



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador

Taipe Unapucha, Mateo Sebastián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

PhD. Proaño Tuma, Karina Isabel

Sangolquí, 16 de agosto de 2022



Taipe_Tesis_Copyleaks.docx

Scanned on: 23:58 August 16, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found

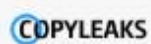


Total Words in Text

Identical Words	69
Words with Minor Changes	9
Paraphrased Words	87
Omitted Words	0



Escanea este código QR para
KARINA
ISABEL



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador"** fue realizado por el señor **Taipe Unapucha, Mateo Sebastián**; 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, 24 de agosto de 2022



.....
Proño Tuma, Karina Isabel Ph.D.
C. I. 1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Taipe Unapucha, Mateo Sebastián**, con cédula de ciudadanía n° 1722538855, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

.....
Taipe Unapucha, Mateo Sebastián
C.I.: 1722538855



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Taipe Unapucha, Mateo Sebastián**, con cédula de ciudadanía n° 1722538855, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

Taipe Unapucha, Mateo Sebastián

C.I.: 1722538855

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado a mi familia, especialmente:

En memoria de mi padre, Fabián Taipe quien en su momento con su sabiduría y visión fue
una guía importante para aspirar a grandes cosas en mi vida.

A mi mamá y hermano, Mariana y Cristhian quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me
han ayuda a conseguir este logro tan importante para mí.

Finalmente, a mis demás amigos y familiares quienes con su cariño y apoyo incondicional
me llenan de vida y me motivan a seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por las bendiciones recibidas por siempre estar a mi lado en cada momento de mi vida.

A mi directora Karina Proaño, Ph.D. un agradecimiento especial por su apoyo, guía y conocimiento brindado tanto en lo personal como en el desarrollo del trabajo de titulación.

A mis codirectoras María Claudia Segovia, Ph.D. y Mónica Jadán, Ph.D. les agradezco por su guía y por estar pendiente del proceso para el exitoso desarrollo del presente trabajo.

Agradezco por su guía técnica y colaboración en el desarrollo del trabajo de titulación a Mgtr. Andrea Ortega

A mis compañeros de tesis, Nathy, Alexis, Andre, C y Karol, por los lindos momentos compartidos en el laboratorio.

A la Ing. Gabriela Pazmiño, por su ayuda, guía y conocimiento brindado durante el desarrollo de mi tesis.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes.

Índice de contenidos

Carátula	1
Informe Copyleaks	2
Certificación Docente	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Planteamiento del problema	16
Justificación del problema	17
Objetivos	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	19
Capítulo II: Marco Teórico	20
Páramos de la región Andina	20
Lm;n Características generales.....	20

Situación actual de los páramos	20
Familia Asteraceae.....	21
Características generales	21
Situación actual en el Ecuador.....	22
Género <i>Diplostephium</i>	22
Iniciativas de conservación de especies vegetales.....	23
Técnica de conservación <i>in vitro</i>	23
Condiciones de cultivo	24
Etapas de establecimiento <i>in vitro</i>	25
Capítulo III: Metodología	26
Fase de campo.....	26
Recolección y pretratamiento del material vegetal	26
Fase de Laboratorio	28
Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.....	28
Etapa de desinfección de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	28
Etapa de introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.....	28
Establecimiento <i>in vitro</i> de yemas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.....	29
Etapa de desinfección de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed	29
Etapa de introducción de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.....	30
Análisis estadístico	31
Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.....	31
Etapa de desinfección de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	31
Unidad experimental.....	31

	10
Tratamientos.....	31
Diseño experimental.	31
Etapa de introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	32
Unidad experimental.	32
Tratamientos.....	32
Diseño experimental.	32
Establecimiento in vitro de yemas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.	32
Etapa de desinfección de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.....	32
Unidad experimental.....	32
Tratamientos.....	32
Diseño experimental.	32
Etapa de introducción de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	33
Unidad experimental.	33
Tratamientos.....	33
Diseño experimental.	33
Capítulo IV: Resultados	34
Desinfección de semillas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.	34
Introducción de semillas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.	37
Desinfección de yemas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.....	41
Introducción de yemas de <i>Diplostephium rupestre</i> (Kunth) Weed.....	44
Capítulo V: Discusión.....	49
Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	49
Establecimiento <i>in vitro</i> de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	51

Capítulo VI: Conclusiones	55
Capítulo VII: Recomendaciones	57
Capítulo VIII: Bibliografía	58
Capítulo IX: Apéndices.....	66

Índice de Tablas

Tabla 1 Diseño experimental del protocolo de desinfección.....	28
Tabla 2 Medio de cultivo usado para el establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de la familia Asteraceae.....	29
Tabla 3 Concentración de hipoclorito de sodio empleado en el tratamiento de desinfección de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	30
Tabla 4 Antioxidantes utilizados para el protocolo de introducción de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	31
Tabla 5 Porcentaje de contaminación, viabilidad y oxidación obtenidos en el tratamiento de desinfección de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	34
Tabla 6 ANOVA realizado para los tratamientos de desinfección utilizados.....	36
Tabla 7 Porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	38
Tabla 8 Porcentajes de contaminación y oxidación obtenidos en los tratamientos de desinfección de yemas apicales y laterales de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	41
Tabla 9 ANOVA realizado para los tratamientos de desinfección utilizados.....	43
Tabla 10 Porcentaje de brotes obtenidos en los tratamientos de introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	45

Índice de Figuras

Figura 1 Ilustración fotográfica de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed. y el material vegetal utilizado	26
Figura 2 Ubicación geográfica del área de muestreo.....	27
Figura 3 Resultados obtenidos en el protocolo de desinfección de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	35
Figura 4 Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de desinfección de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	37
Figura 5 Formación de brotes a partir de la introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	39
Figura 6 Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de introducción de semillas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	40
Figura 7 Yemas apicales y laterales de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed. con evidencia de contaminación y oxidación	42
Figura 8 Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de desinfección de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	44
Figura 9 Brote obtenido a partir de yemas apicales de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	46
Figura 10 Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de introducción de yemas de <i>D. rupestre</i> (Kunth) Weed.	47

Resumen

Los páramos ecuatorianos son ecosistemas de alta montaña cuya biodiversidad es fundamental para la gestión de los recursos hídricos de la región. Sin embargo, las actividades antropogénicas y el cambio climático han provocado un deterioro del mismo. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador. La especie seleccionada para el establecimiento *in vitro* debido a su importante rol ecológico para proyectos de reforestación, conservación y uso sostenible del suelo fue *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed. Los ensayos para el establecimiento *in vitro* de esta especie se realizaron a partir de semillas y yemas apicales o laterales. En la etapa de desinfección de las semillas se determinó que la concentración óptima de NaClO para eliminar los agentes contaminantes es del 3% durante 5 minutos. La obtención de brotes viables en la etapa de introducción se obtuvo en medio MS suplementado con 1mg/L de AG₃ a los 30 días posteriores a la siembra con una efectividad del 93%. Por otra parte, la desinfección de yemas apicales o laterales tuvo el menor porcentaje de contaminación 47,5%, a una concentración del 3% de NaClO durante 5 minutos. El mejor control de oxidación en el establecimiento *in vitro* de yemas, se observó en el medio de cultivo suplementado con 3mg/L de carbón activado. De tal manera, los protocolos de desinfección e introducción desarrollados en este estudio permiten tener una perspectiva para una reintroducción exitosa de material vegetal de *D. rupestre* (Kunth) Weed. en hábitats silvestres con objetivos de reforestación.

Palabras clave: páramos, cultivo *in vitro*, *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., protocolos de desinfección e introducción, reforestación.

Abstract

Ecuadorian paramos are high mountain ecosystems whose biodiversity is fundamental for the region's water resources. However, anthropogenic activities and climate change have caused their deterioration. For this reason, the objective of this study is to establish a protocol for the disinfection and introduction of a species of the Asteraceae family in the Andean forests of Ecuador. *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., was selected due to its important ecological role in reforestation and restoration projects, same as conservation and sustainable soil use. The trials for the *in vitro* establishment of this species were carried out from seeds and apical or lateral buds. In the seed disinfection stage, the optimum concentration of NaClO to eliminate contaminating agents was determined to be 3% for 5 minutes. Viable sprouts were obtained at the introduction stage in MS medium supplemented with 1 mg/L AG3 30 days after sowing, with an effectiveness of 93%. On the other hand, disinfection of apical or lateral buds had the lowest percentage of contamination 47.5%, at a concentration of 3% NaClO for 5 minutes. The best control of oxidation in the *in vitro* establishment of buds was observed in the culture medium supplemented with 3 mg/L of activated charcoal. In conclusion, the disinfection and introduction protocols developed in this study provide a baseline for a successful reintroduction of plant material of *D. rupestre* (Kunth) Weed. into wild habitats for reforestation and restoration purposes.

Key words: paramo, *in vitro* culture, *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., disinfection and introduction protocols, reforestation.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Los Bosques Andinos del Ecuador son ecosistemas ubicados en las faldas de las cordilleras andinas, su altitud varía entre los 700 a 4000 m.s.n.m (Busmann, 2005). El notable rango altitudinal de este ecosistema lo convierte en una zona biodiversa y exuberante en relación a la flora y fauna endémica (García, 2005).

La riqueza natural existente en estos ecosistemas tiene relación directa a su valor económico y ecológico como recurso hídrico. La producción de agua dulce en las cuencas de los Bosques Andinos, comprende el 67% de la producción total de agua dulce del país (Celleri & Feyen, 2009). El elevado porcentaje de producción de agua dulce está relacionado a las propiedades físico-químicas del suelo y la neblina característica de este lugar (Homeier & Leuschner, 2021).

Sin embargo, son ecosistemas frágiles, por lo que, actividades como la deforestación, sobreexplotación de sus recursos y la minería, provoca la degradación de sus componentes (Aguirre-Mendoza, Loja, Solano, & Aguirre, 2015). Inclusive, muchas veces son ecosistemas menospreciados y con poca información bibliográfica, minimizando su relevancia ecológica, biológica y económica (García, 2005).

La degradación continua de este ecosistema por actividades humanas requiere de técnicas de conservación y restauración para su recuperación y perpetuación (Grigoriadou, Sarropoulou, Krigas, Maloupa, & Tsoktouridis, 2020). La germinación convencional a partir de semillas y posterior introducción de especies con fines de recuperación es una técnica alternativa para la conservación de estas plantas, pero este proceso se dificulta por la baja tasa de germinación debido al bajo porcentaje de semillas con embrión maduro o la dificultad para romper la latencia (Pérez & Castañeda, 2017).

Por lo tanto, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar la tasa de germinación a partir de semillas es un método eficiente en este proceso. La posibilidad de

utilizar diferentes tejidos como las yemas, para una obtención rápida de nuevas plantas libre de enfermedades, es necesaria, para la propagación y multiplicación de plantas con relevancia ecológica (Nowakowska, Pavlović, Nowicki, Boggess, & Trigiano, 2020). El uso de esta técnica puede ser empleado con éxito en la restauración o conservación de la taxonomía vegetal (Souza, Pinto, Bertolucci, & Correa, 2007).

Por los motivos presentados anteriormente, el presente estudio tiene como propósito, el establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae presentes en los Bosques Andinos del Ecuador.

Justificación del problema

Los recursos hídricos provenientes de los Bosques Andinos representan un potencial recurso económico y ecológico en la zona de los Andes. Los Bosques Andinos del Ecuador comprenden el 34% del total del área del país (Celleri & Feyen, 2009). Los recursos naturales de estos bosques son únicos ya que proveen la mayor cantidad de agua dulce para el desarrollo sostenible de la sociedad (Homeier & Leuschner, 2021). Sin embargo, han sido poco estudiados, por lo que la información sobre este ecosistema y las especies que lo habitan es escasa (Bonnesoeur, *et al.*, 2019).

Los proyectos de investigación y conservación de material genético de las especies que se encuentran en estos ecosistemas se han convertido en una necesidad, ya que tener una base de datos sobre esta información permitirá solventar problemas a futuro (Posada, 2014). La conservación *ex situ* efectiva a partir de técnicas de cultivo *in vitro* de especies en peligro de extinción o con interés ecológico es importante para la preservación del material genético ya que ofrece una alternativa para la restauración de los ecosistemas de páramo (Grigoriadou, Sarropoulou, Krigas, Maloupa, & Tsoktouridis, 2020).

El estudio se realizará sobre la familia Asteraceae por ser la mayor familia, a nivel mundial, de plantas vasculares con un total de 25 037 especies. En el Ecuador existen 995 especies distribuidas en la región andina, por lo que es considerada una familia

representativa (Panero & Crozier, 2016). La familia Asteraceae es importante, debido a que ha sido usada como modelo para estimar la riqueza total de la flora y fauna y como indicadora en la identificación de áreas con prioridad de conservación (Villaseñor & Ortiz, 2012). Además, esta familia es relevante por sus usos en la agricultura, apicultura, industria farmacéutica y maderera. Sin embargo, a pesar de su predominancia en los Bosques Andinos del Ecuador, la familia Asteraceae está escasamente estudiada (Oliveira Amorim & Pousada Bautista, 2016).

La presente investigación se enfocará en *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., perteneciente a la familia Asteraceae, debido a que posee aplicaciones en la recuperación de suelos y ecosistemas que han sufrido erosión severa (Ávila, Baquero, Viña, & Murillo, 2006). Adicionalmente esta especie se caracteriza por limitar el crecimiento de especies invasoras introducidas por actividades humanas como la agricultura, manteniendo de esta manera la flora nativa de los páramos del Ecuador (Pérez & Castañeda, 2017). La conservación de especies poco estudiadas como el caso de *D. rupestre* (Kunth) Weed. podría aportar inclusive a futuros enfoques biotecnológicos debido a las aplicaciones que posee.

El cultivo de células y tejidos vegetales es una alternativa para superar las limitaciones ambientales y obtener plantas con interés ecológico o de conservación, sin embargo, la introducción *in vitro* de cada especie es única, por lo que, se requiere de una metodología específica (Laguna, Cueva, Tamariz, & Olivera, 2019). Por lo tanto, el desarrollo de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae es importante para la obtención de brotes y producción de plantas, para futuras aplicaciones de restauración de ecosistemas y reinserción de especies (Khan, Shah, & Ali, 2021).

Objetivos

Objetivo general

Establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Objetivos específicos

- Determinar el método de desinfección de semillas de especies de la familia Asteraceae.
- Estandarizar el método de desinfección en yemas apicales/laterales de especies de la familia Asteraceae.
- Determinar los mejores medios nutritivos y hormonales para el establecimiento e inducción de brotes de especies de la familia Asteraceae.

Hipótesis

El protocolo de desinfección e introducción permite el establecimiento *in vitro* de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Capítulo II: Marco Teórico

Páramos de la región Andina

Lm;n Características generales

El páramo es un ecosistema que se encuentra ubicado entre los 3 200 y 4 700 m.s.n.m, el cual se caracteriza por recibir altas precipitaciones de lluvia o neblina, tener una humedad relativa del 60% y ser uno de los mayores puntos de biodiversidad del mundo. Los páramos poseen una gran biodiversidad con respecto a flora y fauna endémica de la zona de los andes, con un 6,7 y 5,7% respectivamente (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). El páramo se encuentra distribuido en las tierras altas de Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador. En el Ecuador esta área comprende el 7% del territorio total (Buytaert, *et al.*, 2006).

Los páramos también son fuentes de recursos naturales y de relevancia ecológica ambiental. La capacidad de los suelos de captar, regular y mantener el agua, para su posterior distribución a los valles interandinos y ciudades aledañas, lo convierte en el principal gestor de los recursos hídricos a los países de Sudamérica (Buytaert, *et al.*, 2006).

La producción de agua dulce de esta zona, comprende el 67% del total que se almacenará en ríos y lagos para su posterior uso (Celleri & Feyen, 2009). La abundante producción de agua se debe a la propiedades físico-químicas del suelo, rol ecológico de ciertas especies vegetales, tasa de evapotranspiración y estacionalidad de la precipitación (Homeier & Leuschner, 2021).

Situación actual de los páramos

Actualmente, el páramo se encuentra amenazado ante el deterioro de su suelo debido al aumento de actividades humanas. La conversión de estos ecosistemas naturales en tierras agrícolas o el uso desmedido de sus recursos naturales alteran el equilibrio ecológico, dañando los suelos y alterando los ciclos naturales como la producción de agua dulce (Meyfroidt & Lambin, 2011). Otra actividad que altera este ecosistema, es el cultivo de

pinos que reduce en aproximadamente un 50% la producción de agua dulce (Buytaert, Iñiguez, & De Bievre, 2007).

Los páramos se catalogan como sitios de alta biodiversidad, albergan aproximadamente 3 400 especies vegetales vasculares y existe un alto nivel de endemismo. Sin embargo, la información científica sobre estos es escasa dada la dificultad de establecer colaboraciones científicas (Hofstede, Segarra, & Mena, 2003). El proyecto BIO-GEEC es una de las principales colaboraciones para el estudio y preservación de especies de ecosistemas altoandinos.

Familia Asteraceae

Características generales

La familia Asteraceae es la mayor familia de plantas vasculares a nivel mundial, está conformada por más de 1 600 géneros y 25 037 especies. La diversidad de esta familia es usada como modelo para identificar las áreas prioritarias de conservación e identificar la riqueza total de plantas de la zona (Villaseñor & Ortiz, 2012).

La distribución de especies de esta familia es cosmopolita, están presentes en todo el mundo. Generalmente se encuentran en zonas templadas, cálidas y semiáridas de los trópicos y subtrópicos (Nikolić & Stevović, 2015), aunque la abundancia de estas especies se concentra en los Andes de Sudamérica (Rivero-Guerra, 2020).

La morfología de la familia Asteraceae es variada, algunas especies son árboles con alturas mayores a 30m, sin embargo, la mayoría de estas especies son arbustos o hierbas perennes (Rolnik & Olas, 2021). El tamaño de las hojas varía entre grandes y pequeñas dependiendo de la especie y están cubiertas por tricomas. En esta familia las inflorescencias toman el nombre de capítulos. Los capítulos son la combinación de múltiples flores en una sola estructura (Zhang & Elomaa, 2021).

Se ha descrito que esta familia presenta múltiples aplicaciones. En la agricultura presenta propiedades insecticidas. En la apicultura son principalmente donadores de polen.

En la farmacéutica y alimentaria son importantes debido a su producción de metabolitos secundarios. En la industria maderera su importancia radica en los tallos leñosos que poseen (Oliveira Amorim & Pousada Bautista, 2016).

Situación actual en el Ecuador

El centro de diversidad de esta especie se encuentra en los Andes, por lo que esta familia se encuentra distribuida en todo el territorio ecuatoriano (León-Yáñez, *et al.*, 2019). Actualmente en el Ecuador se han identificado 217 géneros y 995 especies. Se conoce que, del total de especies presentes, 360 son endémicas. La tasa de especiación de la familia Asteraceae en el Ecuador representa el segundo lugar de especies endémicas (Aranguren, Morillo, & Fariñas, 2008).

Lamentablemente, la poca investigación realizada en esta familia, ha dificultado su representación en los herbarios del Ecuador. El libro rojo de plantas endémicas reporta que el 60% de especies endémicas de asteráceas del Ecuador no han sido registradas en el SNAP (León-Yáñez, *et al.*, 2019).

Género Diplostephium

El género *Diplostephium* consta de 111 especies, de las cuales se han registrado 21 para el Ecuador (Vargas & Madriñán, 2006). Las especies de esta familia se caracterizan por tener un tallo leñoso, hojas alternas cubiertas por tricomas y capítulos con flores blancas y moradas. *Diplostephium* crece en el límite superior del bosque altoandino entre los 3 000 a 4 500 m.s.n.m. (Ortiz, Vargas, & Simpson, 2017).

Una especie nativa arbustiva del Ecuador cuya presencia es importante para proyectos de reforestación, conservación y uso sostenible del suelo es *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed. o mejor conocido como algodoncillo de páramo (Romoleroux, Cárate-Tandalla, Erler, & Navarrete, 2019). Esta especie crece en los bosques de *Polylepis* a una altura de 3 800 m.s.n.m. y es una de las especies más utilizadas en planes de

reforestación sobre todo en la recuperación de suelos y ecosistemas que han sufrido erosión severa (Ávila, Baquero, Viña, & Murillo, 2006).

Iniciativas de conservación de especies vegetales

El deterioro de los ecosistemas de páramo por actividades antropogénicas ha provocado una alarmante extinción de especies vegetales endémicas (Bussmann, 2005). La conservación *ex situ* es una alternativa para preservar la biodiversidad de este ecosistema. Esta técnica tiene la ventaja de proporcionar un suministro oportuno y continuo de material vegetal para la reforestación. Las técnicas más usadas son los jardines botánicos, herbarios y bancos de germoplasma (Abeli, *et al.*, 2020).

Los jardines botánicos son una colección de plantas vivas en peligro de extinción recolectadas de la naturaleza. La conservación de plantas en estos sitios permite tener una base de datos con información actualizada y proporcionan un recurso filogenético accesible para emplearlo en técnicas de reforestación (Perez, *et al.*, 2018).

Los herbarios son una colección de plantas completas previamente herborizadas, cuyo objetivo es tener una representación sistematizada de una especie en una región determinada. La investigación que se realiza en estos sitios relaciona las especies vegetales con aspectos botánicos, ecológicos y económicos (Marsico, *et al.*, 2020).

Los bancos de germoplasma son lugares con condiciones controladas de laboratorio para preservar material vegetal como semillas, tejidos o plantas *in vitro*. El objetivo de estos bancos es la conservación y multiplicación de especies en peligro de extinción. La capacidad de estos lugares de conservar una gran cantidad de especies vegetales, permite la investigación con fines de mejora genética o recuperación de ecosistemas (Guzzon, Gianella, Velazquez, Sanchez, & Costich, 2021).

Técnica de conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* es la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para evitar la pérdida de especies en peligro de extinción y mantener su diversidad genética. La

conservación de estos recursos genéticos se realiza en condiciones asépticas de laboratorio en espacios reducidos. El almacenamiento puede ser a partir de semillas o tejidos vegetales dependiendo del hábito de crecimiento *in situ* de la especie de interés (Abeli, *et al.*, 2020).

La conservación *in vitro* se divide en almacenamiento a corto y largo plazo (García, Feria, & Acosta, 2007). El almacenamiento a corto plazo utiliza técnicas para retrasar el crecimiento de los explantes y aumentar su permanencia *in vitro* hasta 12 meses. Las condiciones de cultivo para el almacenamiento a corto plazo son reducir la temperatura de los cuartos de incubación y modificar el medio de cultivo. En cambio, el almacenamiento a largo plazo usa la técnica de criopreservación (Sánchez & Jiménez, 2010).

Condiciones de cultivo

La temperatura es uno de los principales factores para el almacenamiento a corto plazo. La disminución de la temperatura de cultivo reduce la actividad metabólica del explante y como consecuencia disminuye su crecimiento. La variación de este parámetro depende de los requerimientos de cada especie, ya que temperaturas muy bajas provoca daños fisiológicos y necrosamiento del tejido vegetal (Sánchez & Jiménez, 2010).

El medio de cultivo es un factor importante que influye en el tiempo de conservación del material vegetal. La disminución de las sales minerales retrasa el desarrollo de la especie y disminuye los intervalos de subcultivo. La optimización de estos parámetros mejora la técnica de conservación *in vitro*, ya que se disminuye el estrés de la planta y aumenta su tiempo de conservación a un máximo de 6 meses (Bonilla, 2015).

Los reguladores de crecimiento son otro factor para el almacenamiento a corto plazo. Estos reguladores intervienen en la obtención o protección de los explantes. Las giberelinas, por ejemplo, se usan para estimular la germinación ya que rompen la latencia de las semillas. El ácido abscísico, en cambio, tiene la función de inhibir el crecimiento y proteger los explantes (Bonilla, 2015).

Etapas de establecimiento in vitro

El proceso de conservación *in vitro* inicia por la selección de un tejido vegetal a partir de una planta madre sana y vigorosa. El tejido vegetal puede ser semillas, hojas, yemas apicales o laterales, raíz y flores. La siguiente fase es la desinfección del material vegetal, en esta etapa se usa una combinación de bactericidas y fungicidas. El objetivo es la eliminación de los contaminantes del explante con un daño mínimo de las células vegetales (Leva & Rinaldi, 2012).

A continuación, se procede con la etapa de introducción del material vegetal en un medio de cultivo nutritivo. La selección del medio de cultivo es importante ya que permite la adaptación del tejido y su desarrollo en un ambiente *in vitro* (Bonilla, 2015). En esta etapa el crecimiento de los explantes es influenciado por la concentración de sales minerales, nutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento. La variación de concentración de estos parámetros prolonga el tiempo de permanencia del explante en el medio de cultivo y posibilita la conservación sin subcultivos. La disminución de los subcultivos reduce los costos de conservación del material vegetal y evita la variación somaclonal por lo que permite una conservación del material genético (García, Fera, & Acosta, 2007).

Capítulo III: Metodología

Fase de campo

Recolección y pretratamiento del material vegetal

El material vegetal utilizado fueron las semillas y yemas apicales o laterales de la especie *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed. (Figura 1). El material vegetal se recolectó en el Parque Nacional Cayambe-Coca, en la zona denominada La Laguna o Plot 2 (Figura 2), cuyas coordenadas son 17M 817994 9968088.

Figura 1

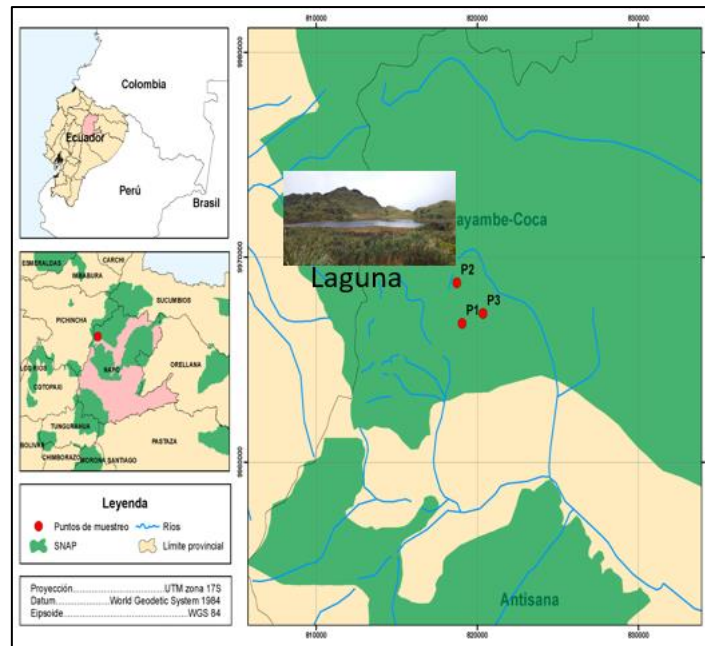
Ilustración fotográfica de D. rupestre (Kunth) Weed. y el material vegetal utilizado



Nota. El gráfico muestra la especie *D. rupestre* (Kunth) Weed. y el material vegetal usado en este estudio: (A) Especie *D. rupestre* (Kunth) Weed., (B) Yemas apicales y laterales de *D. rupestre* (Kunth) Weed. y (C) Semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. en estado maduro observadas en el estereomicroscopio a 1x.

Figura 2

Ubicación geográfica del área de muestreo



Nota. El grafico representa el área de muestreo y ubicación del Parque Nacional Cayambe-Coca (Pazmiño, 2021).

Las semillas se recolectaron en fundas de papel y se trasladaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. En el laboratorio, se separó las semillas del capítulo y se secaron a temperatura ambiente durante 3 a 5 días en papel toalla. Las semillas secas se almacenaron en cajas Petri a 5°C y oscuridad (Khan, Shah, & Ali, 2021).

Las yemas apicales o laterales se recolectaron en fundas ziploc, se almacenaron en una hielera y se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE para su introducción.

Fase de Laboratorio

Establecimiento in vitro de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed.

Etapa de desinfección de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. En el proceso de desinfección se recolectaron semillas en estado maduro, se dividieron en 3 microtubos con capacidad de 2mL y se colocaron 20 semillas en cada tubo. El protocolo de desinfección consistió en colocar una solución de detergente al 2% por 10 minutos, se mantuvo en constante agitación y se realizó el enjuague con agua destilada. Luego se puso alcohol al 70% por 1 minuto y se agitó constantemente. El lavado se realizó con agua destilada. Posteriormente se colocó hipoclorito de sodio y dos gotas de Tween 20 como se indica en la Tabla 1. Finalmente se enjuagó con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar (Pérez & Castañeda, 2017).

Tabla 1

Diseño experimental del protocolo de desinfección

Tratamiento	Concentración de hipoclorito de sodio (%v/v)	Tiempo (minutos)
T1	0	0
T2	1	
T3	3	5
T4	5	

Nota. La tabla muestra los tratamientos de desinfección utilizados en el ensayo con sus respectivas concentraciones de hipoclorito de sodio y los diferentes tiempos de duración.

Etapa de introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. El establecimiento *in vitro* de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se lo realizó en una cámara de flujo laminar en medio Murashige & Skoog (MS) que contiene 7% de Agar-Agar, 3% de sacarosa, pH 5.8 y suplementado a diferentes concentraciones de Ácido giberélico

como se indica en la Tabla 2 (Khan, Shah, & Ali, 2021). La siembra se realizó en tubos de ensayo con 5mL de medio de cultivo cada uno.

Tabla 2

Medio de cultivo usado para el establecimiento in vitro de semillas de la familia Asteraceae

Componentes	TI1	TI2	TI3
MS (mg/L)	4,43	4,43	4,43
Sacarosa	3%	3%	3%
Agar-Agar (g/L)	7	7	7
Ácido giberélico (mg/L)	0	1	2
pH	5,8	5,8	5,8

Nota. La tabla muestra los tratamientos de establecimiento *in vitro* de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., composición del medio y la concentración de los reguladores de crecimiento.

Establecimiento in vitro de yemas de Diplostephium rupestre (Kunth) Weed.

Etapas de desinfección de yemas de D. rupestre (Kunth) Weed. Las muestras recolectadas de yemas apicales y laterales se lavaron con agua común para eliminar residuos de tierra. Las yemas se dividieron en 3 frascos de vidrio. En cada frasco se colocó solución de detergente al 2% durante 15 minutos y se agitó constantemente, finalizado el tiempo se enjuagó con agua común. Posteriormente, se añadió fungicida NATURAM al 4% y 3 gotas de Tween 20 durante 5 minutos. Se agitó constantemente y el lavado final se lo realizó con agua común. Posteriormente se colocó hipoclorito de sodio y dos gotas de Tween 20 como se indica en la Tabla 3. Finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar (Laguna, Cueva, Tamariz, & Olivera, 2019).

Tabla 3

Concentración de hipoclorito de sodio empleado en el tratamiento de desinfección de yemas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Concentración de hipoclorito de sodio (%v/v)	Tiempo (minutos)
TDY1	0	0
TDY2	1	
TDY3	2	5
TDY4	3	

Nota. La tabla muestra los tratamientos de desinfección utilizados en el ensayo con sus respectivas concentraciones de hipoclorito de sodio y los diferentes tiempos de duración.

Etapas de introducción de yemas de D. rupestre (Kunth) Weed. La introducción del material vegetal se realizó en frascos de vidrio con 30 mL de medio de cultivo que contenía: ½ de Sales MS, 3% de sacarosa, 0,3% de phytigel y pH de 5.7. El medio de cultivo se suplementó con diferentes antioxidantes para evitar el daño del explante después del tratamiento de desinfección como se indica en la Tabla 4. La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar. El crecimiento de los explantes se realizó con fotoperiodo de 16h luz y 8h de oscuridad a temperatura ambiente (Laguna, Cueva, Tamariz, & Olivera, 2019).

Tabla 4

Antioxidantes utilizados para el protocolo de introducción de yemas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Carbón activado (mg/L)	Ácido cítrico (mg/L)
TY1	3	0
TY2	0	100
TY3	3	100

Nota. La tabla muestra los antioxidantes utilizados para el protocolo de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

Análisis estadístico

Establecimiento in vitro de semillas de Diplostephium rupestre (Kunth) Weed.

Etapas de desinfección de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Unidad experimental. La unidad experimental fue una semilla colocada en un tubo de ensayo con 5mL de medio de cultivo MS.

Tratamientos. Se realizaron 3 tratamientos como se indica en la Tabla 1 y un control negativo.

Diseño experimental. Se aplicó un Diseño experimental completamente al azar (DCA), en el que se evaluó la concentración de hipoclorito de sodio en un tiempo fijo. Se utilizó un total de 150 semillas distribuidas en 45 semillas para cada tratamiento y 15 para el control. Para el análisis estadístico se realizaron 3 repeticiones con 15 semillas cada uno. Se observó el porcentaje de contaminación por hongo y bacteria, viabilidad de las semillas y porcentaje de oxidación. La observación se realizó a los 7 y 15 días posteriores a la siembra.

Etapa de introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

Unidad experimental. La unidad experimental fue una semilla colocada en un tubo de ensayo con 5mL de medio de cultivo.

Tratamientos. Se realizaron 3 tratamientos como se indica en la Tabla 2 y un control negativo.

Diseño experimental. Se aplicó un Diseño experimental completamente al azar (DCA), en el que se evaluó la concentración de ácido giberélico. Se utilizó un total de 100 semillas distribuidas en 30 semillas para cada tratamiento y 10 para el control. Para el análisis estadístico se realizaron 3 repeticiones con 10 semillas cada uno. Se observó la formación de radícula, presencia de tallo y número de hojas. La observación se realizó cada siete días durante un mes posterior a la siembra.

Establecimiento *in vitro* de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed.**Etapa de desinfección de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.**

Unidad experimental. La unidad experimental fue un frasco de vidrio con 30mL de medio de cultivo MS con cuatro yemas sembradas.

Tratamientos. Se realizaron 3 tratamientos como se indica en la Tabla 3 y un control negativo.

Diseño experimental. Se aplicó un Diseño experimental completamente al azar (DCA), en el que se evaluó la concentración de hipoclorito de sodio en un tiempo fijo. Se utilizó un total de 240 yemas distribuidas en 80 yemas para cada tratamiento y 20 para el control. Para el análisis estadístico se realizaron 4 repeticiones con 60 yemas cada uno. Se observó el porcentaje de contaminación por hongo y bacteria, viabilidad de las semillas y porcentaje de oxidación. La observación se realizó a los 7 y 15 días posteriores a la siembra.

Etapas de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

Unidad experimental. La unidad experimental fue un frasco de vidrio con 30mL de medio de cultivo MS con cuatro yemas sembradas.

Tratamientos. Se realizaron 3 tratamientos como se indica en la Tabla 4 y un control negativo.

Diseño experimental. Se aplicó un Diseño experimental completamente al azar (DCA), en el que se evaluó la efectividad de diferentes antioxidantes. Se utilizó un total de 120 yemas distribuidas en 20 yemas para cada tratamiento y 20 para el control. Para el análisis estadístico se realizaron 2 repeticiones con 60 yemas cada uno. Se observó la formación brotes. La observación se realizó a los 7 y 15 días posteriores a la siembra.

Capítulo IV: Resultados

Desinfección de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed.

En el establecimiento del protocolo de desinfección es importante determinar la contaminación, la viabilidad y la oxidación que presentan las semillas en relación a diferentes tratamientos de desinfección, para determinar un protocolo eficiente que permita la germinación de las semillas.

En el ensayo de desinfección de las semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se evaluó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% (TD1), 3% (TD2) y 5% (TD3). En la Tabla 5 se presentan los resultados del porcentaje de contaminación, viabilidad y oxidación obtenidos en los diferentes tratamientos de desinfección de estas semillas.

Tabla 5

Porcentaje de contaminación, viabilidad y oxidación obtenidos en el tratamiento de desinfección de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Contaminación fúngica (%)	Oxidación (%)	Viabilidad (%)
TD1	33,33	0,00	66,67
TD2	6,60	0,00	93,40
TD3	4,50	48,89	44,00

Nota. La tabla muestra el porcentaje de contaminación fúngica, oxidación y viabilidad de los tratamientos de desinfección a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

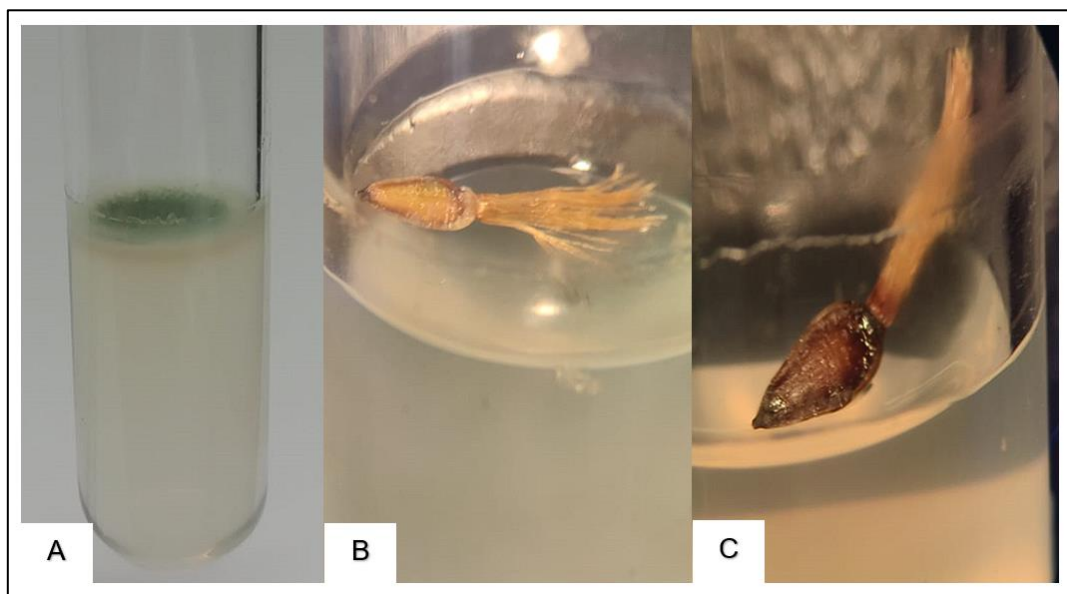
Tratamiento TD1 (NaClO al 1%), tratamiento TD2 (NaClO al 3%) y tratamiento TD3 (NaClO al 5%).

El tratamiento TD1 con NaClO al 1% (v/v), presentó un porcentaje de contaminación fúngica del 33,33%. Los tratamientos TD2 y TD3 con NaClO al 3% (v/v) y 5% (v/v) tuvieron un porcentaje de contaminación fúngica del 6,60% y 4,50% respectivamente.

En la figura 3 se observan las semillas luego de la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección. En esta figura se observan semillas contaminadas por hongos, semillas viables y semillas oxidadas. La figura 3A muestra la contaminación fúngica luego de la aplicación del tratamiento con 1% de NaClO. En la figura 3B, semillas libres de contaminación y sin tejido necrosado luego de la aplicación del tratamiento con 3% de NaClO. Finalmente, en la figura 3C se observa semillas con tejido necrosado, con aquenios que presentaron una coloración café oscura o negra, mostrando oxidación del tejido.

Figura 3

Resultados obtenidos en el protocolo de desinfección de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra los resultados obtenidos en el protocolo de desinfección de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.: (A) Contaminación fúngica presentada en el tratamiento con 1% de NaClO, (B) Semilla libre de contaminación y sin tejido necrosado en el tratamiento con 3% de NaClO (C) Semilla de *D. rupestre* (Kunth) Weed. con presencia de tejido necrosado para el tratamiento de NaClO al 5%.

Los datos obtenidos para los diferentes tratamientos de desinfección (Tabla 5), se analizaron con la prueba Shapiro-Wilks para determinar si tienen una distribución normal. El

valor-p obtenido en este análisis fue de 0.0892, el cual es mayor al nivel de significancia ($\alpha=0,05$), por lo tanto, se concluye que estos datos siguen una distribución normal y se puede aplicar un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

Al realizar el ANOVA (Tabla 6) se obtuvo un valor-p de 0,0016, el cual es menor al nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Por lo tanto, existe evidencia estadística suficiente para considerar una diferencia significativa entre las medias de al menos dos tratamientos utilizados para la desinfección de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. El ANOVA realizado se puede observar más a detalle a continuación.

Tabla 6

ANOVA realizado para los tratamientos de desinfección utilizados

F.V	S.C	gl	CM	F	Valor-p
Modelo	0,15	2	0,08	22,83	0,0016
Tratamientos	0,15	2	0,08	22,83	0,0016
Error	0,02	6	3,4x10-3		
Total	0,17	8			

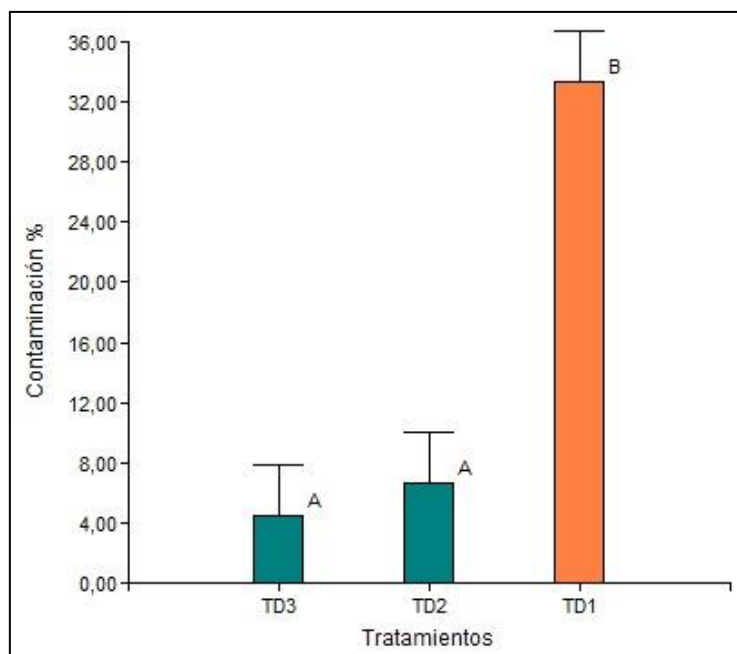
Nota. La tabla muestra el ANOVA realizado para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos utilizados.

Al observar la diferencia significativa entre las medias de los tratamientos, se realizó un test de Duncan para comprobar estos resultados. En la figura 4 se observa que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos con NaClO al 3% (TD2) y NaClO al 5% (TD3), por lo que se agrupan en un mismo conjunto representado por la letra A. Sin embargo, para establecer el protocolo de desinfección se utilizó el TD2 debido a que presentó un menor porcentaje de oxidación. El tratamiento con NaClO al 1% (TD1) se clasificó en un grupo diferente representado por la letra B. Estos resultados sugieren que el

TD2 es el mejor tratamiento para realizar el protocolo de desinfección y continuar con la etapa de introducción de las semillas.

Figura 4

Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de desinfección de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el porcentaje de contaminación fúngica para cada tratamiento. El valor-p para los tratamientos TD2 y TD3 fue de 0.6745 por lo tanto no existe diferencia significativa entre los tratamientos y se agrupan en un mismo conjunto representado por la letra A. El valor-p obtenido entre la comparación de los tratamientos TD1, TD2 y TD3 fue 0,0016 por lo que, el tratamiento TD1 tuvo diferencia significativa en comparación a los tratamientos TD2 y TD3.

Introducción de semillas de *Diplostegium rupestre* (Kunth) Weed.

En la introducción de semillas es importante determinar el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento óptimos que disminuyan el tiempo de latencia de la semilla y permitan la obtención de brotes viables. La selección del mejor tratamiento de introducción además permite mejorar los niveles de germinación de las semillas.

En este ensayo se evaluó la aplicación de ácido giberélico (AG₃) a diferentes concentraciones 0 mg/L (TI1), 1mg/L (TI2) y 2mg/L (TI3) en el medio de introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de germinación de cada uno de los tratamientos de aplicación de AG₃. Estos resultados se obtuvieron a partir de los datos del Anexo 4.

Tabla 7

Porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de introducción de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Porcentaje de Germinación (%)
TI1	20,00
TI2	93,00
TI3	78,00

Nota. La tabla muestra los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. a diferentes concentraciones de Ácido giberélico. Tratamiento TI1 (0 mg/L de AG₃), tratamiento TI2 (1mg/L de AG₃) y tratamiento TI3 (2mg/l de AG₃)

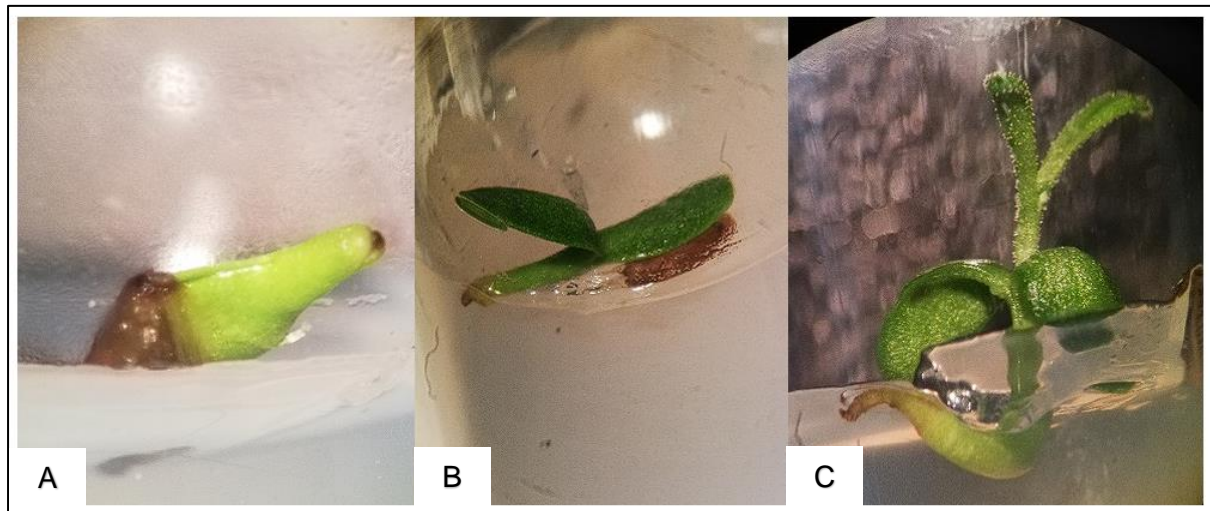
El porcentaje de germinación obtenido para los tratamientos TI2 y TI3 fue del 93 y 78% respectivamente, mientras que para el tratamiento TI1 fue del 20%. Estos resultados indican que concentraciones de 1 y 2 mg/L de AG₃ aumentan el nivel de germinación de las semillas.

La formación de radícula, hojas primarias y brotes a partir de la introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. es un indicativo del establecimiento de plantas *in vitro*. En la figura 5 se observa la formación de brotes a partir de la introducción de semillas en un periodo de cuatro semanas. El inicio de la germinación se observó a la segunda semana con la formación de radícula como se muestra en la figura 5A. En la figura 5B se

observa que a la tercera semana hay formación de hojas primarias. En la figura 5C se observa la formación de un brote conformado por radícula, hipocótilo y hojas primarias al final de la cuarta semana.

Figura 5

Formación de brotes a partir de la introducción de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el crecimiento de las semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. observado durante 4 semanas: (A) Formación de radícula a la segunda semana posterior a la siembra. (B) Formación de hojas primarias en la tercera semana posterior a la siembra. (C) Formación de un brote viable formado por radícula, hipocótilo, hojas primarias a la cuarta semana de observación.

Los datos obtenidos para los diferentes tratamientos de introducción (Tabla 7), se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks, para determinar si los datos siguen una distribución normal. El valor-p obtenido fue de 0.0549, el cual es mayor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), por lo que se realizó un ANOVA y test Duncan para determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

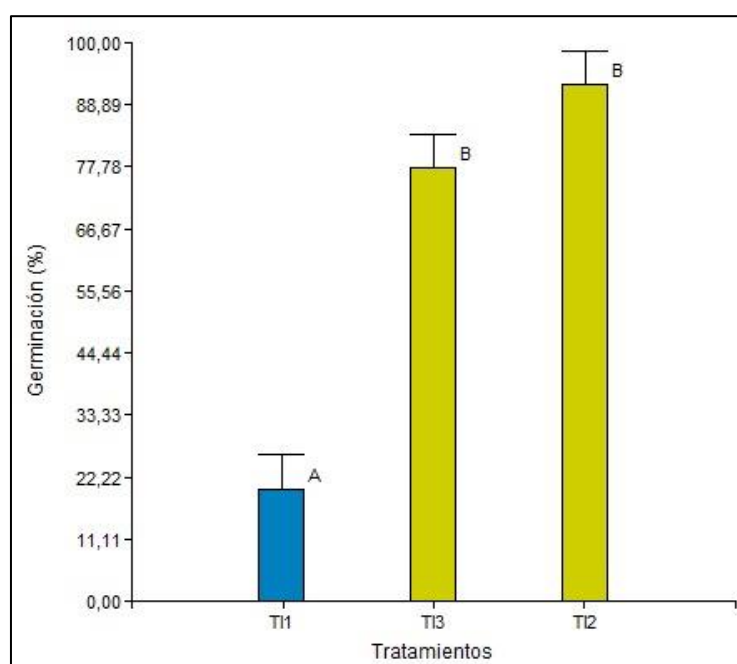
El valor-p obtenido en el ANOVA fue menor 0.0001 el cual es menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, existe evidencia estadística suficiente para considerar

una diferencia significativa entre las medias de al menos dos tratamientos utilizados para la introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

Al observar la diferencia significativa entre las medias de los tratamientos se realizó un test de Duncan para comprobar estos resultados, los cuales se muestran en la figura 6.

Figura 6

Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de introducción de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el porcentaje de germinación para cada tratamiento. El valor-p para los tratamientos T12 y T13 fue de 0,0608 por lo tanto no existe diferencia significativa entre los tratamientos y se agrupan en un mismo conjunto representado por la letra B. El valor-p obtenido entre la comparación de los tratamientos TD1, TD2 y TD3 fue <0,0001 por lo que, el tratamiento TD1 tuvo diferencia significativa en comparación a los tratamientos TD2 y TD3.

En esta figura se observa que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos T12 y T13, por lo que los valores se agrupan en un mismo conjunto representado por la letra B. El tratamiento T11 con 0 mg/L en cambio, se clasificó en un

grupo diferente representado por la letra A. Estos resultados sugieren que los tratamientos TI2 y TI3 con concentraciones de 1 y 2 mg/L son los mejores tratamientos para el establecimiento de un protocolo de introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. ya que aumentan los niveles de germinación.

Desinfección de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed.

Establecer un protocolo de desinfección es importante para evitar la contaminación, mantener la viabilidad y evitar la oxidación que presentan las yemas en relación a los diferentes tratamientos de desinfección empleados.

En el ensayo de desinfección de yemas apicales y laterales de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se evaluó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% (TDY1), 2% (TDY2) y 3% (TDY3). En la Tabla 8 se presentan los resultados del porcentaje de contaminación, obtenidos en los diferentes tratamientos de desinfección de estas yemas.

Tabla 8

Porcentajes de contaminación y oxidación obtenidos en los tratamientos de desinfección de yemas apicales y laterales de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Contaminación (%)	Oxidación (%)
TDY1	87,50	12,50
TDY2	77,50	22,50
TDY3	47,50	52,50

Nota. La tabla muestra el porcentaje de contaminación fúngica y oxidación de los tratamientos de desinfección a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

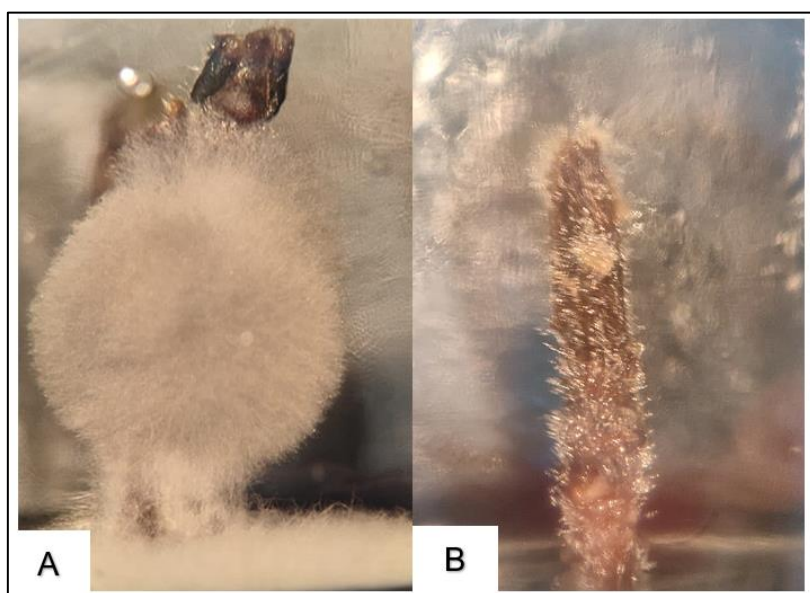
Tratamiento TDY1 (NaClO al 1%), tratamiento TDY2 (NaClO al 2%) y tratamiento TDY3 (NaClO al 3%).

El tratamiento TDY1 presentó un porcentaje de contaminación del 87,50%. Los tratamientos TDY2 y TDY3 también presentaron contaminación con un porcentaje de 77,50% y 47,50% respectivamente.

La contaminación y la oxidación de las yemas apicales y laterales a partir del tratamiento de desinfección se puede observar en la figura 7. La figura 7A muestra la contaminación fúngica presente en todos los tratamientos con NaClO. En la figura 7B, se observa los explantes sin contaminación, sin embargo, se observa la presencia de tejido necrosado debido al estrés del protocolo de desinfección utilizado y posiblemente por el cambio de temperatura y condiciones entre el páramo y laboratorio.

Figura 7

Yemas apicales y laterales de D. rupestre (Kunth) Weed. con evidencia de contaminación y oxidación



Nota. El gráfico muestra los resultados obtenidos en el protocolo de desinfección de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.: (A) Contaminación fúngica presentada en todos los tratamientos de NaClO. (B) Yema apical libre de contaminación y tejido necrosado en el tratamiento con 3% de NaClO.

Los datos obtenidos para los diferentes tratamientos de desinfección (Tabla 8), se analizaron con la prueba Shapiro-Wilks para determinar si tienen una distribución normal. El valor-p obtenido en este análisis fue de 0,4772, el cual es mayor al nivel de significancia ($\alpha=0,05$), por lo tanto, se concluye que estos datos siguen una distribución normal y se puede aplicar un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

Al realizar el ANOVA se obtuvo un valor-p de 0,0060, el cual es menor al nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Por lo tanto, existe evidencia estadística suficiente para considerar una diferencia significativa entre las medias de al menos dos tratamientos utilizados para la desinfección de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. El ANOVA realizado se puede observar más a detalle a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

ANOVA realizado para los tratamientos de desinfección utilizados

F.V	S.C	gl	CM	F	Valor-p
Modelo	2600	2	1300	9,55	0,0060
Tratamientos	2600	2	1300	9,55	0,0060
Error	1225	9	136,11		
Total	3825	11			

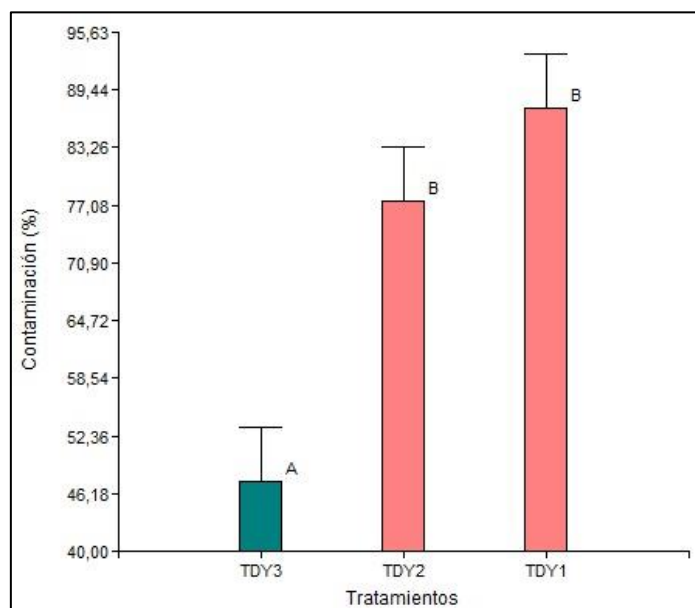
Nota. La tabla muestra el ANOVA realizado para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos utilizados.

Al observar una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos, se realizó un test de Duncan para verificar estos resultados. En la figura 8 se observa que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos TDY1 y TDY2. Sin embargo, estos tratamientos se descartaron ya que presentaron una contaminación por hongo mayor al 77%. El tratamiento con NaClO al 3% (TDY3) se clasificó en un grupo diferente

representado por la letra A. Estos resultados sugieren que el TDY3 es el mejor tratamiento para realizar el protocolo de desinfección y continuar con la etapa de introducción de yemas.

Figura 8

Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de desinfección de yemas de D. rupestre (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el porcentaje de contaminación fúngica para cada tratamiento. El valor-p para los tratamientos TDY1 y TDY2 fue de 0.3040 por lo tanto no existe diferencia significativa entre los tratamientos y se agrupan en un mismo conjunto representado por la letra B. El valor-p obtenido entre la comparación de los tratamientos TDY1, TDY2 y TDY3 fue 0,0060 por lo que, el tratamiento TDY3 tuvo diferencia significativa en comparación a los tratamientos TDY1 y TDY2.

Introducción de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed.

En la introducción de yemas es importante tomar en cuenta la selección de un medio de cultivo óptimo que evite la oxidación de los explantes causada por el estrés del cambio de las condiciones climáticas *in situ* de la planta.

En el ensayo de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed., para prevenir la oxidación de los explantes se evaluó la eficiencia de diferentes antioxidantes: Carbón activado 3mg/L (TY1), Ácido cítrico 100mg/L (TY2) y Carbón activado 3mg/L + Ácido cítrico 100mg/L (TY3). En la Tabla 10 se presenta el porcentaje de obtención de brotes obtenido para cada tratamiento de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. Los resultados empleados para este análisis se encuentran en el Anexo 10

Tabla 10

Porcentaje de brotes obtenidos en los tratamientos de introducción de semillas de D. rupestre (Kunth) Weed.

Tratamiento	Brotes (%)
TY1	17,50
TY2	2,50
TY3	7,50

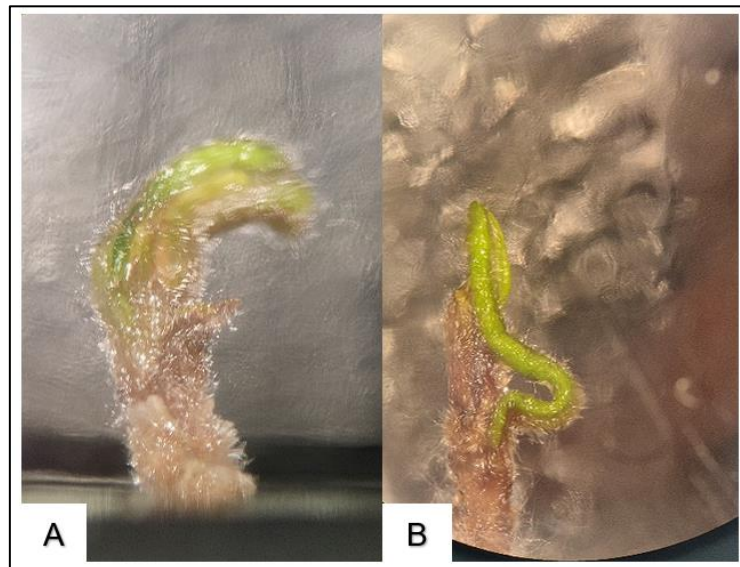
Nota. La tabla muestra el porcentaje de brotes obtenidos en los tratamientos de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. para cada uno de los antioxidantes utilizados. Tratamiento TY1 (Carbón activado 3mg/L), tratamiento TY2 (Ácido cítrico 100mg/L) y tratamiento TY3 (Carbón activado 3mg/L + Ácido cítrico 100mg/L).

En este análisis se observó que los brotes presentaron un porcentaje de crecimiento del 17,50% para el tratamiento TY1. En cambio, para el tratamiento TY2 y TY3 se obtuvo un bajo porcentaje de crecimiento de brotes del 2,50 y 7,50% respectivamente.

La formación de brotes a partir de la introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se puede observar en la figura 9. En esta figura se observa la formación de hipocótilo y hojas primarias. La figura 9A muestra la formación de hojas primarias después de una semana de crecimiento. La figura 9B representa el crecimiento del brote, en la cual se puede observar la formación de hipocótilo y el alargamiento de las hojas primarias.

Figura 9

Brote obtenido a partir de yemas apicales de *D. rupestre* (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el crecimiento del brote obtenido a partir de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. observado durante dos semanas: (A) Formación de hojas primarias en la primera semana posterior a la siembra y (B) Elongación de hojas primarias y formación de hipocótilo en la segunda semana posterior a la siembra.

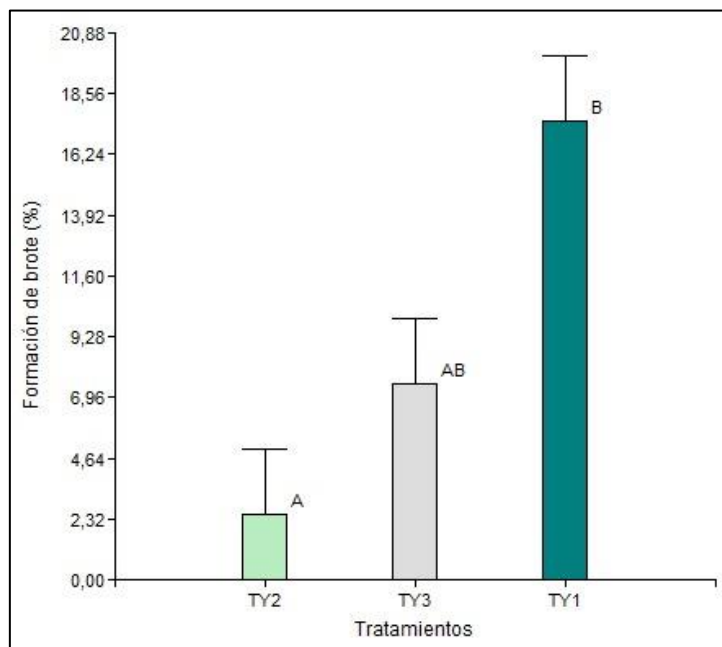
Los datos obtenidos para los diferentes tratamientos de introducción (Tabla 10), se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks, para determinar si los datos siguen una distribución normal. El valor-p obtenido fue de 0.7643, el cual es mayor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), por lo que se realizó un ANOVA y test Duncan para determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

El valor-p obtenido en el ANOVA fue de 0.05115 el cual es igual al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, existe incertidumbre para considerar una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos utilizados para la introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

Al observar la similitud entre el valor-p y el nivel de significancia, se realizó un test de Duncan para identificar la eficiencia de los tratamientos utilizados (Figura 10).

Figura 10

Test Duncan para los tratamientos utilizados en el protocolo de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.



Nota. El gráfico muestra el porcentaje de germinación para cada tratamiento. El valor-p para los tratamientos TY1 y TY2 fue de 0,0487 por lo tanto existe diferencia significativa entre los tratamientos y se agrupan en conjuntos diferentes representados por las letras A y B respectivamente. El valor-p obtenido entre la comparación de los tratamientos TY1, TY2 y TY3 fue 0.0513 por lo que, el tratamiento TY3 no tiene diferencia significativa en comparación a los tratamientos TY2 y TY3.

En esta figura se observa que existe una diferencia significativa entre los tratamientos TY1 y TY2, por lo que se agrupan en conjuntos diferentes representados por las letras A y B respectivamente. El tratamiento TY3 demostró no tener diferencia significativa en relación a los tratamientos TY1 y TY2. Estos resultados sugieren que el tratamiento con carbón activado como antioxidante (TY1) es una alternativa eficiente para el establecimiento de un protocolo de introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. y

pueden disminuir el nivel de oxidación provocado por el protocolo de desinfección y la recolección del material vegetal.

Capítulo V: Discusión

Los páramos ecuatorianos son ecosistemas de alta montaña cuya biodiversidad es fundamental para la gestión de los recursos hídricos de la región. Sin embargo, las actividades antropogénicas y el cambio climático han provocado un deterioro del mismo (Avellaneda-Torres, León, & Torres, 2018). La degradación continua de la biodiversidad de este ecosistema convierte en imperativo el desarrollo de protocolos de establecimiento *in vitro* de especies amenazadas o con interés ecológico para actividades de reforestación o conservación *ex situ* (Bunn, Turner, & Dixon, 2011).

El estudio actual se enfocó en el establecimiento de un protocolo de desinfección de *D. rupestre* (Kunth) Weed. a partir de semillas y yemas apicales o laterales. La selección de esta especie se enfocó en su rol ecológico para actividades de reforestación y uso sostenible del suelo, ya que es usada en la recuperación de suelos que han sufrido erosión severa (Romoleroux, Cárate-Tandalla, Eler, & Navarrete, 2019). El rol ecológico de esta especie está relacionada a su estrategia de supervivencia ecológica, ya que tiene la capacidad de producir un gran número de semillas (Supervivencia tipo R) con embriones viables (Supervivencia tipo K) (Pazmiño, 2021).

Establecimiento *in vitro* de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

El establecimiento *in vitro* de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. comienza por la estandarización de un protocolo de desinfección. La estandarización de este protocolo es importante ya que elimina los agentes contaminantes que pueden dañar el material vegetal y evitan su establecimiento *in vitro* (Gammoudi, Nagaz, & Ferchichi, 2022). El protocolo de desinfección utilizado en este estudio utilizó en primer lugar una solución de detergente al 2% y dos gotas de Tween 20 para el primer lavado. La aplicación de tensioactivos no iónicos tiene el objetivo de disminuir la tensión superficial y facilitar la acción de los agentes desinfectantes, sobre todo en las especies de páramo para eliminar los hongos almacenados en los tricomas de estas especies (Samadi, Abadian, Bakhtiari, Fazeli, & Jamalifar, 2009).

En el protocolo de desinfección, el NaClO es uno de los agentes desinfectantes más utilizados por su capacidad fungicida y bactericida, además de poseer propiedades esscarificantes que inducen la germinación de semillas (Pepe, Hesami, & Jones, 2021). En este estudio, se utilizó concentraciones de NaClO a 1, 3 y 5%, para evaluar el porcentaje de desinfección y oxidación de las semillas. Se obtuvo que el mejor tratamiento fue con NaClO al 3% ya que el porcentaje de desinfección obtenido fue del 93,40%, en comparación con el tratamiento de NaClO al 5% que presentó un porcentaje de desinfección del 95,5%. Sin embargo, para ese tratamiento se observó la oxidación del aquenio mediante una coloración café oscuro a negro. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Souza *et al.*, (2007), el cual obtuvo un porcentaje de desinfección del 97% a una concentración de NaClO de 3%, para semillas de la especie *Lychnophora pinaster*, perteneciente a la familia Asteraceae.

La eficiencia de la germinación de las semillas de algunas especies de la familia Asteraceae depende de los factores ambientales y de las condiciones de páramo. La temperatura es uno de los principales factores a considerar, en los estudios realizados por Grigoriadou *et al.*, (2020) y Pazmiño (2021), en las especies *Carlina diae* y *Diplostephium rupestre* (Kunth) Weed., se mantuvo una temperatura entre 20 a 25°C y se observó la ruptura de latencia con la formación de radícula a los 14 días. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio en el cual, la ruptura de latencia y formación de radícula se observó a los 15 días.

Los tratamientos con reguladores de crecimiento como el ácido giberélico (AG3) son una alternativa para promover la germinación de las semillas y aumentar el porcentaje de obtención de brotes (Grigoriadou, *et al.*, 2020). El protocolo de introducción usado en este estudio evaluó tres concentraciones diferentes de AG₃ a 0, 1 y 2 mg/L. El tratamiento con 1 mg/L de AG3 presentó una germinación del 93%, este valor es similar al reportado por Pazmiño (2021), en el que los porcentajes de germinación obtenidos para esta concentración estuvieron en un rango entre el 85 y 95%. Por lo que 1mg/L de AG3 se

considera la mejor concentración de este regulador de crecimiento, para aumentar los niveles de germinación de semillas en esta especie.

Establecimiento *in vitro* de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed.

El protocolo de desinfección e introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se estableció a partir de explantes obtenidos de plantas jóvenes ubicadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca. La abundante presencia de tricomas como medida de protección para las bajas temperaturas de los ecosistemas de páramo dificulta la acción de los agentes desinfectantes disminuyendo la efectividad de los mismos para la eliminación de hongos y bacterias en la superficie del tejido vegetal (Sharma, Kataria, & Shekhawat, 2017).

Los estudios realizados por Villalobos & Pérez (1979), sugieren que en plantas que presentan pubescencia se debe realizar un primer lavado con una solución de detergente y Tween 20 para romper la tensión superficial y facilitar la acción de los agentes desinfectantes en la superficie del tejido. Por tal motivo, en el presente estudio, para eliminar el mayor porcentaje de hongos y bacterias se utilizó una solución de detergente al 2% y cuatro gotas de Tween 20 por cada litro para el primer lavado.

El uso de fungicida previo al lavado con hipoclorito de sodio ha demostrado que mejora los niveles de desinfección ya que disminuye la acción de los contaminantes endófitos, los cuales en plantas de páramo son muy comunes debido a las altas precipitaciones de estos ecosistemas y la presencia de tricomas para soportar las bajas temperaturas (Laguna, Cueva, Tamariz, & Olivera, 2019). En el inicio del ensayo de desinfección para las yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed., la aplicación aislada de NaClO a concentraciones de 1, 2 y 3%, presentó altos niveles de contaminación con hongos, por lo tanto, previo al lavado con hipoclorito de sodio se aplicó un lavado con fungicida (NATURAM al 4%) para aumentar los niveles de desinfección. El menor porcentaje de contaminación obtenido en este estudio posterior a la aplicación del protocolo de desinfección fue del 47,50%, lo cual se asemeja a

los resultados obtenidos por Jaramillo (2008), el cual obtuvo un porcentaje de contaminación del 40% para *Polylepis microphylla*.

El uso de un agente desinfectante diferente al NaClO es una alternativa a tomar en cuenta para disminuir los niveles de contaminación de plantas de páramo (Gammoudi, Nagaz, & Ferchichi, 2022). Una alternativa, es el cloruro de mercurio ($HgCl_2$), este es un compuesto químico utilizado para disminuir los niveles de contaminación en el cultivo *in vitro* de plantas. El estudio realizado por Laguna y sus colaboradores en el 2019, para la especie *Senecio calvus* perteneciente a la familia Asteraceae, en donde se usó una concentración de $HgCl_2$ al 0,1% se obtuvo una desinfección del 97%. Sin embargo, en el presente ensayo, no se pudo evaluar la efectividad de $HgCl_2$ ya que, al ser altamente contaminante, el control de residuos tóxicos requiere de protocolos altamente rigurosos, por lo tanto, el uso de este agente desinfectante es una alternativa para futuras investigaciones.

En el protocolo de introducción de yemas apicales o laterales de especies de páramo uno de los principales problemas es el necrosamiento del tejido vegetal y el oscurecimiento del medio debido a la exudación fenólica de la sección cortada de los explantes (Gammoudi, Nagaz, & Ferchichi, 2022). Los antioxidantes más utilizados para evitar este problema, son el carbón activado, ácido cítrico y ácido ascórbico ya que controlan la acumulación de sustancias fenólicas que inhiben el crecimiento de los explantes (Ujjwala, 2006).

El carbón activado es uno de los principales antioxidantes al momento de establecer yemas apicales o laterales de plantas leñosas, tiene la capacidad de adsorber los compuestos fenólicos y evitar la muerte del tejido (Margara, 1988). En estudios realizados por North y sus colaboradores en el 2002, se reporta la reducción del 53% en la producción de fenoles para la siembra de *Strelitzia reginae*, en cambio en el presente estudio se obtuvo un control de oxidación por fenoles del 17,5%. La variación de los resultados obtenidos en comparación a estudios anteriores puede estar relacionada a una inhibición de crecimiento del material vegetal causada por la adsorción de los nutrientes del medio de cultivo. Esta

inhibición se produce ya que la actividad del carbón activado no está focalizada a la adsorción de fenoles, puede también adsorber los nutrientes del medio y afectar las condiciones de cultivo (Vega, Bermejo, & Villegas, 2007).

El ácido cítrico es otro de los antioxidantes más utilizados para evitar el estrés al momento de introducir los explantes y evitar la oxidación del tejido (Aguirre, Jean, & Ligue, 2010). A pesar de que el ácido cítrico es uno de los antioxidantes más utilizados y con altos niveles de efectividad, los resultados reportados por Jaramillo (2008) en la introducción de *Polylepis microphylla*, obtuvo una efectividad menor al 10%. Este porcentaje es similar al obtenido en el presente estudio, el cual fue del 2,5%. El bajo nivel de efectividad puede deberse a la alta producción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) lo que dificulta el efecto inhibitorio del ácido cítrico, provocando una alta producción de quinonas, afectando el crecimiento y desarrollo de los explantes debido a su alto nivel oxidante (Ancasi, Montero, Ferreira, & Muñoz, 2016).

La elevada formación de quinonas es uno de los principales problemas en el establecimiento *in vitro* de yemas de especies de páramo debido a que la oxidación de estos compuestos altera los procesos de crecimiento y desarrollo de los explantes (Jaramillo, 2008). La cisteína es una alternativa para evitar este inconveniente, este antioxidante elimina las quinonas que se hayan formado en la exudación de fenoles, además al ser un aminoácido tiene la capacidad de inducir un rápido desarrollo de los brotes ya que es una fuente de nitrógeno (Sanchez & Salaverría, 2004). En el estudio realizado por Jaramillo (2008), el uso de cisteína en la introducción de *P. microphylla* tuvo un porcentaje de supervivencia del 30%. Sin embargo, en el presente estudio no se pudo realizar este ensayo por lo que su uso en futuras investigaciones debe ser una alternativa a considerar.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la propagación por semillas tiene mayor porcentaje de obtención de brotes en comparación a la propagación vegetativa por yemas apicales o laterales. La eficiencia de la propagación por semilla está

relacionada a la supervivencia R y K, ya que esta especie tiene la capacidad de formar un gran número de semillas con embriones viables (Pazmiño, 2021). En cambio, la propagación vegetativa tiene un menor porcentaje de efectividad debido a la abundante pubescencia presente en la yemas apicales o laterales y el necrosamiento del tejido vegetal causado por la exudación fenólica en las zonas de corte del explante (Gammoudi, Nagaz, & Ferchichi, 2022).

La variabilidad genética que se obtuvo en este estudio es importante ya que permite planes de reforestación sin riesgo de una pérdida masiva de plantas causada por plagas o enfermedades al momento de su inserción en la naturaleza (Loo, 2011). Una adecuada reforestación está relacionada a la cuantificación de la variabilidad genética y a la capacidad de adaptación de los factores bióticos y abióticos del ecosistema (Alía, *et al.*, 2004). La variabilidad genética obtenida en este estudio está relacionada a la siembra de semillas de diferentes plantas ya que la recolección se realizó de manera aleatoria en diferentes puntos de muestreo.

El establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de semillas y yemas es importante para eliminar los agentes patógenos que afectan en el desarrollo *in vitro* del material vegetal (Hesami, Naderi, & Tohidfar, 2019). Por lo tanto, el estudio realizado en las semillas y yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. permitió estandarizar un protocolo de desinfección e introducción para el establecimiento *in vitro* de esta especie. Además, esta investigación es la fase inicial para la micropropagación y conservación de esta especie perteneciente a la familia Asteraceae que puede ser usada en la reforestación y restauración de los Bosques Andinos del Ecuador.

Capítulo VI: Conclusiones

El presente estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador, en base a ello se realizaron ensayos de desinfección e introducción que permitieron el establecimiento *in vitro* de *D. rupestre* (Kunth) Weed. y se pudo concluir que:

- El protocolo de desinfección estandarizado para las semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. consta de la aplicación de una solución de detergente al 2% durante 10 minutos, alcohol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 5 minutos, ya que se obtuvo un porcentaje de desinfección del 93%.
- El medio de cultivo MS suplementado con ácido giberélico a una concentración de 1mg/L, permitió el establecimiento *in vitro* de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. con un porcentaje de germinación del 93%.
- El protocolo de desinfección estandarizado para las yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. consta de la aplicación de una solución de detergente al 2% y 4 gotas de Tween 20 durante 15 minutos, NATURAM al 4% y 4 gotas de Tween 20 durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y 4 gotas de Tween 20 durante 5 minutos, ya que se obtuvo un porcentaje de desinfección del 52.50%.
- El control de la oxidación para el establecimiento *in vitro* de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. tuvo los mejores resultados en el medio de cultivo suplementado con 3mg/L de carbón activado. Lo que permite disminuir la exudación fenólica de la sección cortada de los explantes.
- En el presente estudio, se obtuvo que la propagación por semillas tiene mayor porcentaje de obtención de brotes en comparación a la propagación vegetativa por yemas apicales o laterales
- El muestreo al azar de semillas realizado en la presente investigación permite mantener la variabilidad genética en el establecimiento *in vitro* de *D. rupestre* (Kunth)

Weed., lo que evita la pérdida masiva de plantas causada por plagas o enfermedades al momento de realizar planes de reforestación.

Capítulo VII: Recomendaciones

En el establecimiento *in vitro* de yemas se recomienda realizar pruebas con otros antioxidantes como PVP, ácido ascórbico y el uso de aminoácidos como la glicina, arginina y glutamina para eliminar las quinonas y poder reducir el efecto oxidativo que provoca la exudación de fenoles.

En el protocolo de desinfección de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Weed. se recomienda el uso de agentes desinfectantes más fuertes como el Cloruro de Mercurio para eliminar la mayor cantidad de agentes patógenos como hongos y bacterias.

Se recomienda realizar la recolección del material vegetal en diferentes épocas del año para analizar la variabilidad en los niveles de contaminación y oxidación de los explantes.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abeli, T., Dalrymple, S., Godefroid, S., Mondoni, A., Müller, J., Rossi, G., & Orsenigo, S. (2020). *Ex situ* collections and their potential for the restoration of extinct plants. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, 34(2), 303–313. doi:10.1111/cobi.13391
- Aguirre, G., Jean, B., & Lique, L. (2010). Aplicaciones del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Cochabamba, Bolivia: Universidad Mayor de San Simón.
- Aguirre-Mendoza, Z., Loja, A., Solano, M., & Aguirre, N. (2015). Especies Forestales más aprovechadas del Sur del Ecuador. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Alía, R., Agúndez, D., Alba, N., González-Martínez, S., & Soto, A. (2004). Variabilidad genética y gestión forestal. *Ecosistemas*, 12(3), 120-135. Obtenido de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/230>
- Ancasi, R., Montero, J., Ferreira, N., & Muñoz, I. (2016). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación in vitro de plátano (*Musa paradisiaca* L.). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(2), 104-111. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000200008&lng=es&tlng=es
- Aranguren, A., Morillo, G., & Fariñas, M. (2008). Distribución geográfica y clave de las especies del género *Oritrophium* (Kunth) Cuatrec. (Asteraceae). *Acta Botanica Venezuelica*, 31(1), 81-106. doi:<https://doi.org/10.1002/tax.602010>
- Avellaneda-Torres, L., León, T., & Torres, E. (2018). Impact of potato cultivation and cattle farming on physicochemical parameters and enzymatic activities of Neotropical high Andean Páramo ecosystem soils. *The Science of the total environment*, 631, 1600-1610. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.137>

- Ávila, L., Baquero, E., Viña, A., & Murillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (ASTERACEAE) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae*, 13(1), 55-60. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042006000100008&lng=en&tlng=es
- Bonilla, M. (2015). Conservación in vitro una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Dialnet*, 6(1), 67-82. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5590927>
- Bonnesoeur, V., Locatelli, B., Guariguata, M., Ochoa-Tocachi, B., Vanacker, V., Mao, Z., & Mathez-Stiefel, S. (2019). Impacts of forests and forestation on hydrological services in the Andes: A systematic review. *Forest Ecology and Management*, 433(5), 569–584. doi:doi:10.1016/j.foreco.2018.11.033
- Bunn, E., Turner, S., & Dixon, K. (2011). Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 47, 188–200. doi:10.1007/s11627-011-9340-0
- Bussmann, R. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología*, 12(2), 203-216. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332005000200006&lng=es&tlng=es.
- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science*, 79(2), 53-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>.
- Buytaert, W., Iñiguez, V., & De Bievre, B. (2007). The effects of afforestation and cultivation on water yield in the Andean páramo. *Forest Ecology and Management*, 252(2), 22-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.06.035>

- Celleri, R., & Feyen, J. (2009). The Hydrology of Tropical Andean Ecosystems: Importance, Knowledge Status, and Perspectives. *Mountain Research and Development*, 29(4), 350-355. doi:<https://doi.org/10.1659/mrd.00007>
- Chuncho Morocho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71-83. Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/686>
- Engels, J., & Ebert, A. (2021). A Critical Review of the Current Global *Ex Situ* Conservation System for Plant Agrobiodiversity. I. History of the Development of the Global System in the Context of the Political/Legal Framework and Its Major Conservation Components. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1557. doi:10.3390/plants10081557
- Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron-multi-objective genetic algorithm. *BMC plant biology*, 22(1), 324. doi:<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>
- García, L., Fera, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Bioteconología Vegetal*, 7(2), 67-79. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/359/727>
- García, P. (2005). Los caminos del desarrollo sostenible. Quito: FLACSO.
- Grigoriadou, K., Sarropoulou, V., Krigas, N., Maloupa, E., & Tsoktouridis, G. (2020). GIS-Facilitated Effective Propagation Protocols of the Endangered Local Endemic of Crete *Carlina diae* (Rech. f.) Meusel and A. Kástner (Asteraceae): Serving *Ex Situ* Conservation Needs and Its Future Sustainable Utilization as an Ornamental. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1465. doi:<https://doi.org/10.3390/plants9111465>

- Guzzon, F., Gianella, M., Velazquez, J., Sanchez, C., & Costich, D. (2021). Seed longevity of maize conserved under germplasm bank conditions for up to 60 years. *Annals of botany*, 127(6), 775–785. doi:10.1093/aob/mcab009
- 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. doi:https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00282
- Hofstede, R., Segarra, P., & Mena, P. (2003). Los páramos del mundo: Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Quito: Global Peatland Initiative.
- Homeier, J., & Leuschner, C. (2021). Factors controlling the productivity of tropical Andean forests: climate and soil are more important than tree diversity. *Biogeosciences*, 18(4), 1525–1541. doi:https://doi.org/10.5194/bg-18-1525-2021
- Jaramillo, P. (2008). Establecimiento del cultivo in vitro de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia del Chimborazo. (Tesis). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolqui.
- Khan, A., Shah, A., & Ali, N. (2021). *In-vitro* propagation and phytochemical profiling of a highly medicinal and endemic plant species of the Himalayan region (*Saussurea costus*). *Scientific reports*, 11(1), 23575. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-021-03032-1
- Laguna, Y., Cueva, Y., 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. doi:http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.455

- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitmam, N., Endara, L., Ulloa-Ulloa, C., & Navarrete, H. (2019). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. *Publicaciones del Herbario QCA*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>
- Leva, A., & Rinaldi, L. (2012). Recent Advances in Plant in vitro Culture. Lahore: IntechOpen. doi:<https://doi.org/10.5772/52760>
- Loo, J. (2011). Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. Mexico D.F: Comisión Nacional Forestal.
- MAE. (2020). Parque Nacional Cayambe-Coca. Quito, Ecuador.
- Margara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro de meristemas y organogénesis. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Marsico, T., Krimmel, E., Carter, J., Gillespie, E., Lowe, P., McCauley, R., . . . Monfils, A. (2020). Small herbaria contribute unique biogeographic records to county, locality, and temporal scales. *American journal of botany*, *107*(11), 1577–1587. doi:<https://doi.org/10.1002/ajb2.1563>
- Meyfroidt, P., & Lambin, E. (2011). Global forest transition: prospects for an end to deforestation. *Environment and Resources*, *36*(4), 343-371. doi:10.1146/annurev-environ-090710-143732
- Nikolić, M., & Stevović, S. (2015). Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry & Urban Greening*, *14*, 782–789. doi:10.1016/j.ufug.2015.08.002
- North, J., Ndakidemi, P., & Laubscher, C. (2012). Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of the Physical Sciences*, *7*(4), 638-646.

- Nowakowska, M., Pavlović, Ž., Nowicki, M., Boggess, S., & Trigiano, R. (2020). *In Vitro* Propagation of an Endangered *Helianthus verticillatus* by Axillary Bud Proliferation. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 712. doi:<https://doi.org/10.3390/plants9060712>
- Oliveira Amorim, V., & Pousada Bautista, H. (2016). Asteraceae da Ecorregião Raso da Catarina, Bahia, Brasil. *Ro-driguésia*, 67, 785–794. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201667317>
- Ortiz, E., Vargas, O., & Simpson, B. (2017). Conflicting phylogenomic signals reveal a pattern of reticulate evolution in a recent high-Andean diversification (Asteraceae: Astereae: *Diplostephium*). *New Phytologist*, 214(4), 1736-1750. doi:10.1111/nph.14530
- Panero, J., & Crozier, B. (2016). Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 99, 116-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.007>
- Pazmiño, G. (2021). Germinación in vitro de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del parque nacional Cayambe Coca. (Tesis). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolqui.
- Pepe, M., Hesami, M., & Jones, A. (2021). Machine Learning-Mediated Development and Optimization of Disinfection Protocol and Scarification Method for Improved *In Vitro* Germination of Cannabis Seeds. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2397. doi:<https://doi.org/10.3390/plants10112397>
- Pérez, B., & Castañeda, S. (2017). Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Recursos Genéticos Forestales*, 1-3.
- Perez, T., Valverde-Barrantes, O., Bravo, C., Taylor, T., Fadrique, B., Hogan, J., . . . Feeley, K. (2018). Botanic gardens are an untapped resource for studying the functional ecology of tropical plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*.

Series B, Biological sciences, 374(1763), 17-39.

doi:<https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0390>

Posada, J. (2014). El papel de la dispersión de las semillas en la regeneración de la vegetación del páramo en un paisaje fragmentado. Venezuela: Universidad de los Andes.

Rivero-Guerra, A. (2020). Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador. *Collectanea Botanica*, 39, e001.

doi:<https://doi.org/10.3989/collectbot.2020.v39.001>

Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009.

doi:10.3390/ijms22063009

Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019). Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi, 2019.0. Recuperado el 21 de Junio de 2022, de <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/>

Samadi, N., Abadian, N., Bakhtiari, D., Fazeli, M., & Jamalifar, H. (2009). Efficacy of detergents and fresh produce disinfectants against microorganisms associated with mixed raw vegetables. *Journal of food protection*, 72(7), 1486–1490.

doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.7.1486>

Sanchez, M., & Salaverría, J. (2004). Control of oxidation and contamination of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cultivated *in vitro*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21-26. Obtenido de <https://hdl.handle.net/1807/5240>

Sánchez, N., & Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205. Obtenido de

https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000100020

Sharma, U., Kataria, V., & Shekhawat, N. (2017). *In vitro* propagation, *ex vitro* rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a leguminous tree with medicinal values. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 23(4), 969–977. doi:<https://doi.org/10.1007/s12298-017-0459-2>

Souza, A., Pinto, J., Bertolucci, S., & Correa, R. (2007). *In vitro* Propagation of *Lychnophorapinaster*(Asteraceae): A Threatened Endemic Medicinal Plant. *HORTSCIENCE*, 42(7), 1665–1669. doi:<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.7.1665>

Ujjwala, S. (2006). Plant tissue culture laboratory. Bhilai: St. Thomas College.

Vargas, O., & Madriñán, S. (2006). Clave para la identificación de las especies del género *Diplostephium* (Asteraceae, Astereae) en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 20(117), 489-494.

Vega, C., Bermejo, J., & Villegas, G. (2007). Propagación masiva de *Polylepis tomentella* Weddell ssp. nana mediante técnicas de cultivo *in vitro*. *Ecología en Bolivia*, 42(2), 102-120. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1605-25282007000800003&lng=es&tlng=es

Villaseñor, J., & Ortiz, E. (2012). La familia Asteraceae en la Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Acta Bota-nica Mexicana*, 100, 259-291. doi:<https://doi.org/10.21829/abm100.2012.37>

Zhang, T., & Elomaa, P. (2021). Don't be fooled: false flowers in Asteraceae. *Current opinion in plant biology*, 59, 101972. doi:10.1016/j.pbi.2020.09.006

Capítulo IX: Apéndices