especialmente a mis padres Carlos y Sonia por educarme, amarme y formar la persona que soy ahora.

Agradezco a mis hermanas Lorena y Alejandra quienes han sido mis mejores amigas y me han apoyado siempre.

A Paul P. por su apoyo en todo momento.

A mis profesores por impartirme sus conocimientos.

A las Doctoras Mónica Jadán y Claudia Segovia por apoyarme durante la elaboración de la tesis.

Al FONAG por brindarme su apoyo en la elaboración de esta investigación.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos-ESPE por abrirme sus puertas y apoyarme.

A mis amigos y compañeros por ser un apoyo durante el camino de la vida universitaria.

A Luna por darme su amor y cariño.

Gracias a todos ustedes, no hubiera culminado esta importante etapa de mi vida sin ustedes.

## Índice de Contenido

Resultados del Análisis de Copyleaks .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización .....	5
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras .....	14
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo 1: Introducción.....	18
Formulación del Problema .....	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos de la Investigación .....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos .....	21
Hipótesis.....	21
Capítulo 2: Marco Teórico .....	22
Páramo .....	22
Subpáramo .....	23
Páramo de Pasto o Páramo de Pajonal.....	23
Superpáramo.....	23



Género <i>Werneria</i> .....	24
<i>Werneria nubigena</i> Kunth .....	24
Distribución Geográfica .....	25
Importancia Ecológica .....	26
Estado de Conservación .....	27
Propagación.....	28
Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales.....	29
Consideraciones Generales .....	29
Etapas del Cultivo in vitro .....	37
Restauración Ecológica y Conservación de Especies Vegetales .....	39
Capítulo 3: Materiales y Métodos .....	41
Localización Geográfica.....	41
Fase de campo .....	41
Fase de Laboratorio .....	41
Recolección de muestra.....	42
Preparación de muestra.....	42
Desinfección.....	42
Preparación de Medio de Cultivo .....	42
Condiciones de incubación de cultivo in vitro .....	42
Ensayo de Desinfección.....	42
Evaluación .....	43

	10
Germinación .....	43
Preparación de Medio de Cultivo .....	43
Ensayo de Germinación .....	44
Evaluación .....	45
Multiplicación.....	45
Preparación de Medio de Cultivo .....	45
Ensayo de Multiplicación.....	45
Evaluación .....	46
Enraizamiento .....	47
Preparación de Medio de Cultivo .....	47
Ensayo de Enraizamiento .....	47
Análisis Estadístico .....	47
Capítulo 4: Resultados .....	49
Etapa de Desinfección .....	49
Análisis Exploratorio .....	49
Análisis Inferencial.....	50
Etapa de Germinación .....	52
Análisis Exploratorio .....	52
Análisis Inferencial.....	53
Etapa de Multiplicación .....	57
Análisis Exploratorio .....	57

	11
Análisis Inferencial.....	58
Análisis Exploratorio .....	62
Etapa de Enraizamiento.....	65
Análisis Exploratorio .....	65
Capítulo 5: Discusión .....	69
Etapa de Desinfección .....	69
Etapa de Germinación .....	71
Etapa de Multiplicación´ .....	72
Etapa de Enraizamiento.....	74
Capítulo 6: Conclusiones y Recomendaciones.....	76
Conclusiones.....	76
Recomendaciones .....	77
Bibliografía .....	78

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> <i>Taxonomía de Werneria nubigena</i> Kunth.....	25
<b>Tabla 2.</b> <i>Composición de Medios Murashige &amp; Skoog (MS)</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> <i>Tratamientos de desinfección para semillas de Werneria nubigena</i> Kunth.....	43
<b>Tabla 4.</b> <i>Tratamientos de germinación para semillas de Werneria nubigena</i> Kunth .....	44
<b>Tabla 5.</b> <i>Tratamientos de multiplicación para plántulas de Werneria nubigena</i> Kunth...	46
<b>Tabla 6.</b> <i>Tratamientos de enraizamiento para plántulas de Werneria nubigena</i> Kunth..	47
<b>Tabla 7.</b> <i>Análisis de Varianza respecto a las variables contaminación y germinación</i> ...	50
<b>Tabla 8.</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a la variable contaminación y germinación</i> .....	51
<b>Tabla 9.</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis análisis variables contaminación y germinación</i> .....	51
<b>Tabla 10.</b> <i>Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de desinfección</i> .....	52
<b>Tabla 11.</b> <i>Análisis de Varianza respecto a las variables germinación y longitud</i> .....	54
<b>Tabla 12.</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables germinación y longitud</i> .....	55
<b>Tabla 13.</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis análisis variables germinación y longitud</i> .....	55
<b>Tabla 14.</b> <i>Análisis de Varianza respecto a las variables dependientes inducción de brotes, número de brotes por explantes, callo y longitud del explante</i> .....	59
<b>Tabla 15.</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables inducción de brotes, número de brotes por explante, callo y longitud</i> .....	59
<b>Tabla 16.</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de multiplicación para las variables inducción de brotes, número de brotes por explante y callo</i> .....	60
<b>Tabla 17.</b> <i>Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de multiplicación</i> .....	60

<b>Tabla 18.</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables número de brotes por explante, callo y longitud del explante</i> .....	62
<b>Tabla 19.</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de multiplicación para las variables número de brotes por explante, callo y longitud del explante</i> .....	63
<b>Tabla 20.</b> <i>Test de comparaciones múltiples entre subcultivos para la inducción de callo</i> .....	63
<b>Tabla 21.</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables inducción de raíces, número de raíces por explante, oxidación y longitud(cm)</i> .....	66
<b>Tabla 22.</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de desinfección para las variables inducción de raíces, número de raíces por explante, oxidación y longitud de raíces (cm)</i> .....	67
<b>Tabla 23.</b> <i>Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de enraizamiento</i> ....	67

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Zonas de vegetación de los Andes</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> <i>Werneria nubigena</i> Kunth .....	25
<b>Figura 3.</b> <i>Distribución geográfica de Werneria nubigena</i> Kunth a nivel continental y regional.....	26
<b>Figura 4.</b> <i>Semillas de Werneria nubigena</i> Kunth.....	28
<b>Figura 5.</b> <i>Estructuras de los reguladores de crecimiento (Auxinas)</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> <i>Estructuras de las hormonas vegetales (Citoquininas)</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> <i>Estructuras de las hormonas vegetales (Giberelinas)</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> <i>Ubicación del Área de Conservación Hídrica Antisana</i> .....	41
<b>Figura 9.</b> <i>A) Semillas de Werneria nubigena</i> Kunth <i>B) Embriones de Werneria nubigena</i> Kunth.....	44
<b>Figura 10.</b> <i>Planta obtenida previa a ser introducida en la etapa de multiplicación</i> .....	46
<b>Figura 11.</b> <i>Contaminación fúngica, bacteriana y germinación</i> .....	49
<b>Figura 12.</b> <i>Análisis del porcentaje de contaminación y germinación</i> .....	50
<b>Figura 13.</b> <i>Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos de desinfección</i> .....	52
<b>Figura 14.</b> <i>Porcentajes de semillas germinadas</i> .....	53
<b>Figura 15.</b> <i>Plantas germinadas (30 días)</i> .....	54
<b>Figura 16.</b> <i>Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos para las variables germinación</i> .....	56
<b>Figura 17.</b> <i>Plantas obtenidas en los diferentes tratamientos de germinación (30 días).</i>	56
<b>Figura 18.</b> <i>Porcentaje de inducción de brotes</i> .....	57
<b>Figura 19.</b> <i>Inducción de brotes</i> .....	58
<b>Figura 20.</b> <i>Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos para multiplicación</i> .....	61

<b>Figura 21.</b> <i>Inducción de callos por cada subcultivo</i> .....	62
<b>Figura 22.</b> <i>Comparación de las medias según el número de subcultivos</i> .....	64
<b>Figura 23.</b> <i>Plántulas subcutivadas</i> .....	65
<b>Figura 24.</b> <i>Porcentaje de explantes A) enraizados B) oxidados</i> .....	67
<b>Figura 25.</b> <i>Enraizamiento</i> .....	67
<b>Figura 26.</b> <i>Comparación de las medias según los tratamientos de enraizamiento</i> .....	68

## Resumen

Los páramos son importantes fuentes de agua requerida para el consumo urbano, agrícola, industrial y energético, sin embargo, las actividades antropogénicas están causando su degradación, es por esto que algunas instituciones públicas como la EPMAPS-FONAG pretenden conservarlos. Para ello han establecido métodos de restauración como el cultivo *in vitro*, utilizando plantas nativas o endémicas del lugar que se adapten a zonas degradadas; una de las especies utilizadas es *Werneria nubigena* Kunth, localizada principalmente en los páramos y pastizales andinos. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo *in vitro* para *Werneria nubigena* Kunth, con miras a los procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana, para lo cual se establecieron varios protocolos de las diferentes etapas del cultivo *in vitro*. Para la etapa de desinfección se determinó que el uso de cloro al 6% durante 7,5 min (D2) fue óptimo para la desinfección y germinación de semillas; en la etapa de germinación se estableció que la eliminación de la cubierta de la semilla aumentó el porcentaje de germinación, y el tratamiento G4 [MS+1/2 AG3] permitió obtener plantas altas y robustas. Durante la etapa de multiplicación, el tratamiento M4 indujo la formación de brotes en 50% de los explantes introducidos con la formación de 1,9 brotes por explante; adicionalmente. Se determinó, además, que el tratamiento E2 con concentración de AIA [1mg/L] permitió obtener 67% de brotes enraizados con una longitud promedio de 0,37cm, dados estos resultados se estableció este tratamiento como el mejor para la fase de enraizamiento.

*Palabras clave:* Restauración, cultivo *in vitro*, *Werneria nubigena* Kunth, protocolo.



### Abstract

The paramo are important sources of water, required for urban, agricultural, industrial and energy consumption, however, anthropogenic activities are causing their degradation, which is why some public institutions such as EPMAPS-FONAG intend to conserve them. For this, they have established restoration methods such as *in vitro* culture, using native or endemic plants of the place; One of the species used is *Werneria nubigena* Kunth, located mainly in the Andean paramos and grasslands. The objective of this research project was to establish an *in vitro* protocol for *Werneria nubigena* Kunth for ecological restoration processes in the Area de Conservación Hídrica Antisana, for which several protocols were established for the different stages of *in vitro* culture. For the disinfection stage, it was determined that the use of 6% chlorine for 7.5 min (D2) was optimal for seed disinfection and germination; in the germination stage it was established that the removal of the seed coat increased the germination percentage, and the G4 treatment [MS+1/2 AG3] allowed to obtain tall and robust plants. During the multiplication stage, the M4 treatment induced shoot formation in 50% of the introduced explants with the formation of 1.9 shoots per explant; additionally. It was also determined that the E2 treatment with IAA concentration [1mg/L] allowed to obtain 67% of rooted shoots with an average length of 0.37cm. Given these results, this treatment was established as the best for the rooting phase.

*Keywords:* Restoration, *in vitro* culture, *Werneria nubigena* Kunth, protocol.

## Capítulo 1: Introducción

### Formulación del Problema

Los páramos forman una ecorregión neotropical distribuida a lo largo de la cordillera de los Andes en Perú, Ecuador y Venezuela, situada por encima de la línea de bosque continuo y por debajo de la línea de nieve perpetua, aproximadamente entre los 3200 y 5 000 m s.n.m (Ramsay, 1992). Según Sevillano-Ríos *et al.* (2020), los páramos presentan altas cantidades de precipitaciones (> 3000 mm/año), clima frío y húmedo y suelos con gran acumulación de materia orgánica. Estas condiciones geológicas y climatológicas permiten la retención de agua, que es utilizada a nivel urbano, agrícola, industrial y energético. Además, su ubicación geográfica ha influenciado en el desarrollo de una gran diversidad de especies vegetales tales como matas (*Calamagrostis* ADANS, *Stipa* L.1753 y *Festuca* L.), parches de bosques (p. ej., *Polypepis* Ruiz & Pav.), rosetas (p.ej., *Werneria* Kunth, *Hypochaeris* L.), plantas de cojín (p.ej., *Azorella* LAM., *Plantago* L.), entre otros (Luteyn, 1999).

De acuerdo con la UICN (2010), el 60% de los páramos no se encuentran protegidos y lo restante se ve amenazado por el crecimiento poblacional que ha provocado fragmentación en los ecosistemas y cambios en la diversidad genética de algunas especies vegetales, ocasionando que únicamente el 25% de las áreas protegidas conserve su vegetación original. Además, se ha determinado que la agricultura ha afectado negativamente en la calidad del agua, ya que disminuye su caudal y aumenta la concentración de contaminantes químicos (Kleemann *et al.*, 2022; Matovelle, 2021)

## **Justificación del problema**

El área de Conservación Hídrica Antisana propiedad del EPMAPS-FONAG se encuentra ubicada en las provincias del Napo y Pichincha, en las parroquias de Pintag, Papallacta, Archidona y Cotundo, con una superficie de 8 487, 03 ha. Ésta área presenta una altitud mínima de 3 720 m s.n.m y máxima 4 760 m s.n.m por lo que, incluye varios ecosistemas pertenecientes a los páramos tropicales o andinos y los bosques nubosos (FONAG, 2018; Ramsay, 1992).

Los páramos ecuatorianos registran un total de 1524 especies de plantas vasculares, por lo que se los consideran con la flora más diversa de la región andina en relación con su superficie, sin embargo, estos ecosistemas son frágiles. Las actividades agrícolas, el pastoreo, los incendios forestales, el aumento de población, reforestación con especies exóticas, entre otros, han provocado cambios en el ambiente, afectando la reproducción de las plantas endémicas y nativas de la región, la captación de agua y retención de carbono (Chuncho & Chuncho, 2019; Vásconez & Hofstede, 2006).

El Fondo para la Protección del Agua (FONAG), fue creado en el año 2000 con el fin de conservar y mantener los páramos y humedales que sirven como cuencas hídricas ubicadas cerca del Parque Nacional Antisana, ya que gracias a ellos se pueden satisfacer las necesidades humanas y productivas de la población de Quito. Para realizar esto se creó “La guía para la restauración Ecológica en los páramos del Antisana”, en la cual se menciona sobre el uso de diversas estrategias de conservación como: Restauración Activa y Restauración Pasiva.

La restauración activa utiliza la intervención humana para introducir diversas plantas establecidas en determinado territorio con el fin de promover el desarrollo de los procesos de recuperación en áreas que han perdido sus mecanismos de regeneración; para lo cual, se deben utilizar especies que resistan las condiciones de fertilidad del suelo, las características

ambientales y que, al desarrollarse permitan atraer fauna consumidora (FONAG, 2018; Minambiente, s/f).

La especie *Werneria nubigena* Kunth, es una de las especies utilizadas en la restauración activa del Área de Conservación Hídrica Antisana (FONAG, 2018), ésta especie se caracteriza por la presencia de hojas largas y flores de color blanco, amarillo o rojo; ubicada especialmente en los páramos de almohadillas y pajonales (4101 m s.n.m a 3 900 m s.n.m) (Aguirre *et al.*, 2013; Minga *et al.*, 2016). Su importancia radica en que ayuda a mantener la biodiversidad de microatrópodos y otras especies vegetales, retiene alto contenido de humedad y materia orgánica en el suelo; y mitiga las perturbaciones que existen en el mismo (Hupp *et al.*, 2017). Además, sirve como alimento para animales silvestres como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus ustus* Zimmermann, 1780) y como hábitat para el conejo de páramo (*Sylvilagus andinus* (Thomas, 1897))(Albuja Viteri, 2007; Guano Vasco, 2016).

Por estas razones se debe recurrir a estrategias que faciliten la multiplicación y preservación de esta especie para su uso en aplicaciones de restauración ecológicas; una de estas estrategias es el cultivo *in vitro*, que se fundamenta en tomar una sección de una especie vegetal y colocarla en medio nutritivo, en donde se formará una o más plantas permitiendo así estudiarlas, propagarlas y conservarlas. Las ventajas de esta técnica son diversas, ya que requiere poco material vegetal para iniciar el cultivo, usa espacios reducidos y se pueden controlar los factores ambientales para aumentar la tasa de multiplicación (Alcantara *et al.*, 2017). Por ello, se deben instaurar protocolos en los que se establezcan los valores óptimos de los factores para el cultivo *in vitro* de cada especie e incluso genotipos.

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo General***

Establecer un protocolo *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana.

### ***Objetivos Específicos***

- Optimizar un protocolo de desinfección para semillas de *Werneria nubigena* Kunth.
- Estandarizar un protocolo para germinación de semillas de *Werneria nubigena* Kunth.
- Establecer un protocolo de multiplicación y enraizamiento a partir de explantes de *Werneria nubigena* Kunth.

### **Hipótesis**

El protocolo establecido del cultivo *in vitro* facilita la multiplicación de la especie *Werneria nubigena* Kunth.

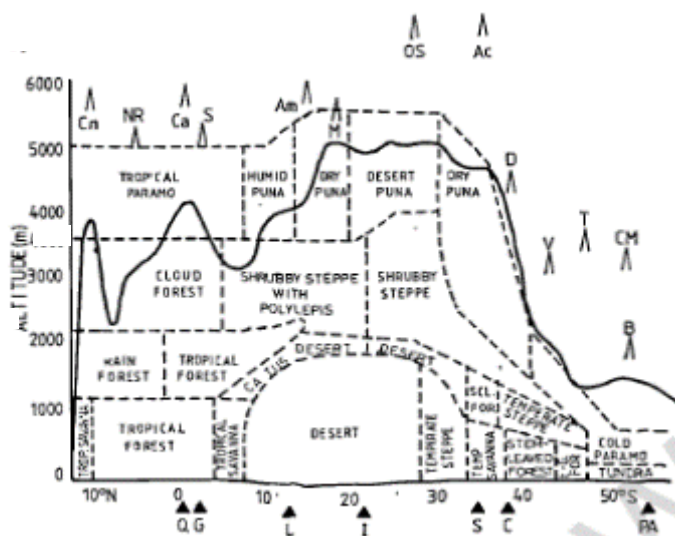
## Capítulo 2: Marco Teórico

### Páramo

Según la Real Academia Española (2021), la palabra páramo proviene del latín “parāmus” y se refiere a los ecosistemas ubicados en las regiones de los Andes, extendidos entre Colombia, Venezuela, Ecuador y el norte de Perú; situados por encima de la línea de bosque continuo (3 500-4 000 m s.n.m) y por debajo de la línea de nieve perpetua (4 400-4 900 m s.n.m) (Figura 1) (Christmann & Oliveras, 2020; Luteyn, 1999; Ramsay, 1992).

### Figura 1

*Zonas de vegetación de los Andes*



*Nota.* El páramo Tropical o Andino se encuentra ubicado a una altitud entre los 3 500 m s.n.m hasta los 5 000 m s.n.m. Tomado de The paramo vegetation of Ecuador por Ramsay, 1992.

Los páramos andinos, al presentar una amplia extensión longitudinal se encuentran expuestos a altas precipitaciones, cambios de temperatura y radiación ultravioleta, lo que ha generado que alberguen un gran número de especies de plantas y animales (Luteyn, 1999). Su distribución ha generado una estructura vertical interna compuesta por tres cinturones principales de vegetación: Subpáramo, Páramo de Pasto y Superpáramo (Christmann & Oliveras, 2020; Ramsay, 1992).

### **Subpáramo**

Se considera como la zona de transición entre el bosque nuboso y el páramo de pasto (Hofstede *et al.*, 2014), ubicado entre los 3 000-3 500 m s.n.m con un rango de temperatura entre 6°-12°C (Camacho, 2013). Es la zona más baja entre los tres cinturones de vegetación por lo que, es la más vulnerable a actividades antropogénicas como la quema de árboles, incendios forestales, actividades agropecuarias, entre otros., (Luteyn, 1999).

La distribución de especies vegetales provenientes del bosque nuboso y del páramo de pasto ha provocado que esta zona sea considerada como un importante reservorio de diversidad, conformada principalmente por vegetación arbustiva y matorrales cuyas especies vegetales predominantes forman parte de los géneros *Ilex*, *Ageratina*, *Baccharis*, *Chuquiragua*, *Gaultheria*, *Macleania*, *Vaccinum*, entre otros.,(Luteyn, 1999; Rodríguez Murcia & Rivera Ospina, 2011).

### **Páramo de Pasto o Páramo de Pajonal**

Se encuentra ubicado a una altitud entre los 3 500-4 100 m s.n.m, su vegetación es continua con una cobertura vegetal del 100%. Se compone principalmente de pastizales de matas o racimos dominados por especies de *Calamagrotis* y/o *Festuca*. En los racimos de pastos existen diversas especies pequeñas de hierbas, plantas en roseta acaulescentes (*Werneria*), arbustos y plantas de cojín. En las comunidades rocosas y acantilados se encuentran las especies *Draba* spp, *Luzula racemosa*, *Escallonia myrtilloides*, entre otros, numerosos helechos de los géneros *Asplenium*, *Cryptopteris*, *Elaphoglossum* y *Woodsia* y árboles del género *Polylepis* (Luteyn, 1999).

### **Superpáramo**

Es la zona menos afectada por el hombre, ya que se ubica a una altitud entre los 4 000-5 000 m s.n.m, la presencia de alta radiación UV, nevadas regulares y suelos con poca retención de humedad y nutrientes, han provocado que la vegetación crezca en zonas

protegidas como pedregales rocosos y suelos arenosos gruesos ubicados debajo de la línea de nieve continua (Luteyn, 1999). Según Villacres (2015) se pueden encontrar plantas de los géneros *Draba*, *Culcitium*, *Chuquiragua*, *Cortaderia*, *Baccharis* y *Gentiana*, entre otros.

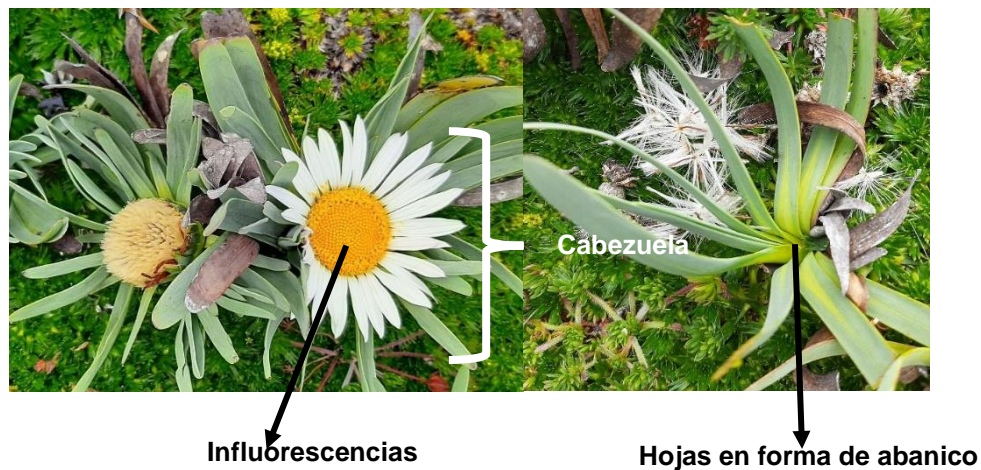
### **Género *Werneria***

El género *Werneria* fue establecido por Carl Sigismund Kunth en 1820, quién describió entre 40 a 50 especies; sin embargo, en años posteriores, casi la mitad de las especies fueron transferidas a nuevos géneros (Beltrán, 2017). Este género pertenece a la familia Asteraceae y está formado por 40 especies distribuidas en los países de Guatemala, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Chile, Bolivia y Argentina (Calisto, 2016). En Ecuador se han identificado cuatro especies: *Werneria pumila* Kunth, *Werneria nubigena* Kunth, *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn. y *Werneria spathulata* Wedd. (Funk, 1997; Sklenář & Romoleroux, 2021).

### ***Werneria nubigena* Kunth**

La especie *Werneria nubigena* Kunth, conocida comúnmente como “Chicoria”, “achicoria” o “Pato Jalio” (Minga *et al.*, 2016); crece dispersa en grupos pequeños. Esta especie presenta hojas largas que se asemejan a un abanico cuya longitud se extiende hasta 10 cm (Minga *et al.*, 2016). Las flores se encuentran conformadas por cabezuelas solitarias que crecen al ras del suelo y presentan un diámetro de 7 cm aproximadamente; sus pétalos en la parte interior presentan una coloración blanca mientras que en el exterior son rosados; el centro está formado por inflorescencias de coloración amarilla (Figura 2). Su taxonomía según *Catalogue of life* (2021), se encuentra descrita en la tabla 1.



**Figura 2***Werneria nubigena* Kunth.

*Nota:* Estructura de la planta de *W. nubigena*.

**Tabla 1**

*Taxonomía de Werneria nubigena* Kunth.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Subfamilia</b>	Asteroideae
<b>Género</b>	<i>Werneria</i>
<b>Especie</b>	<i>Werneria nubigena</i> Kunth

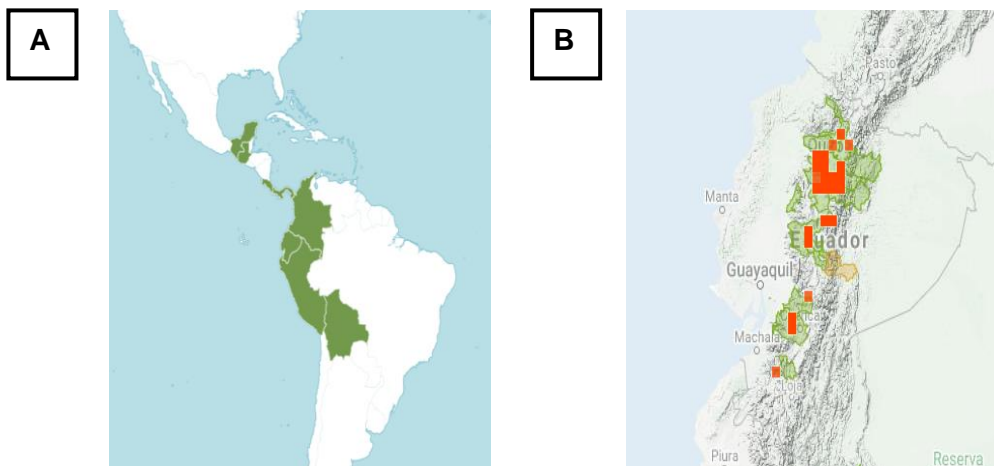
*Nota:* La tabla muestra la taxonomía de *W. nubigena* Kunth adaptado de: *W. nubigena* Kunth COL,2021, <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/5BXH7>.

### ***Distribución Geográfica***

La especie *Werneria nubigena* Kunth se encuentra distribuida a nivel continental desde México a Bolivia (Figura 3A), y a nivel nacional desde Carchi hasta Loja (Figura 3B)(Calisto, 2016) formando parte de los Parques Nacionales como Cayambe-Coca, Llanganates, Antisana, entre otros (Calisto, 2016).

### Figura 3

Distribución geográfica de *Werneria nubigena* Kunth a nivel continental y regional



Nota: A) Distribución Geográfica a nivel continental de la especie *W. nubigena*. Tomado de *Werneria nubigena* Kunth, Royal Botanic Gardens, 2017. B) Distribución Geográfica a nivel nacional de la especie *W. nubigena*. Tomado de Chicoria Blanca, iNaturalist (s/f), <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/316886-Werneria-nubigena>.

### Importancia Ecológica

Los páramos ecuatorianos presentan una altura promedio de 3 300 m s.n.m y cubren el 7% del territorio (Chuncho & Chuncho, 2019), se encuentran ubicados en la cordillera de los Andes, lo que ha generado diversificación de muchas especies animales y vegetales. El clima frío de los páramos evita que la materia orgánica se descomponga rápidamente y, al agruparse funciona como una esponja permitiendo la retención de agua, gracias a esto los páramos sirven como fuente de agua para el consumo de los seres vivos; de la misma manera, su suelo sirve como sumidero de carbono atenuando los efectos del calentamiento global (Vásconez & Hofstede, 2006).

El Área de Conservación Hídrica Antisana, se encuentra ubicada entre las provincias de Napo y Pichincha, en los cantones Quito, Quijos y Archidona, en las parroquias Pintag, Papallacta, Archidona y Cotundo, presenta una superficie de 8 487.03 ha y un rango altitudinal

entre los 3 720 -4 760 m s.n.m (FONAG, 2018). Es considerada uno de los puntos más importantes a ser conservados, puesto que, provisiona de agua a la ciudad de Quito y es el principal refugio del cóndor andino(Paz, 2021), sin embargo se ve amenazado por actividades antropogénicas como el pastoreo existente en esta área, por lo cual se pretende restaurar mediante la introducción de especies nativas o endémicas como *Werneria nubigena* Kunth, la cual se adapta a zonas alteradas(Aguirre et al., 2013).

Según Sklenář & Lægaard (2003) la especie *Werneria nubigena* Kunth, se encuentra en el páramo del Antisana distribuida en un rango altitudinal entre 4200-4300 m s.n.m, formando parte de la zona de transición entre el páramo de pasto y el superpáramo. Esta especie experimenta altos cambios de temperatura ambiental durante el día, siendo la temperatura mínima de -9,5°C y la máxima de 23,3°C debido a esto, para adaptarse debe existir un control de su temperatura interna. Así, *W. nubigena* absorbe calor llegando a adquirir temperaturas elevadas que oscilan entre 33,1-35.6°C, esta adaptación le permite sobrevivir a los enfriamientos nocturnos; sin embargo, las temperaturas elevadas producen sobrecalentamiento en la planta, provocando que transpiren en elevadas cantidades ayudando así a mantener la humedad del ambiente (Sklenář et al., 2016).

Esta especie crece en grupos pequeños permitiendo que las plantas retengan agua en el suelo como si fueran una esponja (Zapater, 2010). También mantienen la biodiversidad de microartrópodos y otras especies vegetales, retienen una alto contenido de materia orgánica en el suelo y, mitigan las perturbaciones que existen en el mismo (Hupp et al., 2017), además, sirven como alimento para los venados de cola blanca presentes en la región y como hábitat para roedores(Albuja Viteri, 2007; Guano Vasco, 2016).

### **Estado de Conservación**

Según el IUCN Red List of Threatened Species (2021), existe 11 especies de *Werneria*, tres se encuentran en estado vulnerable y son: *Werneria glaberrima* Phil., *Werneria graminifolia*

Kunth y *Werneria staticifolia* Sch.Bip. Una se encuentra en estado casi amenazado (*Werneria Solivifolia* Sch.Bip) y las demás en estado de baja preocupación, sin embargo, no existe información sobre la especie *Werneria nubigena* Kunth.

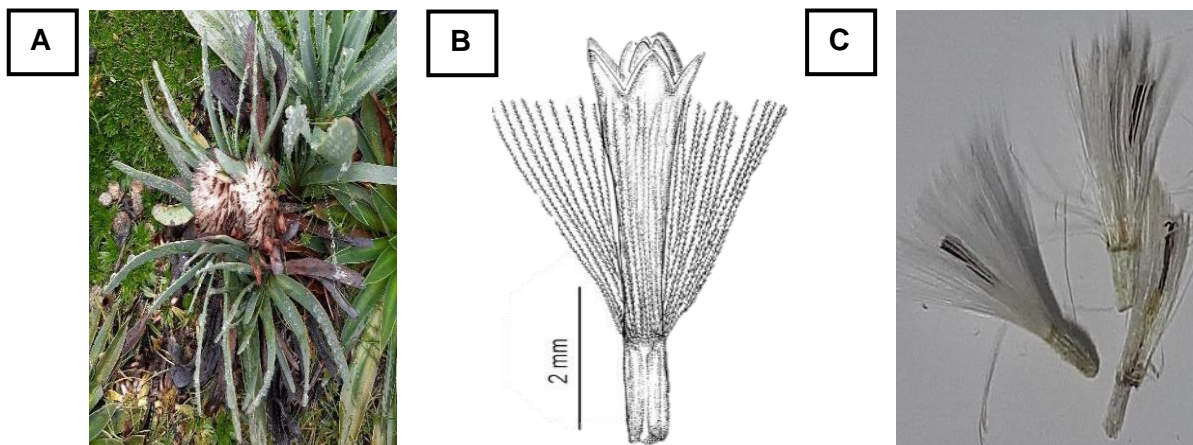
### **Propagación**

La familia Asteraceae se propaga mediante semillas, produce un fruto denominado aquenio que presenta una sola semilla y no se abre con la madurez; la cáscara o pared achenial presenta una capa delgada que rodea al embrión. La semilla no presenta endospermo (Melissa, 2013) por lo tanto, su alimento de reserva se almacena en dos cotiledones.

Las semillas de muchas especies de la familia Asteraceae se dispersan de diferentes formas, a menudo ayudadas por modificaciones del vilano (Melissa, 2013). El vilano en el caso de las semillas de *Werneria* presentan numerosos pelos capilares lo que les permite distribuirse con ayuda del viento (Figura 4).

### **Figura 4**

*Semillas de Werneria nubigena* Kunth.



*Nota:* A) Planta de *W. nubigena* lista para su dispersión B) Ilustración de semilla de *Werneria villosa* A. Gray tomado de Catálogo de Plantas Vasculares, por Instituto de Botánica Darwinion, 1861. C) Semillas maduras de *W. nubigena* obtenidas del Parque Nacional Antisana.

## **Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se caracteriza por el uso de explantes o material vegetativo, controlando ciertos factores como la cantidad de nutrientes y pH del medio de cultivo, además de la temperatura y ambiente para la incubación de los explantes. Esta tecnología es utilizada con el fin de obtener una gran cantidad de plantas basándose en los principios fisiológico más importantes: totipotencia y plasticidad (Singh, 2018). La totipotencia es la capacidad que mantienen las células para desarrollarse; al encontrarse en condiciones apropiadas se pueden multiplicar y formar células diferenciadas que integran un nuevo organismo (Grafi *et al.*, 2011). La plasticidad es la capacidad de iniciar la división celular de casi cualquier tejido de una planta, para regenerar órganos perdidos o experimentar diferentes vías de desarrollo que les permite adaptar a estímulos particulares (Bhatia, 2015).

Esta tecnología tiene como beneficios la obtención de plantas libres de enfermedades, inducción de metabolitos secundarios e incremento de plantas mediante micropropagación. Se denomina micropropagación a la multiplicación clonal de plantas cultivadas *in vitro*, cuyo tamaño es mucho menor que las plantas cultivadas *in vivo* (Roberts & Schum, 2003). Esta técnica ha permitido el cultivo y conservación de especies, ya que aumenta el coeficiente de propagación y disminuye el uso de una alta cantidad de plantas madre (Hussain *et al.*, 2012).

### **Consideraciones Generales**

**Explante.** Es una parte de la planta, la cual mediante cultivo *in vitro* permite obtener una planta completa (Das *et al.*, 2020). La elección del explante depende del objetivo de la investigación, para obtener callo se puede utilizar ápices, meristemos, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos diferenciados como frutos. Para obtener plantas haploides, se puede cultivar anteras, inflorescencias, microsporas u ovarios. En el caso de obtención de plantas libres de patógenos o para conservación de germoplasmas, se utilizan meristemos o semillas (Mroginski & Roca, 1991).

**Cultivo *in vitro* de Semillas.** Las semillas permiten conservar la biodiversidad genética de especies vegetales, por lo cual muchas de ellas se encuentran almacenadas en bancos de germoplasmas, sin embargo el almacenamiento por periodos largos o sus condiciones fisiológicas pueden reducir su capacidad germinativa, por lo tanto, el cultivo *in vitro* de tejidos permite mejorar la germinación de dichas semillas utilizando diferentes técnicas de revitalización como son: la germinación en medio de cultivo con adición de hormonas o el cultivo *in vitro* de embriones aislados(Klčová & Gubišová, 2003).

Algunas de las ventajas del cultivo *in vitro* de semillas son: la obtención de plántulas que pueden ser utilizadas como fuente de explantes para la propagación, conservación de plántulas con variabilidad genética natural y germinación de semillas recalcitrantes(Zurita Valencia *et al.*, 2014).

**Medio de Cultivo.** Para el cultivo *in vitro* de los explantes se necesita de los medios de cultivo los cuales constan de nutrientes, vitaminas y fuentes de carbono. Generalmente se complementan con agentes gelificantes, reguladores de crecimiento y otros componentes. Su pH debe ser ajustado a  $5.8 \pm 0.2$  usando diluyentes como NaOH o HCl(Kumar & Loh, 2012). El medio más utilizado es el medio MS establecido por Murashige & Skoog en 1962, el cual se encuentra compuesto por macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos, azúcar, carbohidratos, hierro y, agar como agente gelificante (Gulzar *et al.*, 2020). La tabla 2 muestra la composición del medio MS y las concentraciones necesarias para la elaboración del mismo.

Tabla 2

Composición de Medios Murashige &amp; Skoog (MS)

Elemento	Concentración en solución stock (mg/L)	Concentración en medio (mg/L)
<b>Macroelementos</b>		
$NH_4NO_3$	33 000	1 650
$KNO_3$	38 000	1 900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8 800	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7 400	370
$KH_2PO_4$	3 400	170
<b>Microelementos</b>		
$KI$	166	0.83
$H_3BO_3$	1 240	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4 460	22.3
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	1 720	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	50	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5	0.025
<b>Fuente hierro</b>		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 560	27.8
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	7 460	37.3
<b>Suplementos orgánicos</b>		
Myoinositol	20 000	100
Ácido nicotínico	100	0,5
Piridoxina-HCl	100	0,5
Tiamina-HCl	100	0,5
Glicina	400	2
<b>Fuente carbono</b>		
Sacarosa	Añadir como sólido	30 000

*Nota:* Composición típica del medio de cultivo. La fuente de carbono se añade en la elaboración del medio en forma sólida. Tomado de Plant Tissue Culture, por Bhatia 2015.

**Fuente de Carbono.** La mayoría de los cultivos *in vitro* no pueden realizar la fotosíntesis debido a cloroplastos poco desarrollados, además existe limitada cantidad de  $CO_2$ . Por lo tanto, se debe añadir una fuente de carbono, esta fuente de carbono sirve como energía para la planta que es utilizada para sus procesos de desarrollo como inducción de brotes, raíces, formación de embriones entre otros (Yaseen et al., 2013); la fuente más utilizada es la

sacarosa la cual sirve también como componente principal osmótico del medio, sin embargo existen otras fuentes de carbono como la maltosa, galactosa y lactosa; las concentraciones añadidas dependen del tipo de explante y del tipo de carbohidrato sin embargo normalmente se utilizan concentraciones que van del 2 al 5% (p/v), (Bhojwani & Dantu, 2013; Prasuna & Srinivas, 2016).

**Vitaminas.** Las plantas requieren de la suplementación de ciertas vitaminas, las cuales actúan como coenzimas y permiten el desarrollo de los cultivos. Las vitaminas más utilizadas son tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (Vitamina B3), piridoxina (B6) y myo-inositol. La tiamina y myo-inositol, son esenciales en el medio de cultivo de tejidos (Chimdessa, 2020). La tiamina permite el crecimiento de todas las células y sus concentraciones oscilan entre 0,1 y 10 mg/l (Norsuzila Ya'acob *et al.*, 2012). El myo-inositol almacena fosfato y ayuda en la biosíntesis de la pared celular, la producción de moléculas relacionadas con el estrés, la comunicación entre células, el almacenamiento y transporte de hormonas vegetales (Labanonturf, 2013)

**Nutrientes.** Los macronutrientes son elementos que la planta necesita en grandes cantidades, la cantidad estimada que necesitan las plantas debe ser superior a 0,5g/l. Los elementos principales de este grupo son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Los micronutrientes son elementos que la planta requiere en menores cantidades como: hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno. Las cantidades consideradas necesarias deben ser inferiores a 0,5 g/L (Norsuzila Ya'acob *et al.*, 2012).

**Aminoácidos.** Su adición es importante para establecer cultivos de células y protoplastos; proporcionan a las células vegetales una fuente de nitrógeno de fácil asimilación. Las mezclas de aminoácidos, como hidrolizado de caseína, L-glutamina, L-asparagina y adenina se utilizan con frecuencia como fuentes de nitrógeno orgánico en los medios de cultivo. La glicina, glutamina, asparagina, L-arginina, cisteína y L-tirosina son usados para potenciar la



formación y elongación de la pared celular en medios de cultivo, además de reducir el marchitamiento de brotes (Akhtar et al., 2016; Norsuzila Ya'acob et al., 2012).

**Agente Gelificante.** Los agentes solidificantes son polisacáridos conformados por azúcares simples, que al enlazarse tienen la capacidad de formar geles asegurando una superficie sólida o semisólida dependiendo de la dureza que requiera el medio de cultivo. El agar es el agente gelificante de uso universal, este agente es obtenido de algas marinas, se funde fácilmente en un rango de temperatura de 60°-100°C y se solidifica aproximadamente a 45°C; además es estable a temperaturas de incubación, no reacciona con los constituyentes de los medios y no es digerido por las enzimas vegetales (Franco, 2021; Norsuzila Ya'acob et al., 2012). Existen distintos tipos de agentes gelificantes como el Alginato el cual es similar a la agarosa y gracias a sus propiedades físicas se utiliza para suspensiones celulares y de protoplastos sin embargo necesita de ciertos cationes como el Calcio para gelificarse, las concentraciones usadas varían de 1.75 a 4.9% (p/v) en baja concentración de calcio; El argagel es una mezcla de phytigel y agar que se desarrolló con el fin de ayudar en la vitrificación de los explantes, además permite una mejor detección de contaminación a diferencia del agar y se usa concentraciones de 3.5-5 g/L; el phytigel es un sustituto del agar producido por bacterias compuesto por ácido glucurónico, ramnosa y glucosa formando un gel transparente de alta resistencia, es más económico que el agar y se usa en concentraciones de 1.5-2,5g/L (Merck, 2022) EL Bacto agar tiene características similares al agar, en cultivo *in vitro* se ha de terminado que gracias a su conformación sólida fuerte ayuda en la formación de raíces además de mejorar la tasa de multiplicación de brotes al encontrarse suplementado con Ca y Mg (Podwyszynska & Olszewski, 1995; Sulusoglu, 2014).

**Reguladores de Crecimiento.** Los reguladores de crecimiento son necesarios para desencadenar varios tipos de crecimiento y diferenciación; se deben añadir en cantidades

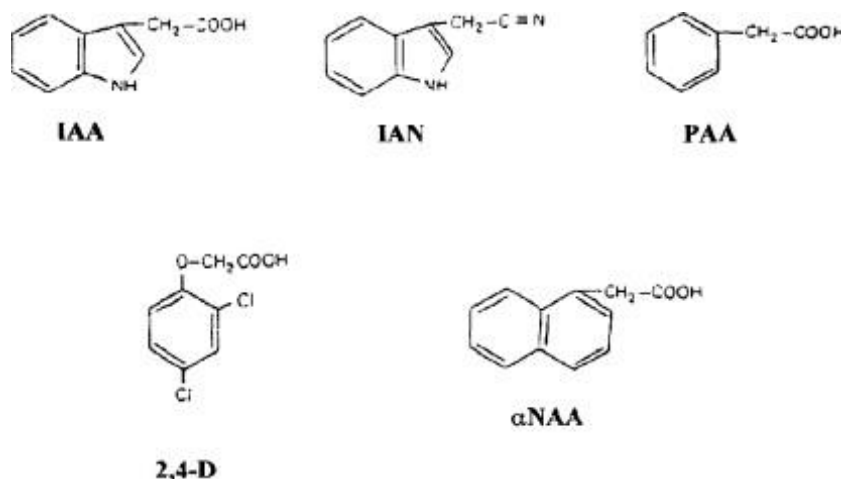
pequeñas (0,001-10  $\mu\text{M}$ ), estas cantidades varían según la planta, naturaleza de tejido y etapa de cultivo(Bhojwani & Dantu, 2013).

Las Auxinas son fitorreguladores que presentan una cadena lateral ácida en el anillo aromático (Figura 5) (Bhatla, 2018), su nombre viene de la palabra griega “auxien” que significa crecer y fue descrita por primera vez en el libro publicado por Charles Darwin “El poder del movimiento en las plantas” quién observó la influencia de estas hormonas en el fototropismo.

Este fitorregulador controla la división y elongación celular, promueve el tropismo, dominancia apical, desarrollo vascular y formación de hojas y raíces(Jiang et al., 2017; Peris et al., 2010). Generalmente en cultivo *in vitro* cantidades bajas de auxina permiten la formación de brotes, y cantidades altas forman callos. Las auxinas comúnmente utilizadas son ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido p-clorofenoxiacético (p-CPA). AIA e IBA son naturales, mientras que ANA, 2,4D y p-CPA son sintéticas, por lo que deben ser añadidas al medio en pequeñas cantidades, para lo cual deben ser disueltas en etanol o NaOH diluido(Bhojwani & Dantu, 2013).

## Figura 5

Estructuras de los reguladores de crecimiento (Auxinas)



*Nota:* AIA: Ácido indolacético, IAN: indolacetonitrilo, PAA: Ácido fenilacético, 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, NAA: Ácido naftaleno acético. Tomado de Propagation of paclitaxel biosynthesizing plants, por Pullaiah *et al.*, 2022.

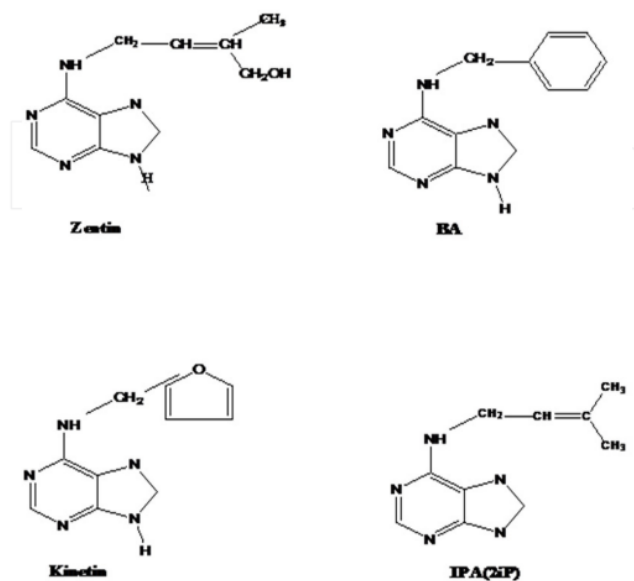
Las citoquininas se encuentran en tejidos vegetales, tales como: punta de la raíz, ápices de brotes y semillas inmaduras, se ocupan de la división celular, modificación de la dominancia apical, la diferenciación y proliferación de brotes, estas dos últimas se aplican comúnmente en los medios de cultivos. La primera citoquinina natural identificada fue la zeatina, la cual se obtuvo de granos de maíz, sin embargo, existen citoquininas que son producidas por cianobacterias, bacterias patógenas de plantas y mohos como el *Dactylosteponia discoides* (Bhojwani & Dantu, 2013; Schmling, 2013).

Las citoquininas más utilizadas en cultivo *in vitro* son kinetina, purina, BAP (Bencilaminopurina), 2iP (2-isopentenil adenina) y zeatina. La citoquinina más eficiente y generalmente utilizada en los medios de cultivo es el BAP, en rango de concentración de 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Al igual que las auxinas estos fitorreguladores deben ser disueltos en pequeñas cantidades de HCl 1N o NaOH 1N o en caso de añadirse directamente a medios estériles, se pueden

disolver en dimetilsulfóxido (DMSO), ya que actúa como agente esterilizante (Bhojwani & Dantu, 2013; Norsuzila Ya'acob et al., 2012). La Figura 6 muestra la estructura de las citoquininas utilizadas comúnmente en medios de cultivo de tejidos vegetales.

### Figura 6

*Estructuras de las hormonas vegetales (Citoquininas)*

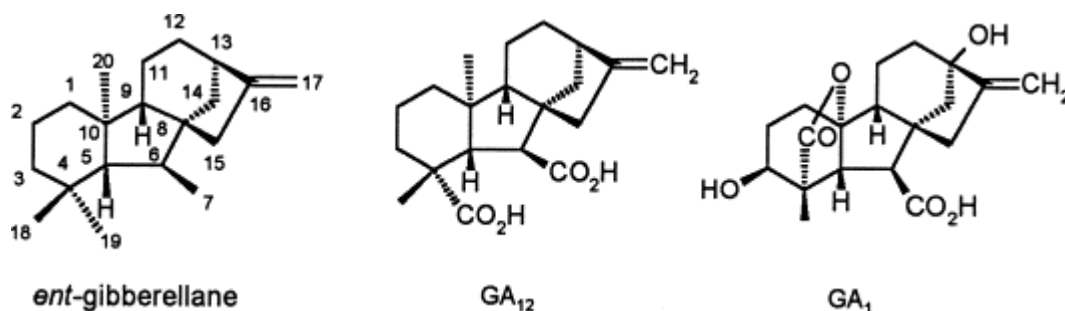


*Nota:* BA: Benziladenina, IPA: dimetilalilaminopurina. Tomado de: Plant Tissue Culture Media por Norsuzila Ya'acob et al., 2012.

Las giberelinas son ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos (Figura 7) que estimulan la elongación de entrenudos, el crecimiento de meristemas y logran el desarrollo normal de las plántulas a partir de embriones adventicios formados *in vitro*. Existen 20 giberelinas conocidas, el Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) se usa con más frecuencia ya que es fácilmente soluble en agua (Bhojwani & Dantu, 2013).

**Figura 7**

*Estructuras de las hormonas vegetales (Giberelinas)*



*Nota.* Ent-gibberellane es el esqueleto común que forma parte de todas las giberelinas, se puede observar que GA<sub>12</sub> está compuesto por diterpenoides y por 20 carbonos y GA<sub>1</sub> perdió el carbono 19. Tomado de Encyclopedia of Hormones, Giberellins por Sponsel, 2003.

El etileno y ácido abscísico es producido por el envejecimiento y tejidos estresados. Puede influir en varios procesos morfogénicos, como la embriogénesis y organogénesis, sin embargo, no se conoce con exactitud sus efectos. También puede ser promotor o inhibidor de diferentes sistemas vegetales. El ácido abscísico sirve como inhibidor del crecimiento natural, es utilizado *in vitro* para el crecimiento, desarrollo y maduración de los embriones somáticos (Bhojwani & Dantu, 2013).

**Otros Compuestos.** Entre los componentes que se adiciona ocasionalmente a los medios de cultivo se encuentra el agua de coco, carbón activado, jugo de frutos de tomate, extracto de levadura y extracto de tubérculo de papa. Como aminoácidos se puede añadir asparagina, cisteína y L-tirosina (Mroginski & Roca, 1991).

### ***Etapas del Cultivo in vitro***

El cultivo *in vitro* de tejidos consiste en cinco etapas importantes para su aplicación que son:

**Etapa 0: Preparación de Planta Donante.** Para tener un cultivo *in vitro* exitoso la planta madre debe ser cultivada *ex vitro* en óptimas condiciones, reduciendo la contaminación (Hussain *et al.*, 2012). Ciertos factores pueden influenciar los objetivos de la investigación como son: el tamaño del explante, la época del año en la que se recolectaron los explantes, los pretratamientos y condiciones de la planta madre (Mroginski & Roca, 1991)

En el caso de recolección de semillas se debe planificar y monitorear la época en la que las semillas se encuentran maduras, dado esto la recolección de semillas se realiza dependiendo el tipo de especie, para semillas de pasto se recolectan las semillas desprendiendo o sacudiendo el tallo; para semillas de arbustos se sacude los arbustos y se deja caer la semillas sobre una lona, para especies de arbustos altos, se necesita de escaleras y podar algunas ramas. Cualquiera que sea el método de recolección, debe realizarse de manera que no dañen la vegetación existente. Posterior a esto deben almacenarse las semillas en donde la temperatura y humedad relativa no debe exceder de los 100°F ni del 100% de humedad (USDA, s/f).

**Etapa I: Estado de Iniciación.** Se realiza la desinfección del explante y se transfiere a un medio nutritivo; el medio elaborado debe ser esterilizado antes de la inoculación de los explantes (Gulzar *et al.*, 2020). Para evitar contaminación se puede aplicar bactericida y fungicida, tales como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, etanol y cloruro de mercurio, que son los más utilizados. La esterilización del explante se realiza en soluciones químicas removiendo contaminantes minimizando el daño de las células.

Para el desarrollo de los explantes, estos son incubados en cámaras de crecimiento bajo condiciones de luz u oscuridad dependiendo de las condiciones de crecimiento que sean necesarias (Hussain *et al.*, 2012).

**Etapa II: Etapa de Multiplicación.** En esta fase se aumenta el número de plántulas; las primeras se multiplican por subcultivos hasta alcanzar el número deseado (Hussain *et al.*, 2012). Para producir brotes se suele requerir aumentar citoquininas y luminosidad o bajar citoquininas y aumentar luminosidad para elongar los brotes que se desean multiplicar, además de obtener brotes uniformes (Debergh & Maene, 1981).

**Etapa III: Etapa de Enraizamiento.** Esta etapa puede ocurrir simultáneamente en el mismo medio de multiplicación, sin embargo, en algunos casos se debe cambiar de medios e incluso los nutrientes y reguladores de crecimiento para inducir el enraizamiento y crecimiento de raíces (Hussain *et al.*, 2012).

**Etapa IV: Etapa de Aclimatación.** Esta etapa consiste en retirar las plantas del medio de cultivo y transferirlas a un sustrato apropiado como arena, turba, compost, entre otros., y la adaptación a las condiciones *ex vitro* se produce gradualmente en el invernadero regulando la humedad e intensidad de luz (Hussain *et al.*, 2012).

### ***Restauración Ecológica y Conservación de Especies Vegetales***

Según Fay (1992) los métodos *in vitro* para conservación de plantas son similares a los de micropropagación de cultivos hortícolas y agrícolas, con ciertas modificaciones. El principal material vegetativo para la conservación de plantas es la semilla, ya que permite mantener una base genética amplia, sin embargo, si las plantas son estériles, tienen semillas recalcitrantes o se requiere obtener clones, se puede utilizar material vegetativo como hojas, tallos, raíces, entre otros, ayudando a mantener el trasfondo genético del cultivo y también permitiendo la creación de bancos de genes (Oseni *et al.*, 2018). Esta técnica ha sido utilizada para rehabilitar desiertos y también es considerada para ser usada en restauración de paisajismos urbanos. Sudhersan *et al.*, (2003) confirmaron que los métodos de cultivos *in vitro* permiten propagar masivamente especies nativas y en extinción. Li & Gallagher, (1996) & Wang *et al.*, (2006) mencionan que la producción *in vitro* de especies endémicas y nativas para restauración ecológica permiten

seleccionar líneas de genotipos con características deseables para restauración ecológica de humedales.



## Capítulo 3: Materiales y Métodos

### Localización Geográfica

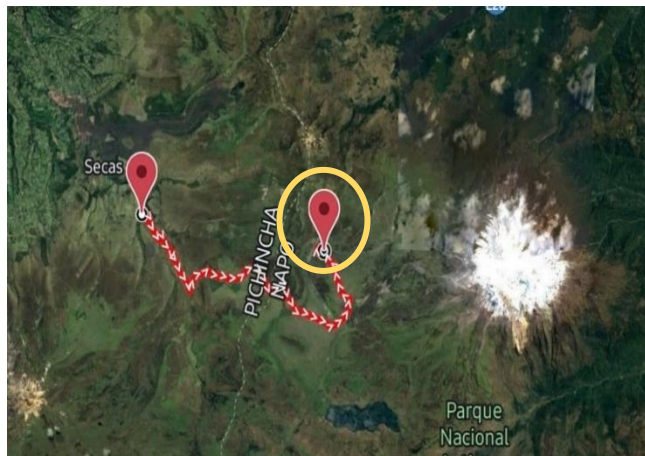
El proyecto se realizó en dos fases, la primera fue la fase de campo en la cual se recolectó semillas de *Werneria nubigena* Kunth y la segunda fase fue la de laboratorio en donde se realizaron los ensayos respectivos a las etapas del cultivo *in vitro*

### Fase de campo

La recolección de semillas se realizó en el Árenal 2 del Área de Conservación hídrica Antisana ubicada en Pintag, calle Humbolt S/N y Av. Antisana, coordenadas: 808055 E ; 9946691 N; WGS 1984 UTM 17S (Figura 8).

### Figura 8

*Ubicación del Área de Conservación Hídrica Antisana*



*Nota:* Ruta seguida para llegar al Área de Conservación Hídrica Antisana (círculo amarillo)

Tomada de Google Maps, 2022.

### Fase de Laboratorio

Los ensayos respectivos al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí, Av. General Rumiñahui, Sector Santa Clara, 0°18'53"S 78°26'36"O.

### **Recolección de muestra**

Se recolectaron semillas maduras, las cuales fueron almacenadas en fundas de papel, posterior a eso se secaron por tres días a temperatura ambiente y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

### **Preparación de muestra**

Para los ensayos de laboratorio se seleccionaron semillas que presentaban embriones, posteriormente se procedió a retirar el vilano y se almacenó en bolsas pequeñas de papel a 4°C. Las semillas introducidas en los procesos de desinfección y germinación presentaron 5 meses de almacenamiento, sin embargo, se utilizaron lotes diferentes; para las semillas de desinfección se utilizó el lote de semillas recolectadas en el mes de mayo-junio y para el proceso de germinación se utilizó el lote de semillas recolectadas en el mes de agosto.

### **Desinfección**

#### ***Preparación de Medio de Cultivo***

Para este ensayo se preparó medio MS suplementado con 40g/L de azúcar como fuente de carbono, se ajustó el pH entre 5,7 y 5,8 con NaOH (1N) y HCl (1N), se añadió 7,5 g/L de Bacto Agar. Se dispensó 3 mL en tubos de ensayo de 10mL y se autoclavó a 121°C, 15psi por 15 min.

#### ***Condiciones de incubación de cultivo in vitro***

La incubación del material vegetal se mantuvo a temperatura ambiente siendo la temperatura mínima de 22°C y máxima de 28°C, con fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad. La intensidad lumínica fue de  $35\pm 5 \mu\text{molm}^2/\text{s}$  de luz blanca de lámpara led.

#### ***Ensayo de Desinfección***

Se realizó un prelavado con agua destilada, seguido de una limpieza superficial con detergente comercial (2% p/v) por 15 min, se retiró el detergente mediante tres lavados con

agua destilada para introducir las muestras en etanol (75% v/v) adicionado con tres gotas de Tween 20 por medio Litro durante un 1 min, se retiró el etanol con tres lavados con agua destilada para luego ser introducidos en dos concentraciones diferentes de NaClO (6 y 7% v/v) y tres tiempos de inmersión (5, 7.5 y 10 min) obteniendo un total de seis tratamientos como se muestra en la tabla 3

**Tabla 3**

*Tratamientos de desinfección para semillas de Werneria nubigena Kunth*

<b>Código</b>	<b>NaClO (% v/v)</b>	<b>Tiempo de inmersión (minutos)</b>
<b>D0</b>	0	0
<b>D1</b>	6	5
<b>D2</b>	6	7.5
<b>D3</b>	6	10
<b>D4</b>	7	5
<b>D5</b>	7	7.5
<b>D6</b>	7	10

*Nota:* Se realizaron tres repeticiones con 10 unidades experimentales por cada repetición, utilizando un total de 210 semillas.

### ***Evaluación***

En esta etapa se evaluó las variables respuesta contaminación y germinación, los datos se obtuvieron en los 30 días después de la introducción de la muestra en donde se determinó: porcentaje de semillas contaminadas ya sea por bacteria o por hongo y porcentaje de semillas germinadas.

### **Germinación**

#### ***Preparación de Medio de Cultivo***

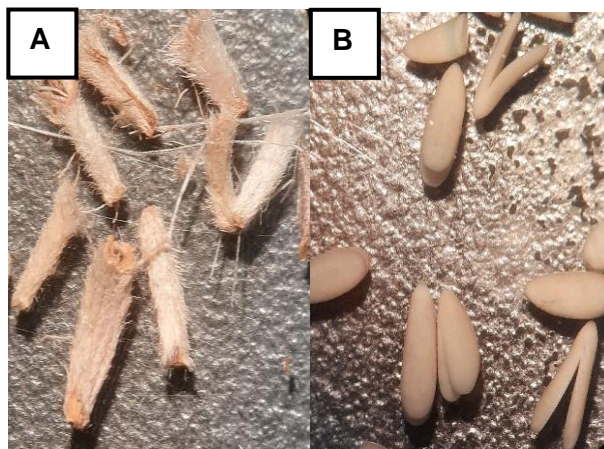
Según los tratamientos establecidos en el diseño experimental (Tabla 4), se realizaron seis tratamientos, para la elaboración del medio de cultivo se siguió los mismos pasos que en el proceso de desinfección.

### **Ensayo de Germinación**

Se aplicó el tratamiento de desinfección establecido en el proceso anterior, posteriormente se realizó la introducción en los diferentes tratamientos de germinación mostrados en la tabla 4, se realizaron dos ensayos diferentes, el primero consistió en utilizar semillas completas (Figura 9A) y el segundo en la introducción de embriones (Figura 9B) aplicando los mismos tratamientos en ambos ensayos.

### **Figura 9**

A) Semillas de *Werneria nubigena* Kunth B) Embriones de *Werneria nubigena* Kunth



**Tabla 4**

*Tratamientos de germinación para semillas de Werneria nubigena* Kunth

<b>Código</b>	<b>Concentración de MS</b>	<b>Concentración de AG<sub>3</sub> (mg/L)</b>
<b>G0</b>	1/2	0
<b>G1</b>	1/2	1
<b>G2</b>	1/2	2
<b>G3</b>	1	0
<b>G4</b>	1	1
<b>G5</b>	1	2

*Nota:* Se realizaron tres repeticiones con 10 unidades experimentales por cada repetición, utilizando un total de 180 semillas por cada ensayo.

### ***Evaluación***

Se evaluó las variables respuestas germinación y altura de las plántulas, los datos se obtuvieron en los 30 días después de la introducción de las semillas en donde se determinó: porcentaje de semillas germinadas, porcentaje de embriones germinados, altura en cm de las plántulas por cada tratamiento.

### **Multiplicación**

#### ***Preparación de Medio de Cultivo***

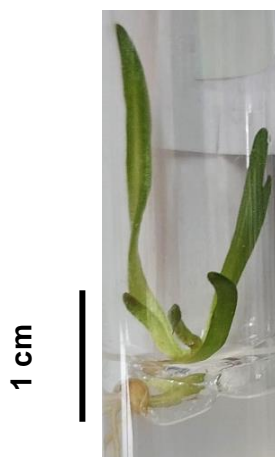
Según los tratamientos establecidos en el diseño experimental (Tabla 5), se realizaron nueve tratamientos, para la elaboración del medio de cultivo se siguió los pasos del proceso de desinfección, sin embargo, por el tamaño de la planta se utilizaron frascos de vidrio de 100mL en los que dispensaron 30 mL del medio elaborado.

#### ***Ensayo de Multiplicación***

Se introdujeron trecientos embriones en medio de germinación establecido en el proceso anterior, al mes y medio las plantas germinadas se cambiaron a los medios de multiplicación obteniendo resultados en los 30 días posteriores a la introducción. Las plantas introducidas presentaron una altura promedio de 2,36 cm (Figura 10).

**Figura 10**

*Planta obtenida previa a ser introducida en la etapa de multiplicación*



*Nota.* Planta obtenida en 30 días, tratamiento G4.

**Tabla 5**

*Tratamientos de multiplicación para plántulas de Werneria nubigena Kunth*

<b>Código</b>	<b>Concentración de BAP (mg/L)</b>	<b>Concentración de AIA (mg/L)</b>
<b>M0</b>	0	0
<b>M1</b>	1	0
<b>M2</b>	2	0
<b>M3</b>	0	0,3
<b>M4</b>	1	0,3
<b>M5</b>	2	0,3
<b>M6</b>	0	0,6
<b>M7</b>	1	0,6
<b>M8</b>	2	0,6

*Nota:* Para el presente diseño experimental, se realizó una repetición con 10 unidades experimentales, utilizando un total de 90 plántulas.

### ***Evaluación***

Se evaluó las variables respuestas: número de brotes por explante y altura del explante (cm), porcentaje de presencia de callo, inducción de brotes, los datos se obtuvieron en los 30 días después de la introducción de las plántulas.

## Enraizamiento

### *Preparación de Medio de Cultivo*

Según los tratamientos establecidos en el diseño experimental (Tabla 6), se realizaron cuatro tratamientos, para la elaboración del medio de cultivo se siguió los mismos pasos que en el proceso de desinfección, se dispensó 30 mL de medio en frascos de vidrios.

### *Ensayo de Enraizamiento*

Con los brotes obtenidos en el tratamiento de multiplicación previamente establecidos, se aplicaron los tratamientos descritos en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Tratamientos de enraizamiento para plántulas de Werneria nubigena Kunth*

<b>Código</b>	<b>Hormona</b>	<b>[mg/L]</b>
<b>E0</b>	0	0
<b>E1</b>	AIA	0,5
<b>E2</b>	AIA	1
<b>E3</b>	AIA	3

*Nota:* Se utilizaron un total de 48 plántulas, 12 por cada tratamiento con una altura promedio de 1cm.

Se evaluó las variables respuestas: número de raíces, longitud de las raíces, porcentaje de oxidación, los datos se obtuvieron en 45 días después de la introducción de las plántulas multiplicadas.

### **Análisis Estadístico**

Las variables respuestas fueron analizadas en el software InfoStat Versión 2018I y R versión 4.1.3. Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad para determinar la normalidad de las variables respuestas, para los datos que presentaron normalidad se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias de medias y la prueba de

pareamiento DUNCAN para determinar el mejor tratamiento, para datos no normales se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.



## Capítulo 4: Resultados

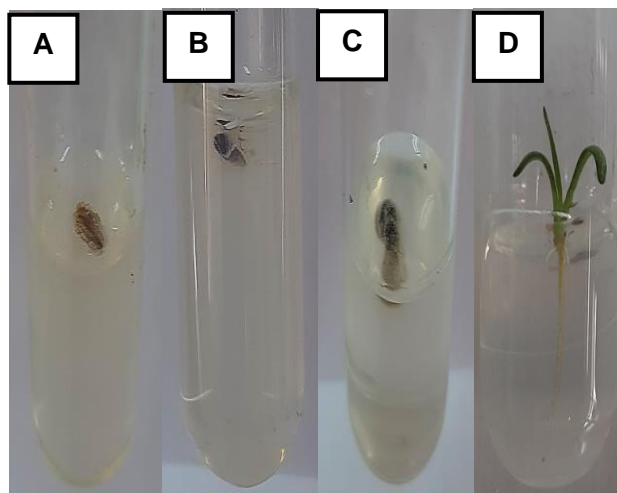
### Etapa de Desinfección

#### *Análisis Exploratorio*

Se analizó el efecto de los tratamientos de desinfección sobre las variables dependientes: Contaminación y germinación de semillas de *Werneria nubigena* Kunth (Figura 11), los resultados presentados en la figura 12A muestran alto porcentaje de germinación sin presencia de cloro (D0), al contrario, al aumentar el tiempo de concentración y/o la concentración de cloro existe reducción de los agentes contaminantes, siendo los tratamientos con menos contaminación D2, D4 y D6, además en la figura 12B se logra determinar que existe aumento en el porcentaje de germinación de semillas en los tratamientos D2 y D5.

#### Figura 11

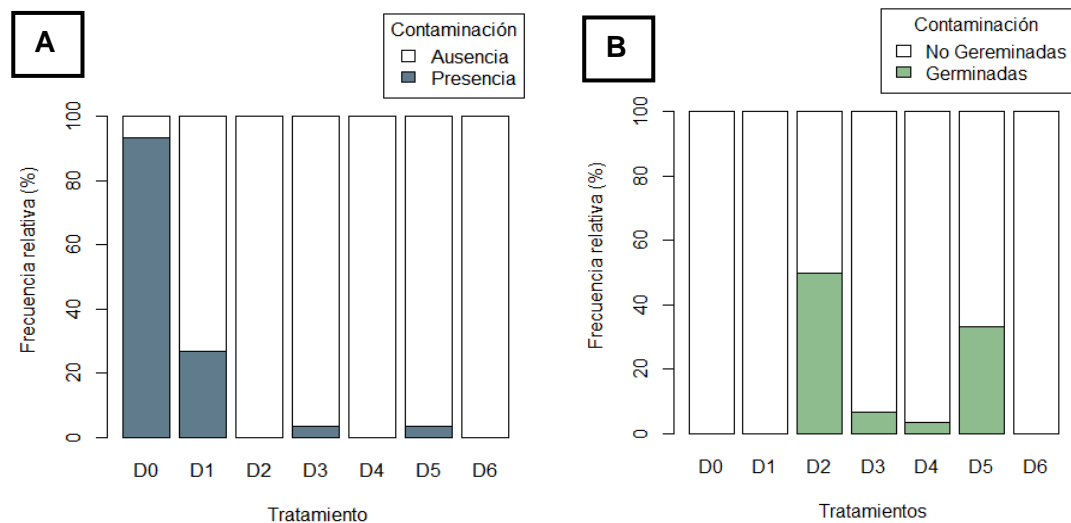
*Contaminación fúngica, bacteriana y germinación*



*Nota:* A) Ausencia de contaminación (D3) B) Contaminación por bacteria (D1) y C) Contaminación por Hongo(D0) D) Semillas Germinada en los 30 días.

Figura 12

*Análisis del porcentaje de contaminación y germinación*



*Nota.* A) Contaminación en semillas B) Germinación de semillas

### **Análisis Inferencial**

El Análisis de Varianza permitió establecer la influencia de la concentración de cloro y el tiempo de inmersión sobre la contaminación y germinación de semillas, indicando que la concentración de cloro, tiempo de inmersión y su interacción son factores influyentes en la reducción de contaminación, por otra parte, referente a la germinación, el tiempo de inmersión influyó en la germinación de semillas (Tabla 7).

**Tabla 7**

*Análisis de Varianza respecto a las variables contaminación y germinación.*

	<b>Contaminación (p-valor)</b>	<b>Germinación (p-valor)</b>
<b>Concentración de cloro [NaClO]</b>	0,0054	0,1543
<b>Tiempo de inmersión (min)</b>	0,0028	<0,0001
<b>Interacción</b>	0,0004	0,2183

*Nota.* p-valor menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas

Los datos no presentan distribución normal, dado que se analizaron variables dicotómicas (Tabla 8), por lo tanto, se empleó el análisis no paramétrico Shapiro Wilks en el que se determinó que existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p$ -valor $<0,05$ ). Los resultados analizados se encuentran presentes en la tabla 9.

### Tabla 8

*Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a la variable contaminación y germinación*

<b>p(Unilateral D) Contaminación</b>	<b>p(Unilateral D) Germinación</b>
<0,0001	<0,0001

*Nota:* El p-valor obtenido mayor a  $\alpha=0,05$  indica distribución normal

### Tabla 9

*Prueba de Kruskal Wallis análisis variables contaminación y germinación*

<b>P-valor (Contaminación)</b>	<b>P-valor (Germinación)</b>
<0,0001	<0,0001

*Nota.* El p-valor obtenido menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas entre tratamientos.

En el análisis de comparación múltiple se determinó que a pesar que el análisis de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas referente al análisis de contaminación (tabla 9), los rangos analizados indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos, al contrario, se presentaron diferencias significativas para en análisis de germinación en el cual se pudo establecer que el tratamiento D2 difiere de los tratamientos D1, D4 y D6 (Tabla 10). En base a los resultados obtenidos, se pudo determinar que el tratamiento D2 presentó resultados óptimos para disminuir la contaminación y aumentar la germinación (Figura 13).

**Tabla 10**

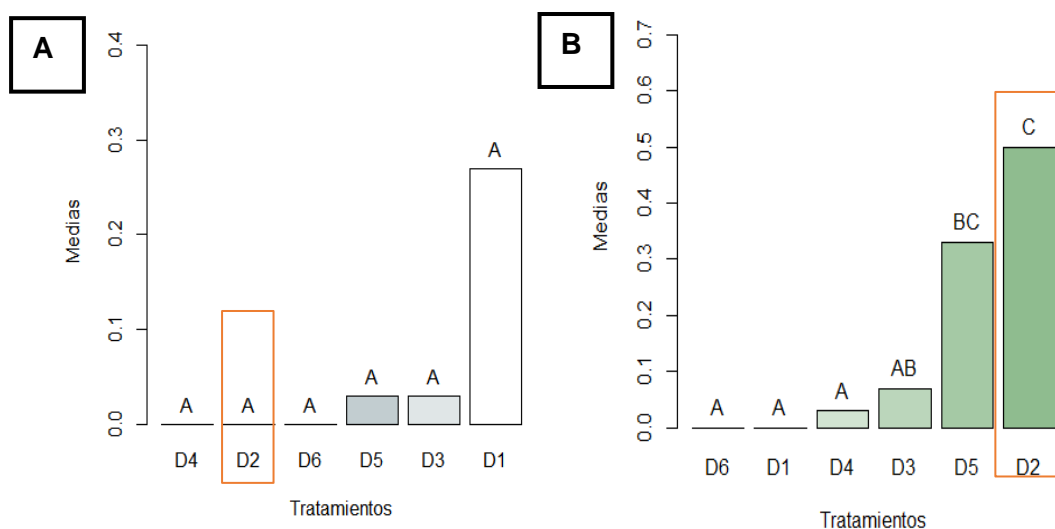
*Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de desinfección*

Tratamientos	Contaminación			Germinación		
	Medias	Ranks		Medias	Ranks	
D1	0,33	85,50	A	0	76,5	A
D2	0	85,50	A	0,5	121,5	C
D3	0,37	85,50	A	0,07	82,5	AB
D4	0,07	88,50	A	0,03	79,5	A
D5	0,03	88,50	A	0,33	106,5	BC
D6	0	109,50	A	0	76,5	A

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

**Figura 13**

*Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos de desinfección*



*Nota.* Comparación de medias A) Variable contaminación, B) Variable Germinación.

### **Etapas de Germinación**

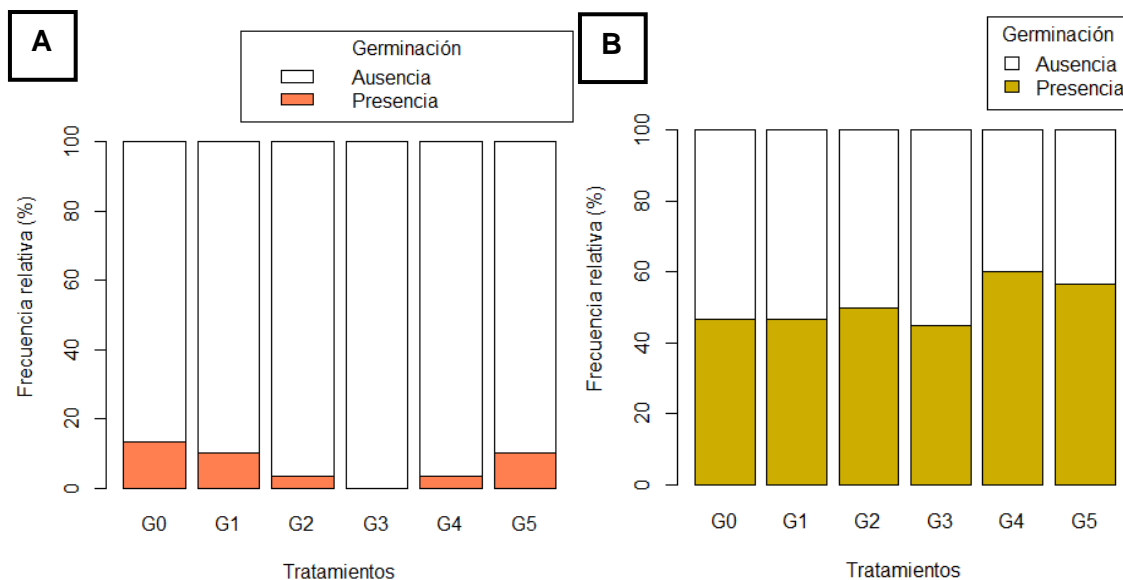
#### **Análisis Exploratorio**

Para inducir un mayor número de semillas germinadas, se utilizó diferentes concentraciones de medio MS y de ácido giberélico. Se realizaron dos ensayos diferentes, el primer ensayo utilizó semillas con la presencia de testa, sin embargo, como se observa en la figura 14A, el porcentaje de germinación fue bajo, siendo el tratamiento G0 el que presentó

mayor porcentaje de germinación (13,33%) debido a esto se realizó un segundo ensayo en el que se retiró la testa, en la figura 14B se puede apreciar que el tratamiento G4 presentó 50% de semillas germinadas en contraste con los demás tratamientos.

**Figura 14**

*Porcentajes de semillas germinadas*



*Nota. A) Con testa B) Sin testa.*

### **Análisis Inferencial**

La figura 15 muestra que retirar la testa indujo a que las plantas germinadas a los 30 días presentes mejores características que en el procedimiento contrario, por lo tanto, se escogió como mejor procedimiento la extracción de la testa para aumentar la germinación, en base a esto se analizó el efecto de los diferentes tratamientos para las variables germinación y longitud de la planta. Al realizar el análisis de varianza se obtuvo que las variables independientes no son influyentes para la germinación de semillas sin testa y altura de la planta (Tabla 11).

**Figura 15***Plantas germinadas (30 días)*

*Nota.* A) Con testa B) Sin testa.

**Tabla 11**

*Análisis de Varianza respecto a las variables germinación y longitud*

	<b>Germinación (p-valor)</b>	<b>Longitud(cm) (p-valor)</b>
<b>Concentración de MS [MS]</b>	0,3136	0,1308
<b>Concentración de AG<sub>3</sub> [AG<sub>3</sub>]</b>	0,8643	0,7989
<b>Interacción</b>	0,7629	0,2183

*Nota:* p-valor menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas.

El análisis de normalidad presentado en la Tabla 12 indica que los datos no siguen una distribución normal, por lo que se debe aplicar pruebas no paramétricas, el análisis realizado con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Tabla 13) indica que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos tanto para germinación como para la longitud.

**Tabla 12**

*Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables germinación y longitud*

<b>p(Unilateral D) Germinación</b>	<b>p(Unilateral D) Longitud (cm)</b>
<0,0001	<0,0001

*Nota:* El p-valor obtenido mayor a  $\alpha=0,05$  indica distribución normal

**Tabla 13**

*Prueba de Kruskal Wallis análisis variables germinación y longitud*

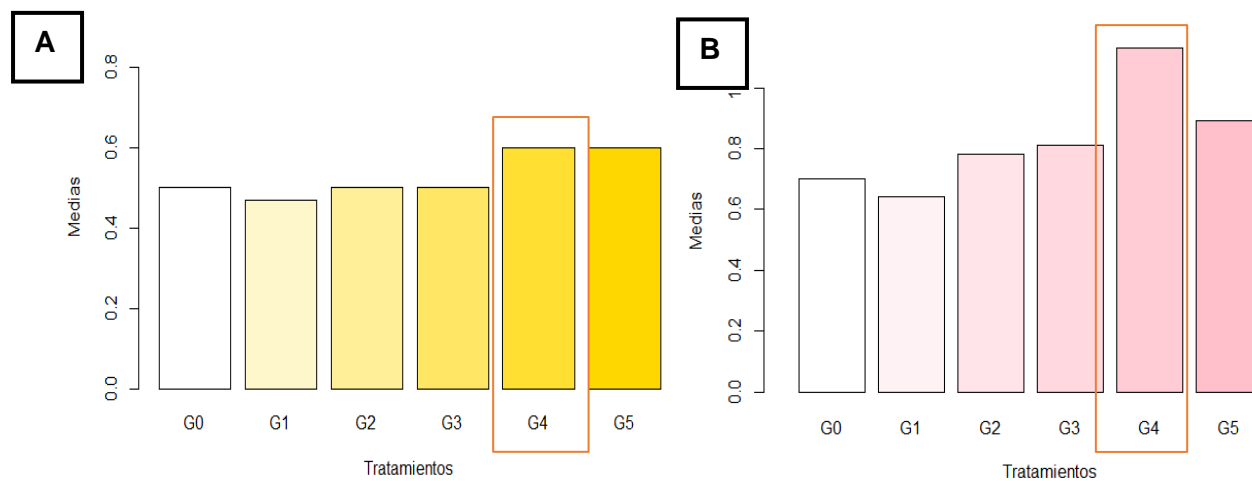
<b>P-valor (Germinación)</b>	<b>P-valor (Longitud cm)</b>
0,8401	0,6778

*Nota.* El p-valor obtenido menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas entre tratamientos.

En base a las medias obtenidas se pudo determinar que a pesar que no existen diferencias significativas, los tratamientos G4 y G5 son los que presentaron mejores resultados (Figura 16). Sin embargo, G4 fue el mejor para germinación y longitud de las plantas obtenidas con porcentaje de germinación del 60% y longitud de explantes de 1,13cm. La figura 17 muestra los resultados obtenidos en los distintos tratamientos de germinación.

**Figura 16**

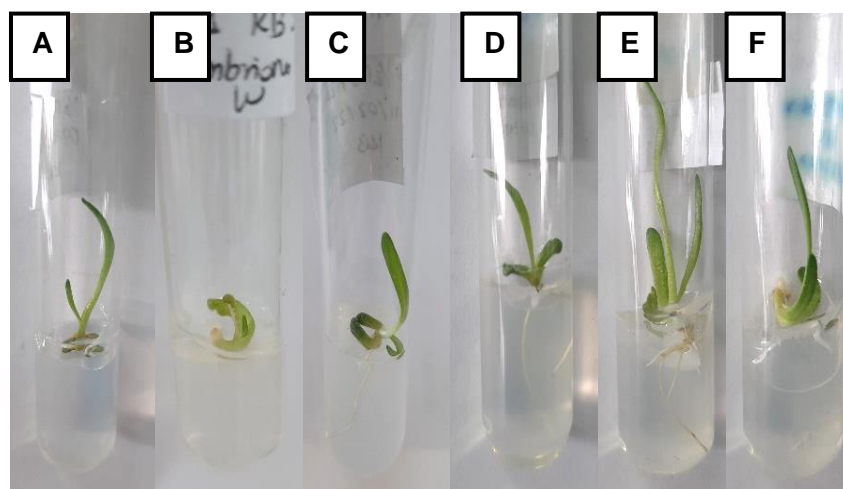
*Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos para las variables germinación*



*Nota. A) Germinación B) Longitud (cm)*

**Figura 17**

*Plantas obtenidas en los diferentes tratamientos de germinación (30 días)*



*Nota. Los ítems representan a los tratamientos A) G0, B) G1, C) G2, D) G3, E) G4, F) G5.*



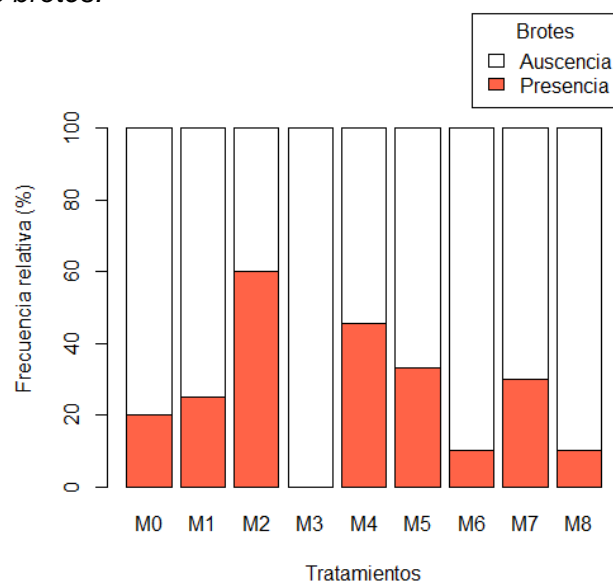
## Etapa de Multiplicación

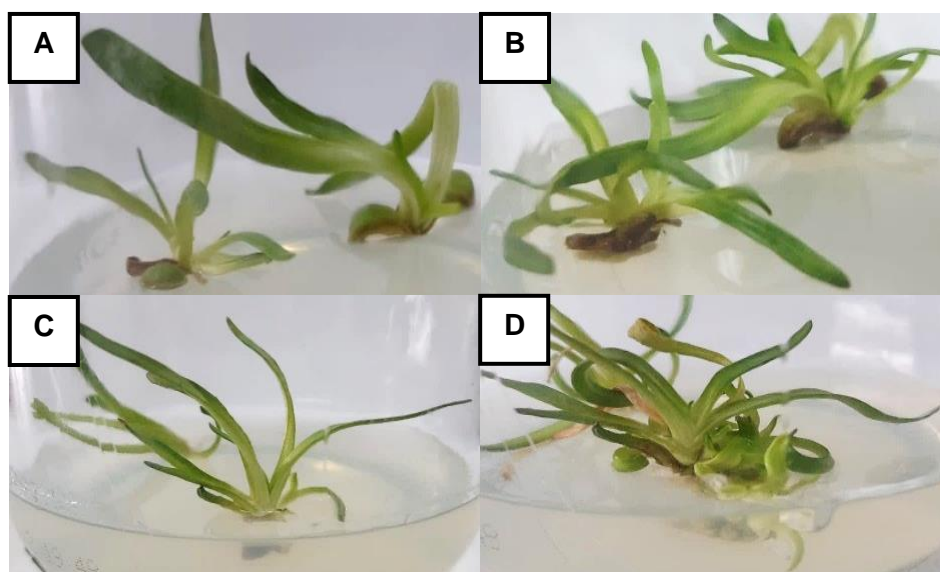
### *Análisis Exploratorio*

En la figura 18 se puede observar que los tratamientos M2 (60%) y M4 (50%) presentaron alto porcentaje en la inducción de brotes. En la Figura 19 se puede observar el aumento de brotes en la planta producido por los dos tratamientos.

### Figura 18

*Porcentaje de inducción de brotes.*



**Figura 19***Inducción de brotes*

*Nota.* Tratamiento M2 A) Plántula de 7 días y B) Plántula de 30 días, Tratamiento M4 C) Plántula de 7 días y D) Plántula de 30 días

***Análisis Inferencial***

Según el Análisis de Varianza realizado, la concentración de BAP influye significativamente en la inducción de brotes, número de brotes por explante y crecimiento longitudinal de la planta. En cambio, se pudo determinar que no existió influencia de los factores ni su interacción en la producción de brotes (Tabla 14).

**Tabla 14**

*Análisis de Varianza respecto a las variables dependientes inducción de brotes, número de brotes por explantes, callo y longitud del explante.*

<b>F.V.</b>	<b>p-valor (Brotos)</b>	<b>p-valor (N° de Brotos/explante)</b>	<b>p- valor (Callo)</b>	<b>p-valor (Longitud cm)</b>
<b>Concentración de Bencilaminopurina [BAP]</b>	0,0438	0,0468	0,2954	0,0019
<b>Concentración de ácido indol acético [AIA]</b>	0,2592	0,1754	0,9597	0,3633
<b>Interacción</b>	0,1503	0,1123	0,9934	0,432

Nota. p-valor menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas

Al realizar el análisis de normalidad de los datos, se pudo determinar que los datos obtenidos para el análisis de inducción de brotes, N° de brotes, formación de callo no presentaban distribución normal a diferencia de la variable longitud, por lo cual para los tres primeros casos se aplicó pruebas no paramétricas y para el caso de la variable longitud se utilizó pruebas paramétricas que permitan determinar el mejor tratamiento (Tabla 15).

**Tabla 15**

*Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables inducción de brotes, número de brotes por explante, callo y longitud*

<b>p(Unilateral D) Brotos</b>	<b>p(Unilateral D) N° de Brotos/explante</b>	<b>p(Unilateral D) Callo</b>	<b>p(Unilateral D) Longitud cm</b>
<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0788

Nota: El p-valor obtenido mayor a  $\alpha=0,05$  indica distribución normal

En el análisis de las variables no paramétricas mediante la prueba Kruskal Wallis (Tabla 16), se pudo determinar que, para la inducción de brotes no existen diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, para el N° de brotes se determinó que existen diferencias

significativas entre tratamientos ( $P < 0,04$ ), siendo el tratamiento M3 diferente a los tratamientos M1, M2 y M4, la variable inducción de brotes mostró que no hay diferencias entre tratamientos (Tabla 17), sin embargo, para la variable longitud en base a la tabla 14 se puede observar que existen diferencias significativas respecto a la concentración de BAP. El análisis de Duncan mostró que los tratamientos M3 y M8 presentaron diferencias significativas a diferencias de los tratamientos M0, M4 y M6 (Tabla 17).

**Tabla 16**

*Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de multiplicación para las variables inducción de brotes, número de brotes por explante y callo*

<b>P-valor (brotes)</b>	<b>P-valor (N° de brotes/explante)</b>	<b>P-valor (callo)</b>
0,0535	0,0402	0,9326

*Nota.* El p-valor obtenido menor a  $\alpha = 0,05$  indica diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 17**

*Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de multiplicación*

<b>Tratamientos</b>	<b>N° de brotes/explante</b>			<b>Longitud (cm)</b>	
	<b>Medias</b>	<b>Ranks</b>		<b>Medias</b>	
<b>M0</b>	1,3	41,9	AB	2,72	BC
<b>M1</b>	1,38	44,13	B	2,33	AB
<b>M2</b>	1,9	59,1	B	2,44	ABC
<b>M3</b>	1	33	A	2,93	C
<b>M4</b>	1,9	56,9	B	2,82	BC
<b>M5</b>	1,4	45,8	AB	2,31	AB
<b>M6</b>	1,1	36,9	AB	2,82	BC
<b>M7</b>	1,4	45,8	AB	2,61	ABC
<b>M8</b>	1,1	36,9	AB	2,15	A

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

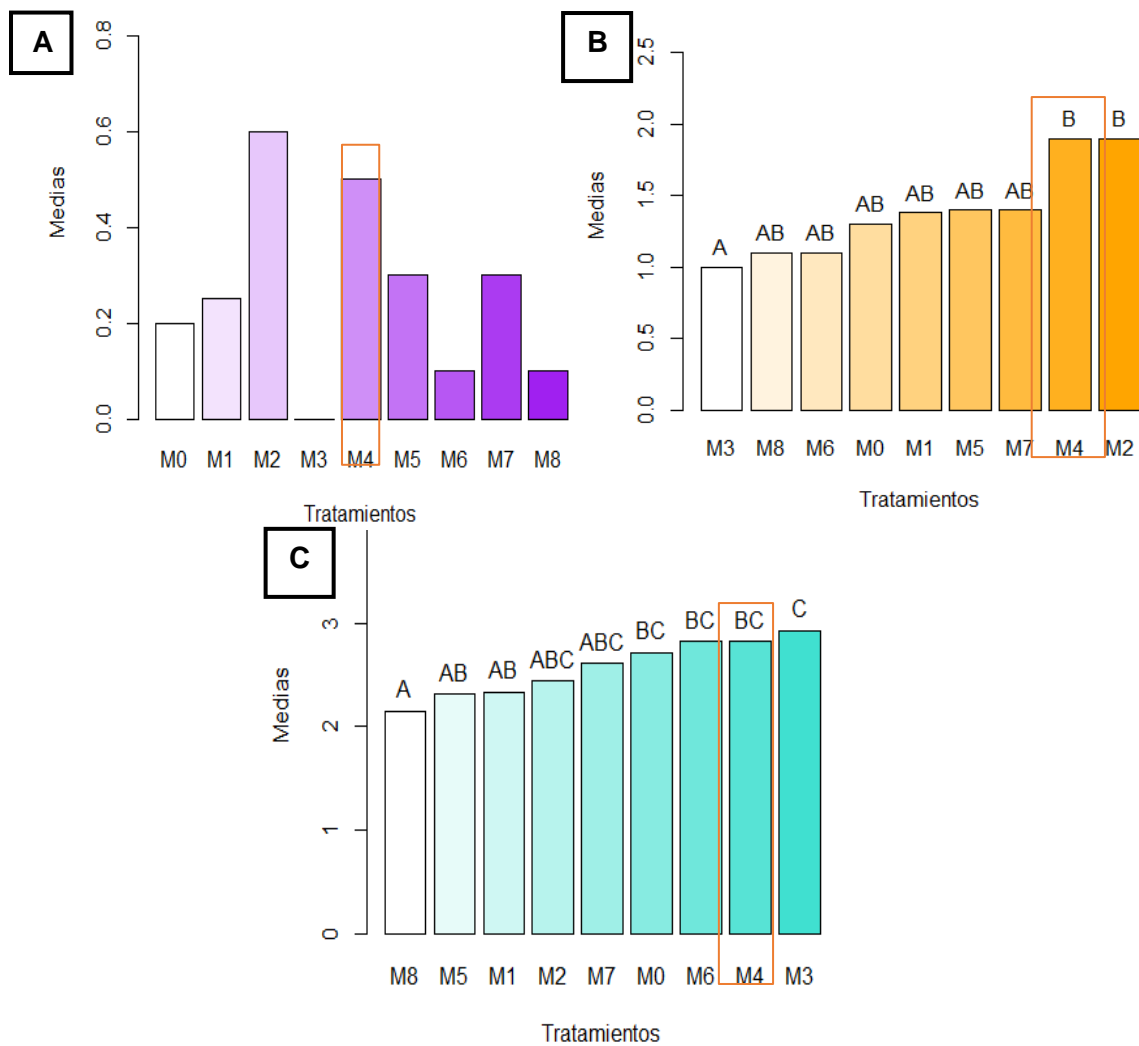
Por lo que según los resultados obtenidos (Figura 20) se pudo determinar que los tratamientos M2 y M4 presentaron resultados favorables para la inducción de brotes y número

de brotes, además el tratamiento M4 presentó mayor crecimiento longitudinal del explante.

Dado esto se escogió como mejor tratamiento al tratamiento M4.

**Figura 20**

*Comparación de las medias entre los diferentes tratamientos para multiplicación*



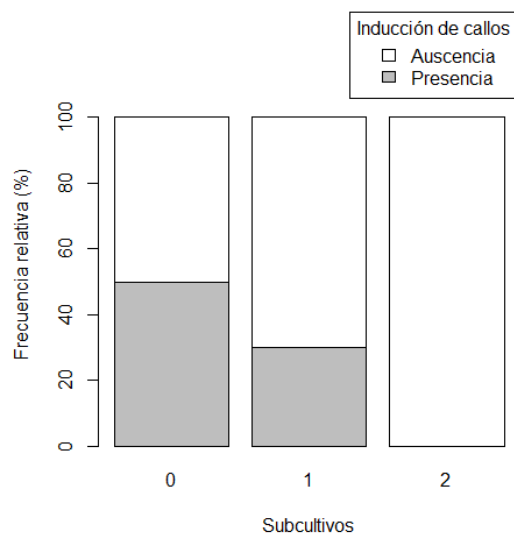
*Nota.* Análisis de A) Inducción de brotes B) Número de brotes/explante y C) Crecimiento longitudinal.

### Análisis Exploratorio

Dado que se estableció M4 como mejor tratamiento, se analizó su efecto en el número de brotes, longitud de brotes e inducción de callo al realizar dos subcultivos, la Figura 21 muestra que existe disminución en la producción de callo al aumentar el número de subcultivos.

**Figura 21**

*Inducción de callos por cada subcultivo*



Al realizar el análisis de normalidad de los datos se pudo determinar que no presentan distribución normal (Tabla 18), por lo que se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para determinar el efecto de los subcultivos.

**Tabla 18**

*Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables número de brotes por explante, callo y longitud del explante*

p(Unilateral D) N° de Brotes/explante	p(Unilateral D) Callo	p(Unilateral D) Longitud (cm)
<0,0001	0,0028	<0,0001

*Nota:* El p-valor obtenido mayor a  $\alpha=0,05$  indica distribución normal

La tabla 19 muestra que el número de subcultivo realizado tiene influencia en la producción de callo, a pesar de esto no influye en el número de brotes y en la longitud de los brotes. Al realizar el análisis de contraste para determinar las diferencias respecto a la producción de callo (Tabla 20), los datos mostraron que las diferencias presentadas no son representativas entre los subcultivos realizados. Por otra parte, en la figura 22 se logra apreciar que, al aumentar el número de subcultivos, el número de brotes aumenta al igual que la longitud, a diferencia de la formación de callo que disminuye, obteniendo en el segundo subcultivo plantas robustas sin presencia de callo (Figura 23).

**Tabla 19**

*Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de multiplicación para las variables número de brotes por explante, callo y longitud del explante*

<b>P-valor (Número de brotes/explante)</b>	<b>P-valor (Callo)</b>	<b>P-valor Longitud (cm)</b>
0,3018	0,0437	0,1024

*Nota.* El p-valor obtenido menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 20**

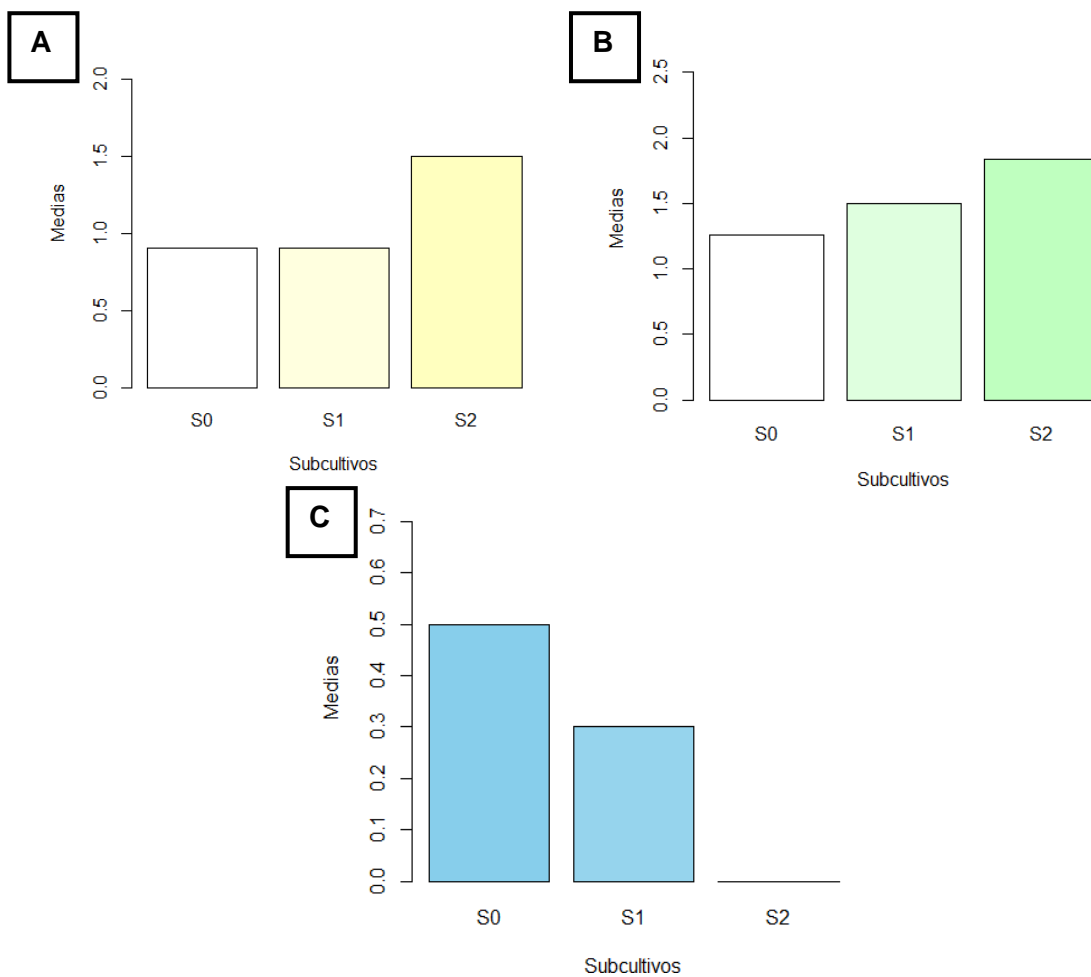
*Test de comparaciones múltiples entre subcultivos para la inducción de callo*

	<b>Callo</b>		
	<b>Medias</b>	<b>Ranks</b>	
<b>S0</b>	0,5	0,53	A
<b>S1</b>	0,3	0,48	A
<b>S2</b>	0,0	0	A

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

**Figura 22**

*Comparación de las medias según el número de subcultivos*

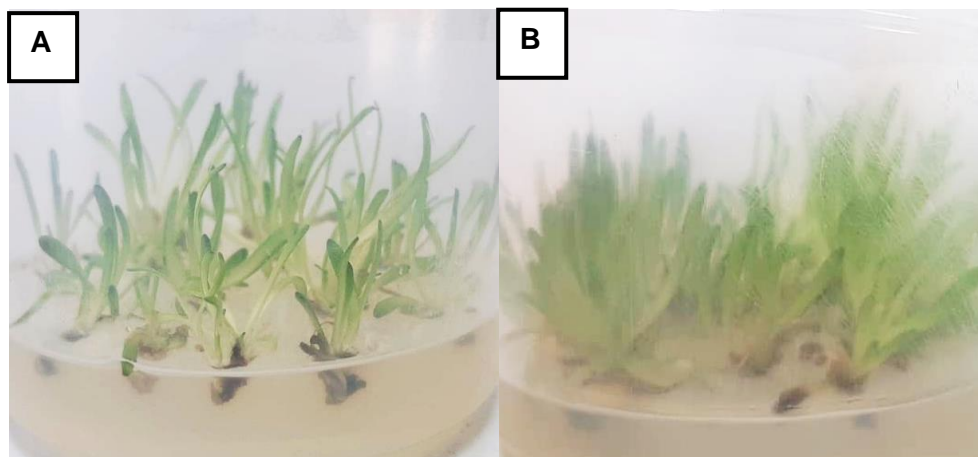


*Nota.* A) Número de brotes/explante B) Longitud de brotes C) Obtención de callo



## Figura 23

*Plántulas subcultivadas*



*Nota.* A) Primer subcultivo B) Segundo subcultivo 30 días después de la introducción.

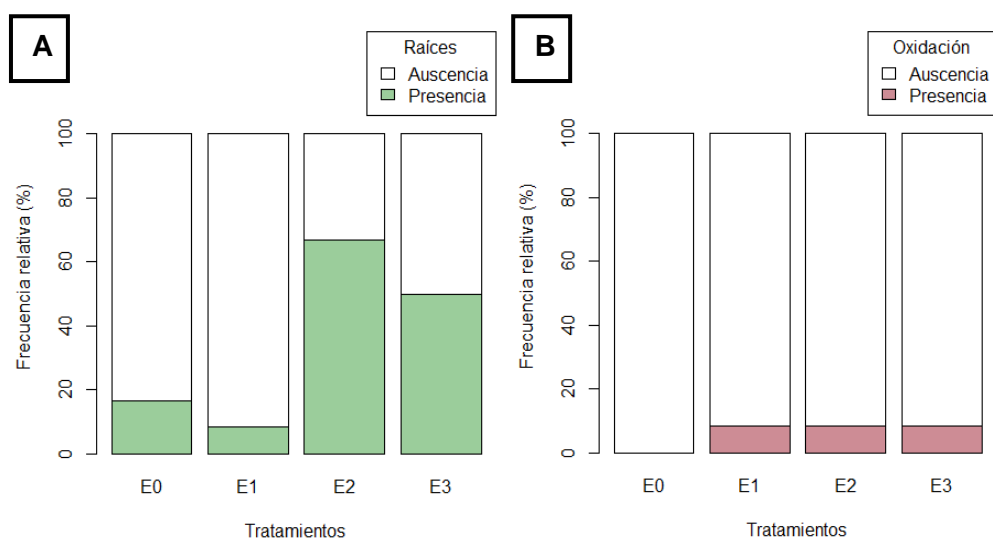
### Etapa de Enraizamiento

#### *Análisis Exploratorio*

En la tabla 21A se puede observar que el tratamiento E2 obtuvo 67% de los explantes enraizados, además se pudo determinar que el 8% de los explantes presentaron oxidación en los tratamientos E1, E2 y E3 (Tabla 21B).

## Figura 24

*Porcentaje de explantes A) enraizados B) oxidados*



Al realizar la prueba de normal para las variables inducción de enraizamiento, número de raíces, oxidación y longitud (cm), se determinó según la Tabla 22 que los datos no siguen una distribución, por lo cual, para determinar y establecer el tratamiento óptimo para enraizar, se aplicó la prueba Kruskal Wallis.

### Tabla 21

*Prueba de Shapiro Wilks modificado para los resultados obtenidos pertenecientes a las variables inducción de raíces, número de raíces por explante, oxidación y longitud(cm).*

<b>p(Unilateral D) Raíces</b>	<b>p(Unilateral D) N° de raíces/explante</b>	<b>p(Unilateral D) Oxidación</b>	<b>p(Unilateral D) Longitud cm</b>
<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

*Nota:* El p-valor obtenido mayor a  $\alpha=0,05$  indica distribución normal

Los resultados mostrados en la Tabla 23 indican que existen diferencias significativas entre tratamientos tanto para la inducción de raíces, número de raíces por explante y longitud, a diferencia de la oxidación. Al realizar las comparaciones de rangos entre tratamientos se determinó que E2 se encuentra ligeramente relacionado al tratamiento E3 respecto a las variables relacionadas, sin embargo, como se observa en la Figura 24 y 25, E2 presentó mejores resultados respecto a inducción de raíces (67%), número de raíces por explante (2,25) y longitud de raíces (0,37) a comparación de E3 por lo que se lo escogió como mejor tratamiento de enraizamiento, referente a la oxidación en todos los tratamientos se obtuvo 0,08 explantes oxidados.

**Tabla 22**

Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes tratamientos de desinfección para las variables inducción de raíces, número de raíces por explante, oxidación y longitud de raíces (cm)

P-valor (raíces)	P-valor (N° de raíces/explante)	P-valor (longitud)	P-valor (oxidación)
0,0086	0,0025	0,0118	0,7905

Nota. El p-valor obtenido menor a  $\alpha=0,05$  indica diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 23**

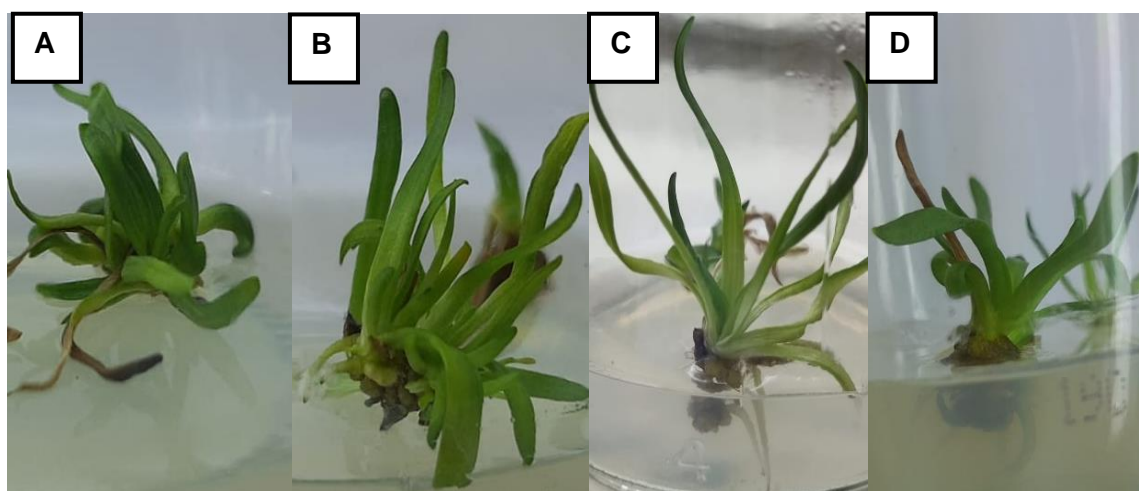
Test de comparaciones múltiples para los tratamientos de enraizamiento

Tratamiento	Inducción de raíces		Medias	Número de raíces		Medias	Longitud(cm)		Medias	Oxidación
	Medias	Rank		Rank	Rank		Rank			
E0	0,17	20,00	A	0,08	19,17	A	0,17	20,75	A	0
E1	0,08	18,00	A	0,08	19,17	A	0,02	17,33	AB	0,08
E2	0,67	32,00	A	2,25	34,08	B	0,37	31,63	AB	0,08
E3	0,50	28,00	AB	1,17	25,58	AB	0,27	28,29	B	0,08

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

**Figura 25**

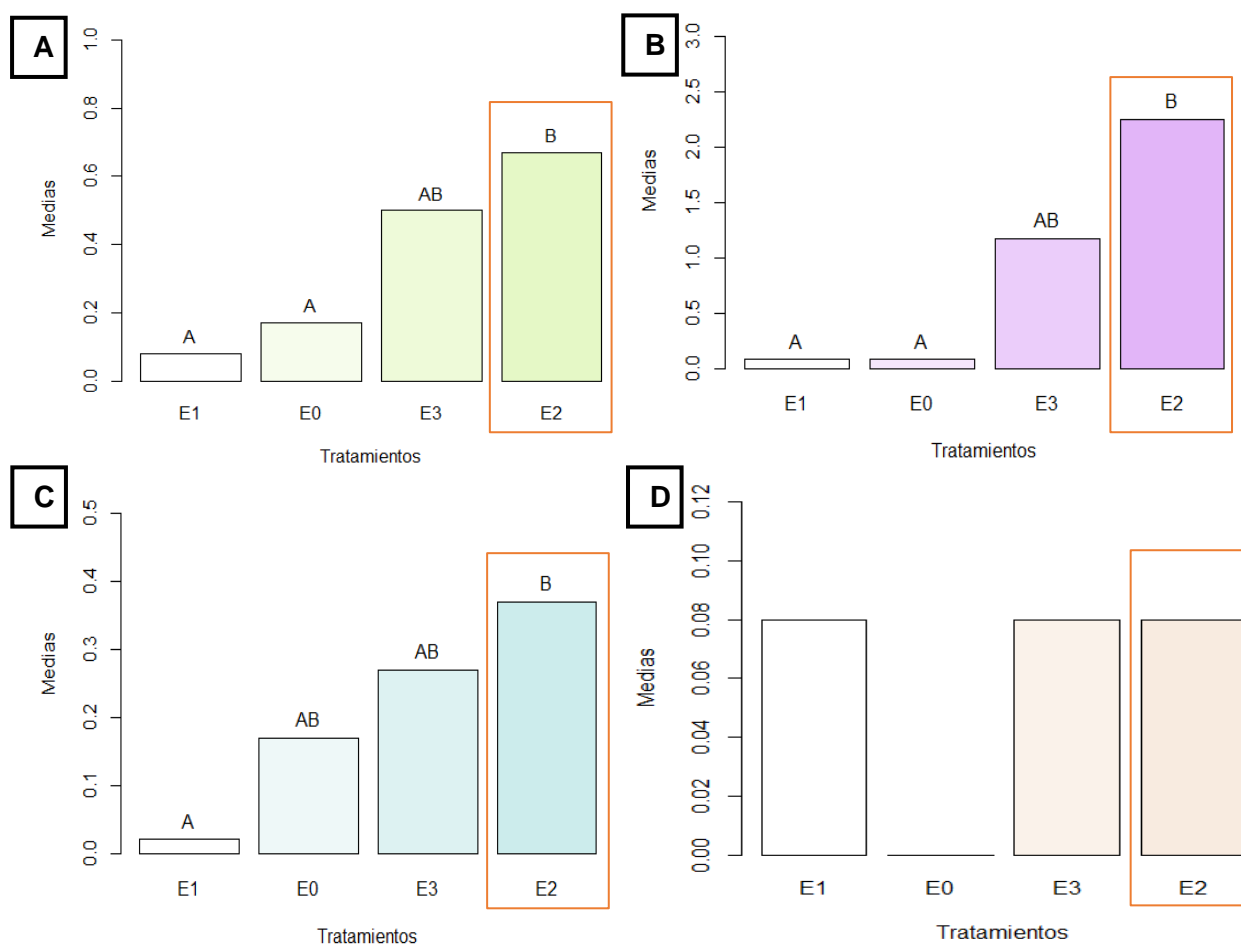
Enraizamiento



Nota. Resultados obtenidos en los 45 días de ensayo A) E0 (Control) B) E1 C) E2 y D) E3

Figura 26

Comparación de las medias según los tratamientos de enraizamiento



Nota. A) Inducción de raíces, B) Número de raíces por explantes C) Longitud de las raíces (cm) y oxidación.

## Capítulo 5: Discusión

Los páramos son importantes fuentes para el almacenamiento de agua y mantenimiento de la biodiversidad, su degradación afecta no solo a las especies presentes en los mismos sino también a sectores rurales, urbanos e industriales. En Ecuador, el Área de Conservación Hídrica Antisana provee de agua al Sur de la ciudad de Quito, la cual se ve amenazada por actividades antropogénicas como el pastoreo (FONAG, 2018), ocasionando degradación de los suelos y baja calidad de agua. Una de las herramientas utilizadas para la conservación de esta área es la restauración activa, que utiliza el trasplante directo de especies vegetales a zonas de restauración, sin embargo, esta técnica puede propagar enfermedades transmitidas por el suelo (Panaia *et al.*, 2009). Por lo tanto, el cultivo *in vitro* surge como alternativa que permite obtener plantas libres de enfermedades y aptas para ser utilizadas en procesos de restauración ecológica (Roberts & Schum, 2003).

Micropropagar especies nativas como *Werneria nubigena* Kunth permitirá no solo obtener un alto número de plantas para ser introducidas, sino también ayudará a mantener su biodiversidad. Cabe señalar que existen muy pocos estudios acerca de *W. nubigena*, siendo esta la primera investigación relacionada a la micropropagación de esta especie y del género *Werneria* Kunth, por lo que muchos de los resultados obtenidos se compararon con investigaciones realizadas en especies de otros géneros dentro de la misma familia.

### **Etapas de Desinfección**

El cultivo *in vitro* de semillas permite aumentar y mantener la diversidad genética de una especie vegetal, por lo cual, este procedimiento requiere de rigurosas condiciones asépticas que permitan obtener una elevada eficiencia en dicho proceso. Por lo tanto, aplicar un protocolo de desinfección óptimo eliminará agentes patógenos como hongos, bacterias e insectos, los cuales influyen negativamente en el desarrollo de las semillas (Cárdenas-Burgos *et al.*, 2019; Hesami *et al.*, 2019).

El protocolo establecido en este proyecto constó de 3 lavados con agua destilada para eliminar residuos de vilano, seguido de un lavado con detergente al 2% por 15 min, esto se realizó debido a que los detergentes permiten una desinfección superficial al retirar los residuos de tierra o desechos orgánicos, además de emulsionar estas partículas evitando que vuelvan a pegarse en la superficie de las semillas (Comrie, 1960). Posteriormente, se utilizó etanol al 75% por 1 min, puesto que concentraciones entre 60% y 90% permiten la eliminación de bacterias a través de la destrucción de la membrana celular y la desnaturalización de sus proteínas (CDC, 2008). Sin embargo, la desinfección con alcohol no es 100% eficiente, por lo que debe ser empleado junto con otros desinfectantes, siendo el hipoclorito de sodio el más apropiado para la desinfección de semillas, ya que no solo ayuda a eliminar bacterias sino también hongos; además, en comparación con otros desinfectantes como el Cloruro de Mercurio (HgCl) es menos perjudicial y sirve como escarificante aumentando la germinación de las semillas (Cao *et al.*, 2018).

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 7, se determinó que la interacción de cloro y el tiempo de inmersión influyen en la desinfección de semillas, siendo los tratamientos más efectivos D2, D4 y D6, obteniendo 100% de eficacia (figura 13 A), estos resultados son similares a los obtenidos en las especies *P. nítida*, *A.gynoxoide* y *P. ledifolia* (Pérez & Castañeda 2017). Adicionalmente, se analizó el efecto tanto del cloro y el tiempo de inmersión en la germinación de semillas para así determinar el tratamiento óptimo en la etapa de desinfección. En la tabla 7 se puede encontrar que el tiempo de inmersión influyó en la germinación, siendo el tratamiento D2 el que mayor porcentaje de semillas germinadas presentó (figura 13 B). Lindsey *et al.*, (2017) menciona que tiempos de inmersión elevados en hipoclorito de sodio puede generar mortalidad en las semillas o generar defectos en el desarrollo de las plántulas, esto se pudo observar en el tratamiento D6 que tuvo nula contaminación y germinación de semillas, por lo que, se estableció como tratamiento óptimo el

tratamiento D4 (Hipoclorito de sodio 6% por 7,5 min) ya que fue efectivo en la desinfección y germinación.

### **Etapas de Germinación**

En esta etapa se pretendió utilizar diferentes concentraciones de MS y AG para aumentar el porcentaje de germinación obtenido en el proceso anterior, sin embargo, se determinó que este porcentaje se redujo, siendo el valor más alto 13,33% obtenido en el tratamiento control; esta reducción pudo deberse a varios factores como baja viabilidad, envejecimiento o latencia de las semillas. Según Cuadra (1993), latencia es “ la incapacidad de una semilla para germinar, debido a que las condiciones ambientales no son las apropiadas para hacerlo, sin embargo mantienen su viabilidad”. Penfield (2017) menciona que la latencia en semillas se produce cuando la planta madre pretende dispersarse a lugares lejanos o cuando las condiciones a las que se encuentran expuestas no son apropiadas, aumentando el letargo en semillas ocasionado por la cubierta (testa). La familia Asteraceae presenta estas características ya que gracias a este mecanismo pueden propagarse con facilidad, crear bancos de semillas en suelos y colonizar sitios perturbados (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2021).

Para determinar si la testa influía en la germinación se cultivaron embriones en los distintos tratamientos, obteniendo un aumento del 30% en el porcentaje de germinación (Figura 14). T. Villacres (2022), menciona que esta especie presenta latencia fisiológica, la latencia fisiológica se produce por hormonas inhibitoras de la germinación en ausencia de desencadenantes ambientales específicos (Penfield, 2017). Existen dos hormonas principales que permiten la germinación de semillas las cuales son ácido Giberélico (AG) y ácido abscísico (ABA); al existir latencia fisiológica existe un aumento en la biosíntesis de ABA, esta fitohormona reduce el proceso germinativo de la semilla inhibiendo los efectos producidos por AG, la cual estimula la germinación de semillas (Gupta & Chakrabarty, Po 2013).

Se analizó el efecto del ácido giberélico en la germinación de los embriones introducidos, en donde se determinó que no existe efecto de esta hormona en la germinación; estos resultados son similares a los obtenidos en las especies *M. andicola*, *D. rupestre*, *M. peruviana* y *D. rhomboidale*. A pesar que esta giberelina no influye en la germinación como tal, todavía tiene la capacidad de influir positivamente en las capacidades germinativas en especies de la familia Asteraceae (Pazmiño, 2021).

En estudios relacionados con la concentración de MS se ha determinado que, en especies de la familia Asteraceae su reducción favorece a la germinación de embriones, en contraste con lo obtenido en el presente estudio, cuyos resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la germinación de embriones al reducir la concentración del medio. A pesar que en este ensayo no se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos planteados para germinación, se escogió como mejor tratamiento a G4 (MS+1mg/L AG) ya que la combinación de MS y AG influye en el alargamiento de tallos y hojas, permitiendo obtener plantas de mayor altura (Gupta & Chakrabarty, 2013), esto se puede observar en la figura 16 B, en donde la altura promedio es de 1,13cm, siendo el valor más alto respecto a los demás tratamientos.

### **Etapa de Multiplicación**

Para inducir la formación de brotes se analizaron diferentes concentraciones de Bencil amino purina (BAP) y Ácido indol acético, cuyos resultados mostraron que el tratamiento M2 con una alta concentración de BAP [2mg/L] indujo a la formación de brotes en 60% de los explantes, estos resultados son similares a los obtenidos en las especies *Senecio calvus*, *Chuquiragua jussieui* y *Artemisia Chamaemelifolia*, cuyas investigaciones demuestran que una alta cantidad de citoquinina induce a un aumento en la inducción de brotes, a pesar de ello en estos mismos estudios se ha determinado que altas concentraciones de BAP puede afectar en



la longitud de los explantes y producir vitrificación de los mismos (Hristova *et al.*, 2013; Laguna *et al.*, 2019; Orquera, 2013).

Dado los resultados obtenidos previamente, se realizó el análisis de citoquininas-auxinas, para determinar el tratamiento que induzca un alto porcentaje y número de brotes además de explantes de mayor longitud, por lo que se determinó como mejor tratamiento al tratamiento M4 conformado por 1 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de AIA, ya que obtuvo brotes en 50% de los explantes analizados, el número de brotes por explantes fue igual al obtenido con concentraciones altas de BAP y la altura promedio de los explantes fue de 2,82 cm, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jiménez-Vázquez *et al* (2020) y Pino *et al* (2017) quienes analizaron el efecto de estas citoquininas y auxinas en las especies *Smilax sonchifolius* y *Colocasia esculenta*. Ambas investigaciones establecen en sus investigaciones que las citoquinas permiten inducir un alto número de brotes y las auxinas aumentan la longitud de los explantes, además, Pino *et al* (2017) señala que no sólo influyen en la longitud de los explantes sino también en su grosor.

Este análisis se realizó además en *Lupinus microphyllus* una especie perteneciente a la Familia Fabaceae que crece en los páramos del Antisana, cuyo resultados fueron similares a los obtenidos en el presente (Luzuriaga, 2020), esto indica que la utilización de este tratamiento puede emplearse en otras familias de plantas que crecen en los páramos Andinos.

Al cabo de dos subcultivos realizados en el tratamiento establecido previamente, se pudo evidenciar la disminución de callogénesis, además, del aumento en la obtención de brotes por cada subcultivo con longitudes entre 1,5 cm y 2 cm (figura 22), además hubo ausencia de oxidación en los explantes a diferencia de lo mencionado por Luzuriaga Tinoco, (2020).

## Etapa de Enraizamiento

Las auxinas ayudan en el alargamiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Alarcón *et al.*, 2019), entre las principales auxinas naturales se encuentra el AIA, este fitorregulador ayuda en el desarrollo de las plantas promoviendo el alargamiento y multiplicación celular, forma nuevos tejidos y al igual que otras auxinas ayuda en el fototropismo y gravitropismo, además por ser un fitorregulador natural este tiende a ser degradado fácilmente por las células (Vega-Celedón *et al.*, 2016) a diferencia de auxinas sintéticas como el ANA el cual puede acumularse en las células llegando a afectar negativamente en el desarrollo de la planta (García *et al.*, 2015); por estas características es utilizada para promover el desarrollo de raíces *in vitro*.

En estudios realizados en *Dhalis sp* y *Tripleurospermum insularum*, establecieron que una concentración de 0,5mg/L de este fitorregulador permite obtener altos porcentajes de enraizamiento (~100%) (Inceer *et al.*, 2022; Indacochea *et al.*, 2018). A pesar de ello, en el presente trabajo de investigación se determinó que, a esta concentración el porcentaje de explantes enraizados fue del 8%, siendo el resultado más bajo de todos los tratamientos (Figura 24 A). Al aumentar la concentración de AIA [1mg/L a 3mg/L] se obtuvo una mayor porcentajes de brotes enraizados, estos resultados se asemejan con los obtenidos por Sujatha & Kumari, (2007) quienes mencionan que concentraciones entre 0,5 – 3mg/L obtienen altos porcentajes de brotes enraizados en *Artemisia vulgaris* L, dado los resultados obtenidos el tratamiento E2 se escogió como mejor tratamiento para la fase de enraizamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permiten micropropagar la especie *Werneria nubigena* Kunth, además pueden ser utilizados para investigaciones posteriores relacionadas a otras especies de la familia Asteraceae que crecen en los páramos del Antisana y que pueden ser utilizadas para restauración ecológica de la Reserva Hídrica Antisana como: *Hypochaeris sp*, *Helogyne sp*, *Senecio aratum*, entre otros (Aguirre *et al.*,

2013). Además, al ser el primer estudio de micropropagación relacionado al género *Werneria* Kunth, podría ser aplicativo en la conservación de especies de este género que se encuentren en peligro de extinción o sean vulnerables

## Capítulo 6: Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

El protocolo de desinfección óptimo establecido constó de detergente al 2% por 15 min, etanol al 75% por 1 min y cloro al 6% por 7,5 min, dado que obtuvo 100% de desinfección y alto porcentaje de germinación (50%).

Para la fase de germinación se retiró la testa, ya que aumentó el porcentaje de germinación (~40%), de la misma manera el tratamiento G4 elaborado con MS+1mg/L AG<sub>3</sub> permitió obtener plantas aptas para el proceso de multiplicación

El tratamiento M3 compuesto por 1mg/L de BAP y 0,3 mg/L de AIA permitió obtener brotes en 50% de los explantes analizados con un promedio de 1,9 brotes por explante, además, influyó positivamente en la altura de los explantes, por consiguiente, se estableció este tratamiento para la fase de multiplicación.

Se estableció que la concentración de 1mg/L de AIA permitió obtener raíces en el 67% de los explantes introducidos, 2,25 raíces por explante con longitud de 0,37cm, siendo el que mejores resultados presentó en la fase de enraizamiento

El presente trabajo permitió la multiplicación *in vitro* de *Werneria nubigena* Kunth a ser utilizada en procesos de restauración ecológica.

**Recomendaciones**

Analizar el efecto de los tratamientos a nivel citogenético para determinar la presencia de mutaciones en las plantas obtenidos, debido a que estas serán introducidas en áreas protegidas.

Analizar el efecto de menores concentraciones de cloro en la desinfección a los mismos tiempos de inmersión establecidos en este estudio.

Al ser una planta de páramo se puede determinar los principios activos que presenta.

Determinar el porcentaje de supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación.

## Bibliografía

- Agriculture, U. S. D. of. (s/f). *Collecting Native Seed*. Recuperado el 23 de mayo de 2022, de [https://www.fs.fed.us/wildflowers/Native\\_Plant\\_Materials/developing/collecting.shtml](https://www.fs.fed.us/wildflowers/Native_Plant_Materials/developing/collecting.shtml)
- Aguirre, N., Torres, J., & Velasco, P. (2013). Guía para la restauración ecológica en los páramos del Antisana. *Fondo de protección del agua FONAG.*, 1, 9–13. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/07/Guía-Metodológica-restauracion-páramos.pdf>
- Akhtar, G., Jaskani, M. J., Sajjad, Y., & Akram, A. (2016). Effect of Antioxidants, Amino Acids and Plant Growth Regulators on *in vitro* Propagation of *Rosa centifolia*. *Iranian journal of biotechnology*, 14(1), 51–55. <https://doi.org/10.15171/IJB.1152>
- Alarcón, M. V., Salguero, J., & Lloret, P. G. (2019). Auxin modulated initiation of lateral roots is linked to pericycle cell length in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 10, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00011/BIBTEX>
- Albuja Viteri, L. H. (2007). *Biología y Ecología del Venado de Cola Blanca (Odocoileus virginianus ustus Gray, 1874) en un sector de páramo*. 34–57.
- Alcantara, J., Castilla, M., & Sanchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1, 71–83. <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/viewFile/2222/2382>
- Beltrán, H. (2017). ( Asteraceae : Senecioneae ) del Perú A synopsis of genus *Werneria* ( Asteraceae : Senecioneae ) from Peru. *Arnoldoa*, 24(1), 45–62. <https://doi.org/10.22497/arnoldoa.241.24104>
- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. Modern Applications of Plant. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 31–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

12-802221-4.00002-9

Bhatla, S. C. (2018). Auxins. *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 569–601.

[https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1\\_15/COVER](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_15/COVER)

Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Culture Media. En *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 27–37). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_3)

Calisto, L. (2016). *Guía De plantas alto pita*.

<http://www.fonag.org.ec/web/imagenes/paginas/fondoeditorial/27.pdf>

Camacho, M. (2013). Los Páramos Ecuatorianos : Caracterización Y Consideraciones Para Su Conservación Y. *ANALES de la Universidad Central del Ecuador* 372, 76–92.

Cao, Y., Liang, L., Cheng, B., Dong, Y., Wei, J., Tian, X., Peng, Y., & Li, Z. (2018). Pretreatment with NaCl Promotes the Seed Germination of White Clover by Affecting Endogenous Phytohormones, Metabolic Regulation, and Dehydrin-Encoded Genes Expression under Water Stress. *International journal of molecular sciences*, 19(11).

<https://doi.org/10.3390/IJMS19113570>

Cárdenas-Burgos, C. A., Araque-Barrera, J., Bohorquez-Quintero, M. D. L. Á., Hernández-Herrera, Y., & Pacheco-Maldonado, J. C. (2019). *In vitro* propagation of *bucquetia glutinosa*, endemic species of the colombian paramos. *Rodriguesia*, 70.

<https://doi.org/10.1590/2175-7860201970057>

Centers for Disease Control and Prevention. (2008). *Chemical Disinfectants*.

<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html>

Chimdessa, E. (2020). Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Journal of Tissue Culture and Bioengineering*, 3(01). <https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>

- Christmann, T., & Oliveras, I. (2020). Nature of Alpine Ecosystems in Tropical Mountains of South America. *Encyclopedia of the World's Biomes*, 282–291.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12481-9>
- COL | *Werneria nubigena* Kunth. (2021). <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/5BXH7>
- Comrie, B. A. A. D. (1960). Detergents and Sterilization in Breweries. *Heron & Comrie*, 134–141.
- Cuadra, C. (1993). Germinación, latencia y Dormición de las semillas. En *Ministerio de Agricultura y Alimentación*.
- Das, A., Thakur, S., Shukla, A., Singh, P., Ansari, J., & Singh, N. P. (2020). Genetic transformation. *Chickpea: Crop Wild Relatives for Enhancing Genetic Gains*, 205–224.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818299-4.00008-7>
- Debergh, P. C., & Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 14(4), 335–345.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4238\(81\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(81)90047-9)
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 28(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF02632183>
- FONAG. (2018). *Actualización del plan de manejo del área de conservación hídrica antisana*.  
\_\_\_\_\_.
- Franco, V. (2021, diciembre 13). *Gelling agents and their role in plant tissue culture*.  
<https://labassociates.com/gelling-agents-and-their-role-in-plant-tissue-culture>
- Funk, V. A. (1997). *Werneria* s.l. (Compositae: Senecioneae) in Ecuador. *Estudios sobre Diversidad y Ecología de Plantas*, 25–35.  
[https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/11374/bot\\_1997\\_pr\\_Funk\\_Werneria.pdf](https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/11374/bot_1997_pr_Funk_Werneria.pdf)



- García, J. G., García, J. G., Alvarado, E. S., & Bolaños, J. A. (2015). Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Bioteconología Vegetal*, 15(1). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/4>
- Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., & Morgenstern, Y. (2011). The stem cell state in plant development and in response to stress. *Frontiers in Plant Science*, 2(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00053>
- Guano Vasco, M. (2016). *PROGRAMA DE MANEJO SOSTENIBLE PARA EL VENADO DE COLA BLANCA *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) PARA LA RESERVA DE PRODUCCIÓN DE FAUNA CHIMBORAZO* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5426/1/TESIS..pdf>
- Gulzar, B., Mujib, A., Qadir Malik, M., Mamgain, J., Syeed, R., & Zafar, N. (2020). Plant tissue culture: agriculture and industrial applications. En *Transgenic Technology Based Value Addition in Plant Biotechnology*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818632-9.00002-2>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9). <https://doi.org/10.4161/PSB.25504>
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. (2019). Modeling and Optimizing *in vitro* Sterilization of *Chrysanthemum* via Multilayer Perceptron-Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00282>
- 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*, 223–254. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-025.pdf>

- Hristova, L., Damyanova, E., Doichinova, Z., & Kapchina-Toteva, V. (2013). Effect Of 6-benzylaminopurine on micropropagation of artemisia chamaemelifolia vill. (asteraceae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(SUPPL. 2), 57–60.
- Hupp, N., Llambi, L., Ramirez, L., & Callaway, R. (2017). Alpine cushion plants have species-specific effects on microhabitat and community structure in the tropical Andes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 28(5), 928–939. <https://doi.org/10.1111 / jvs.12553>
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50568>
- iNaturalist. (s/f). *Chicoria Blanca (Werneria nubigena) · iNaturalist Ecuador*. Recuperado el 2 de agosto de 2021, de <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/316886-Werneria-nubigena>
- Inceer, H., Cuce, M., Imamoglu, K. V., Ergin, T., & Ucler, A. O. (2022). *In vitro* propagation and cytogenetic stability of Tripleurospermum insularum (Asteraceae) – a critically endangered insular endemic species from Turkey. <https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2029969>. <https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2029969>
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>
- Instituto de Botánica Darwinion*. (1861). Proc. Amer. Acad. Arts. <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=villosa&genero=Werneria&espcod=17948>
- Jiang, Z., Li, J., & Qu, L. J. (2017). Auxins. *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*, 39–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00002-5>

- Jiménez-Vázquez, A. M., Flores-Palacios, A., Flores-Morales, A., Perea-Arango, I., Gutiérrez, M. D. C., Arellano-García, J. D. J., & Valencia-Díaz, S. (2021). Seed longevity, viability and germination of four weed-ruderal asteraceae species of ethnobotanic value. *Botanical Sciences*, 99(2), 279–290. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.2743>
- Klčová, L., & Gubišová, M. (2003). Utilisation of *in vitro* Techniques in Rescue of Gene Resources of Meadow Vetchling (*Lathyrus pratensis* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39(No. 3), 84–88. <https://doi.org/10.17221/3724-cjgpb>
- Kleemann, J., Koo, H., Hensen, I., Mendieta-Leiva, G., Kahnt, B., Kurze, C., Inclan, D. J., Cuenca, P., Noh, J. K., Hoffmann, M. H., Factos, A., Lehnert, M., Lozano, P., & Fürst, C. (2022). Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador. *Biological Conservation*, 265, 109404. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2021.109404>
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. En *Plant Biotechnology and Agriculture* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
- Labanonturf. (2013). *THE IMPORTANCE OF MYO-INOSITOL IN PLANTS*. Plant Biostimulants. <https://www.lebanonturf.com/education-center/plant-biostimulants/the-importance-of-myo-inositol-in-plants>
- Laguna, Y., Cueva, J., Tamariz, C., & Olivera, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de senecio calvus (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(2), 111–121. <https://doi.org/10.18271/RIA.2019.455>
- Li, X., & Gallagher, J. L. (1996). Tissue culture and plant regeneration of big cordgrass, *Spartina cynosuroides*: Implications for wetland restoration. *Wetlands*, 16(4), 410–415.

<https://doi.org/10.1007/BF03161330>

Lindsey, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2017(128), 56587. <https://doi.org/10.3791/56587>

Luteyn, J. L. (1999). *Páramo Ecosystem*. Missouri Botanical Garden.

[http://www.mobot.org/mobot/research/paramo\\_ecosystem/introduction.shtml](http://www.mobot.org/mobot/research/paramo_ecosystem/introduction.shtml)

Luzuriaga Tinoco, M. J. (2020). Desarrollo de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus* como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del antisana. En *Universidad UTE*. Universidad UTE.

Matovelle, C. (2021). Páramo to Pasture Conversion in a Mountain Watershed: Effects on Water Quality and Quantity. <https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-21-00026.1>, 41(4), R74–R81. <https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-21-00026.1>

Melissa, P. (2013, junio 15). *Asteraceae - Fruit and seeds | Britannica*.

<https://www.britannica.com/plant/Asteraceae/Fruit-and-seeds>

Merck. (2022). *Gelling Agents – Plant Tissue Culture Protocol*.

<https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/plant-tissue-culture/gelling-agents>

Minambiente. (s/f). *Restauración - Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*. Recuperado el 5 de junio de 2022, de <https://www.minambiente.gov.co/direccion-de-bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistemicos/restauracion-2/>

Minga, D., Ansaloni, R., Verdugo, A., & Ulloa, C. U. (2016). *Flora del Páramo del Cajas, Ecuador*. Universidad del Azuay.

Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.

En W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. (pp. 19–40). <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54686>

Norsuzila Ya'acob, M., Abdullah, M., Ismail, Medina, M., Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Axelsson, L., Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J., Kerkeni, L., Ruano, P., Delgado, L. L., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., Rigau, J., ... Masuelli, M. (2012). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech*, 32, 137–144.

<http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-tec-prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region%0AInTec>

Orquera, G. (2013). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE CHUQUIRAGUA (Chuquiraga jussieu) A PARTIR DE YEMAS APICALES Y AXILARES* [Escuela Politécnica del Ejército].

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7167/1/T-ESPE-047408.pdf>

Oseni, O. M., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2018). A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 3778–3786.

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>

Panaia, M., Bunn, E., & McComb, J. (2009). *In vitro research with difficult to propagate Cyperaceae spp for ecological restoration of post-mined landscapes in a biodiverse region (south-west Western Australia) - Murdoch University Research Repository*.

<https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/24508/>

Paz, A. J. (2021, agosto 4). *Ecuador: el agua y el cóndor andino convirtieron a Antisana en parque nacional*. <https://es.mongabay.com/2021/08/ecuador-agua-condor-antisana-parque-nacional/>

- Pazmiño, G. (2021). *Germinación in vitro de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca*. Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27(17), R874–R878. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.050>
- Pérez, B. A., & Castañeda, S. L. (2017). Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana*, 19(2), 1–8. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/497/49753656008/49753656008.pdf>
- Peris, C. I. L., Rademacher, E. H., & Weijers, D. (2010). Green Beginnings – Pattern Formation in the Early Plant Embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 91(C), 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91001-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91001-6)
- Pino, A., Torres, J., Basail, M., Guitiérrez, Y., Medero, V., Rodriguez, D., Rodriguez, D., Beovides, Y., Ray, A., Álvares, D., & Bauta, M. (2017). Efecto de 6-BAP y AIA en el establecimiento *in vitro* de meristemos de esculenta (L.) Schott cv. . *Bioteología Vegetal*, 17(1), 67–70. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2012.36085>
- Podwyszynska, M., & Olszewski, T. (1995). Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. *Scientia Horticulturae*, 64(1–2), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(95\)00826-0](https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00826-0)
- Prasunal, V. N. S., & Srinivas, B. (2016). Role of Different Carbon Sources on *in Vitro* Micropropagation of Oxalis Corniculata (L.). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 6(3), 98–104. <https://doi.org/10.21276/ijpbs.2016.6.3.12>
- Pullaiah, T., Karuppusamy, S., & Swamy, M. K. (2022). Propagation of paclitaxel biosynthesizing plants. *Paclitaxel*, 171–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90951-8.00011-4>

- Ramsay, P. M. (1992). The paramo vegetation of Ecuador: the community ecology, dynamics and productivity of Tropical grasslands in the Andes. *School of Biological Sciences, PhD*(December), 282.
- Real Academia Española. (2021). *páramo* | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE. <https://dle.rae.es/páramo>
- Roberts, A. ., & Schum, A. (2003). Cell, tissue, and organ culture. En *Encyclopedia of Rose Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00124-5>.
- Rodríguez Murcia, C. E., & Rivera Ospina, D. (2011). *Guía divulgativa de criterios para la delimitación de páramos de Colombia*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13017>
- Royal Botanic Gardens. (2017). *Werneria nubigena Kunth* | *Plants of the World en línea* | *Ciencia Kew*. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:260421-1>
- Schmlling, T. (2013). Cytokinin. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 1, 627–631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00456-4>
- Sevillano-Ríos, C. S., Rodewald, A. D., & Morales, L. V. (2020). Alpine Birds of South America. *Encyclopedia of the World's Biomes*, 1–5, 492–504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11806-8>
- Singh, C. R. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11(4), 165–172. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2018.165.172>
- Sklenář, P., & Romoleroux, K. (2021). *Werneria spathulata*, nuevo registro para la flora del Ecuador, y redescubrimiento de *Xenophyllum ace.pdf* (pp. 214–217). <https://doi.org/10.15446/caldasia.v43n1.81909>
- Sponsel, V. M. (2003). Gibberellins. *Encyclopedia of Hormones*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00108-X>

- Sudhersan, C., AboEl-Nil, M., & Hussain, J. (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *Journal of Arid Environments*, 54(1), 133–147. <https://doi.org/10.1006/jare.2001.0884>
- Sujatha, G., & Kumari, B. D. R. (2007). Effect of phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulgaris* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0023-0>
- Sulusoglu, M. (2014). Effects of agar types on rooting performance in tissue culture: Sample of Quince A rootstock cultures. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue*, 1.
- UICN. (2010, julio 9). *Paramos | IUCN*. <https://www.iucn.org/content/paramos>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Revisión bibliográfica BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS POR BACTERIAS Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*, 37(especial), 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Villacres, G. (2015). DIVERSIDAD FLORÍSTICA A DIFERENTE ALTITUD EN EL ECOSISTEMA PÁRAMO DEL CANTÓN TISALEO PROVINCIA DE TUNGURAHUA. En *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo* (Vol. 120, Número 11). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Villacres, T. (2022). *Evaluación del fotoperíodo y de la temperatura en la germinación in vitro de tres especies presentes en el Parque Nacional Coca Cayambe* (Número 8.5.2017). Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Wang, J., Seliskar, D. M., Gallagher, J. L., & League, M. T. (2006). Blocking Phragmites



australis reinvasion of restored marshes using plants selected from wild populations and tissue culture. *Wetlands Ecology and Management* 2006 14:6, 14(6), 539–547.

<https://doi.org/10.1007/S11273-006-9006-6>

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4), 2837–2849. <https://doi.org/10.1007/S11033-012-2299-Z>

Zapater, V. (2010). *Reserva Ecológica Antisana y Proyecto Cóndor. Antisana Ecological Reserve and Condor Project • Valentí Zapater*. <https://valentizapater.net/reserva-ecologica-antisana-proyecto-condor/>

Zurita Valencia, W., Gómez Cruz, J., Atrián Mendoza, E., Hernández García, A., Granados García, M., García Magaña, J., Salgado Garciglia, R., & Sánchez Vargas, N. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (tiliaceae). *Polibotánica*, 0(38), 129–144.