



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

“Evaluación del efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en Ecuador”

Valencia Cepeda, Zaskya Poleth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Segovia Salcedo, María Claudia, Ph.D.

03 de agosto del 2022



VALENCIA Zaskya Segunda Version resumen recomendacion...

Scanned on: 20:18 August 3, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	45
Words with Minor Changes	1
Paraphrased Words	0
Omitted Words	0



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



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de ingeniería En Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "Evaluación del efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe - Coca en Ecuador." fue realizado por la señorita Valencia Cepeda, Zaskya Poleth; 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, 03 de agosto del 2022



Firmado electrónicamente por:
MARIA CLAUDIA
SEGOVIA
SALCEDO

María Claudia Segovia Salcedo, PhD

C. C 1709055998



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de ingeniería En Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Valencia Cepeda, Zaskya Poeth**, con cédula de ciudadanía n° 1723647978, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe - Coca en 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, 03 de agosto del 2022

Valencia Cepeda, Zaskya Poeth

C.C.: 1723647978



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de ingeniería En Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Valencia Cepeda, Zaskya Poleth**, con cédula de ciudadanía n° 1723647978, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe - Coca en Ecuador en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.**

Sangolquí, 03 de agosto del 2022

Valencia Cepeda, Zaskya Poleth

C.C.: 1723647978

Dedicatoria

Con cariño a Victoria y Myriam

Agradecimiento

A mi directora académica María Claudia Segovia, a quien admiro. Por permitirme participar en el proyecto, su guía profesional, reflexiones, apoyo, paciencia y calidez humana.

A Marianela Mariño por su asesoramiento y soporte durante el desarrollo de este trabajo. Ana Gabriela del Hierro por su acogida y consejos.

A mi familia, por su apoyo y cariño incondicional. A mi tía Victoria por su guía. A mi madre Myriam por ser mi soporte. A mi padre Enrique por creer en mí y a mis hermanos Pamela, Nicolás, Aaron y David.

A Javi por ser mi refuerzo durante toda la carrera, con quien por suerte coincidí. Por su amistad y compañía a mis amigos, especialmente a Cinthya y María José.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a los docentes que han sido excelentes profesionales. Al proyecto BIOGEEC.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras	12
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Planteamiento del problema.....	17
Justificación del problema	18
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos.....	23
Capítulo II: Marco Teórico.....	25
El Páramo Andino	25
Parque Nacional Cayambe - Coca	25
Familia Ericaceae.....	25
<i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC.....	26
<i>Disterigma empetrifolium</i> (Kunth) Drude	27
Familia Rubiaceae.....	27
<i>Nertera granadensis</i> (Mutis ex L. f.) Druce.....	28

<i>Galium hypocarpium</i> (L.) Endl. ex Griseb.....	28
Estrategias para la Conservación de Especies Vegetales	29
Conservación de germoplasma.....	29
Test de Viabilidad.....	32
Germinación de Semillas.....	32
Capítulo III: Metodología	33
Ubicación del trabajo de investigación y área de estudio.....	33
Fase de Campo.....	34
Recolección del Material Vegetal	34
Fase de Laboratorio	35
Procesamiento y Almacén de Muestras Vegetales	35
Análisis Morfológico del Fruto y Semilla	35
Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ).....	36
Desinfección de Semillas	36
Germinación <i>in vitro</i>	37
Variables	39
Análisis estadístico de los datos.....	39
Capítulo IV: Resultados	41
Análisis Morfológico del Fruto y Semilla	41
Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ).....	46
Desinfección de Semillas	49

Germinación <i>in vitro</i>	55
Capítulo V: Discusión.....	64
Análisis Morfológico del Fruto y Semilla y Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ).....	64
Desinfección de Semillas	67
Germinación de Semillas	69
Capítulo VI: Conclusiones.....	75
Capítulo VII: Recomendaciones.....	76
Bibliografía.....	78

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Tratamientos empleados en la desinfección de semillas de las especies de estudio</i>	36
Tabla 2 <i>Tratamientos para la germinación in vitro</i>	38
Tabla 3. <i>Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de D. empetrifolium</i>	50
Tabla 4 <i>Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de P. prostrata</i>	51
Tabla 5 <i>Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de N. granadensis</i>	52
Tabla 6 <i>Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de G. hypocarpium</i>	54
Tabla 7 <i>Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de P. prostrata</i>	56
Tabla 8 <i>Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de D. empetrifolium</i>	58
Tabla 9 <i>Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de G. hypocarpium</i>	60
Tabla 10 <i>Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de N. granadensis</i>	62

Índice de figuras

Figura 1 <i>Especie Pernettya prostrata perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador</i>	26
Figura 2 <i>Especie Disterigma empetrifolium perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador</i>	27
Figura 3 <i>Especie Nertera granadensis perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador</i>	28
Figura 4 <i>Especie Galium hypocarpium perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador</i>	29
Figura 5 <i>Puntos de estudio; en color rojo las cinco coordenadas pertenecientes al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador</i>	34
Figura 6 <i>Vista estereoscópica de fruto y semilla de Pernettya prostrata. A) Vista frontal del fruto, B) Semilla</i>	41
Figura 7 <i>Vista estereoscópica de fruto y semilla de Disterigma empetrifolium. A) Vista frontal del fruto, B) Vista lateral del fruto, C) Semilla</i>	42
Figura 8 <i>Vista estereoscópica de fruto y semilla de Galium hypocarpium. A) Vista lateral, B) Corte transversal, C) Semilla</i>	43
Figura 9 <i>Vista estereoscópica de fruto y semilla de Nertera granadensis. A) Vista Frontal, B) Vista trasera, C) Vista lateral con hojas, D) Semilla</i>	43
Figura 10 <i>Longitud del fruto, diámetro de las cuatro especies; Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)</i>	44
Figura 11 <i>Peso promedio de 100 semillas de las cuatro especies; Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)</i>	45

Figura 12 <i>Tamaño de la semilla, largo (rosado) y ancho (celeste) de las cuatro especies; Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)</i>	46
Figura 13 <i>Porcentaje de viabilidad de las cuatro especies: Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)</i>	47
Figura 14 <i>Prueba de viabilidad en embriones de Pernettya prostrata. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja</i>	47
Figura 15 <i>Prueba de viabilidad en embriones de Disterigma empetrifolium. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja</i>	48
Figura 16 <i>Prueba de viabilidad en embriones de Galium hypocarpium. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja</i>	48
Figura 17 <i>Prueba de viabilidad en embriones rojo no viable, blanco viable. Nertera granadensis</i>	49
Figura 18 <i>Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Disterigma empetrifolium</i>	50
Figura 19 <i>Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Pernettya prostrata</i>	52
Figura 20 <i>Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Nertera granadensis</i>	53
Figura 21 <i>Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Galium hypocarpium</i>	55
Figura 22 <i>Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de Pernettya prostrata</i>	57
Figura 23 <i>Germinación in vitro de Pernettya prostrata a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias</i>	57

Figura 24 <i>Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de Disterigma empetrifolium</i>	59
Figura 25 <i>Germinación in vitro de Disterigma empetrifolium a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias</i>	59
Figura 26 <i>Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de Galium hypocarpium</i>	61
Figura 27 <i>Germinación in vitro de Galium hypocarpium a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias</i>	61
Figura 28 <i>Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de Nertera granadensis</i>	63
Figura 29 <i>Germinación in vitro de Nertera granadensis a partir de semillas. A) hojas primarias, B) emergencia del brote radicular</i>	63

Resumen

El páramo es uno de los ecosistemas más importantes de Ecuador, y tiene especies animales y vegetales únicas, además de almacenar y regular agua. Es necesaria la aplicación de programas de conservación como la implementación de bancos de semillas. Para contribuir con el banco de semillas HANS-BANK se evaluó la germinación de las especies *Pernettya próstata* y *Disterigma empetrifolium* de la familia *Ericaceae* junto con *Galium hypocarpium* y *Nertera granadensis* de la familia *Rubiaceae*. Se recolectaron frutos de las cuatro especies en el Parque Nacional Cayambe – Coca. En el laboratorio se realizó el análisis morfológico de frutos y semillas además de pruebas de viabilidad y de desinfección. Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de los procesos germinativos de las semillas, evaluando los parámetros de luz recibida, temperatura y concentración de ácido giberélico. Se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 63% para *P. prostata*, 77% para *D. empetrifolium*, un 99% para *D. hypocarpium* 99% y 93% para *N. granadensis*. Los ensayos de desinfección mostraron excelentes resultados usando NaClO obteniéndose un 0% de contaminación en los mejores tratamientos, por lo que su uso se sugiere que sea en concentraciones bajas y tiempos cortos para evitar la oxidación del material vegetal. Las pruebas de germinación arrojaron resultados favorecedores en los tratamientos a temperatura ambiente, donde se varía la temperatura. Por el lado de la luz, *P. prostata* no se vio afectada por su presencia o ausencia mientras que las otras tres especies mostraron los mejores resultados con fotoperiodo de 12 horas. El uso del ácido giberélico sugiere efectos positivos en los tratamientos analizados, pero se requiere estudios adicionales para sustentar esto. Concluyendo, se obtuvo un protocolo completo para la germinación de cuatro especies de páramo, esencial para la implementación de bancos de semillas.

Palabras clave: páramo, conservación, viabilidad, germinación.

Abstract

The paramo is has as one of the most important ecosystems in Ecuador, and it has a multitude of unique animal and plant species, as well as having the ability to store and regulate water. The application of conservation programs for the moors is necessary. One of the possible conservation measures is the implementation of seed banks. In order to contribute to the HANS-BANK seed bank, the germination of the species *Pernettya prostrata* and *Disterigma empetrifolium* of the *Ericaceae* family together with *Galium hypocarpium* and *Nertera granadensis* of the *Rubiaceae* family was evaluated. Fruits of the four species were collected in the Cayambe – Coca National Park. In the laboratory, the morphological analysis of fruits and seeds was carried out, as well as viability and disinfection tests. Subsequently, the evaluation of the germinative processes of the seeds was carried out, evaluating the parameters of light received, temperature and concentration of gibberellic acid. Viability percentages of 63% for *P. prostrata*, 77% for *D. empetrifolium*, 99% for *D. hypocarpium* 99% and 93% for *N. granadensis* were obtained. The disinfection tests showed excellent results using NaClO, obtaining 0% contamination in the best treatments, so the use of this compound is suggested to be in low concentrations and short times to avoid oxidation of the plant material. The germination tests yielded favorable results in the treatments at room temperature, where the temperature is varied. On the light side, *P. prostrata* was not affected by its presence or absence, while the other three species showed the best results with a 12-hour photoperiod. The use of gibberellic acid suggests positive effects in the treatments analyzed, but additional studies are required to support this benefit. In conclusion, a complete protocol for the germination of four paramo species was obtained, which is essential to start with the implementation of seed banks.

Keywords: paramo, conservation, viability, germination.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Ecuador es considerado un país megadiverso al poseer una gran cantidad de ecosistemas, donde debido a las condiciones tan variadas, dan hogar a multitud de especies de flora y fauna (Mena, 2005). Entre los distintos ecosistemas se destacan los páramos, pues estos albergan un número muy alto de especies endémicas que son el resultado de condiciones de radiación, diversificación y aislamiento geográfico. De hecho, en términos de flora, se estima que alrededor del 25 % de las especies vegetales registradas en esta área son endémicas, y dentro de la región andina, alrededor del 75 % lo son (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016). Muchas de estas especies se encuentran bajo amenaza, principalmente por la degradación de sus hábitats. Por estas razones, es menester estudiar las características, estructuras, diversidad y propagación de semillas de las especies vegetales con el objetivo de conservar y recuperar la flora de los páramos ecuatorianos.

Según Campos (2014), a partir de los años 80 existe un incremento de publicaciones científicas en los ámbitos de biodiversidad y ecología, con picos alrededor del año 2000. Sin embargo, el conocimiento que se genera tiende a ser general, o únicamente enfocado en otros países de la región como Colombia y Perú. El Ecuador está pobremente representado respecto a la tasa de investigación, lo que desencadena en falta de información sobre las especies de esta región (Campos, 2014).

En los últimos años se realizaron a nivel regional, varias investigaciones enfocadas en la propagación de especies vegetales para su conservación y manejo. En el 2014, Vargas y Pérez realizaron un análisis sobre la propagación por semillas de 13 especies de Colombia, entre las familias estudiadas se encuentran Ericaceae y Rubiaceae como centro de esta investigación. En su trabajo titulado “Semillas de

plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica” se describen aspectos conceptuales y teóricos de su ecología hasta su aplicación en proyectos de restauración y conservación (Vargas & Pérez, 2014).

En cuanto a las investigaciones realizadas en el Ecuador la bibliografía es escasa, un estudio realizado por Romero y Cueva (2020) evalúa la variación de tamaño y comportamiento germinativo de semillas de *Pernettya prostrata* (*Ericaceae*). De igual manera para la familia *Rubiaceae* Pachón (2014), realizó un estudio analizando la incidencia de la temperatura en la germinación de *Galium hypocarpium* y *Nertera granadensis*.

La evidencia científica en Ecuador sobre la propagación, conservación y manejo de especies vegetales de páramo se encuentra en etapas muy tempranas, pocas especies han sido analizadas y los estudios existentes no profundizan en el tema. Lo cual es necesario desarrollar al momento de plantear programas de conservación y recuperación de ecosistemas en el territorio ecuatoriano.

Justificación del problema

Los páramos son fundamentales en el manejo del potencial hídrico de los territorios (Betancur & Pérez, 2016), ya que en ellos nacen varios de los principales ríos existentes en Ecuador, donde además se maneja la distribución de agua potable a las ciudades cercanas (Duarte & Roa, 2014). Esto se debe a que los páramos almacenan y regulan el agua proveniente de lluvias y glaciares de nevados, acumulan materia orgánica regulan el clima (Chuncho y Chuncho, 2019; Villa et al., 2019).

Asimismo, los páramos albergan grandes cantidades de especies, tanto vegetales como animales, adaptadas para vivir precisamente en este ecosistema (Hofstede, y otros, 2014). A nivel social, en el Ecuador, los páramos tienen

trascendencia fundamental ya que son el lugar de asentamiento de culturas indígenas, particularmente, el parque Nacional Cayambe Coca alberga a indígenas de las culturas Kichwa y A'i Cofán. Finalmente, por su diversidad singular y variopinta, los páramos constituyen un atractivo turístico consolidado en donde se puede visitar el volcán Cayambe, ruinas de antiguas civilizaciones, aguas termales e incluso es un buen lugar para senderismo (Guacho, 2018; Lasso, 2009; Ministerio del Ambiente, 2020).

El Parque Nacional Cayambe - Coca fue declarado el 17 de noviembre de 1970 área protegida, con una superficie de 403103 ha (Jara, 2015), y ubicado dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Estado – SNAP. El parque consta como la cuarta área protegida más grande del país, por lo que es un territorio de gran interés nacional gracias a su amplia biodiversidad donde se incluyen una gran cantidad de especies animales y plantas endémicas (BirdLife International, 2008), muchas de las cuales se encuentran bajo algún nivel de amenaza.

Además, esta reserva comprende múltiples pisos altitudinales, incluyendo al volcán Cayambe con pico de altitud de 5970 msnm y zonas bajas con altitudes de alrededor de 900 msnm, esta variación altitudinal repercute en la temperatura que se encuentran desde 5°C hasta los 25 °C (Montúfar Flores, 2015).

Por su remarcable riqueza biológica, el Ministerio del Ambiente, en su “Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe - Coca”, ha planteado objetivos enfocados a proteger el ecosistema del páramo, que involucra conservar los recursos hídricos que favorecen a los sistemas hidrográficos debido a su importancia en el sostenimiento de la biodiversidad y abastecimiento del agua, y, mantener la gran diversidad en el ecosistema del bosque nublado (Ministerio del Ambiente, 2020). La creación de planes de manejo para la protección de los páramos es una respuesta a la inherente fragilidad

de estos ecosistemas ante las diversas amenazas que se presentan, provocando, en consecuencia, un grave deterioro de la biodiversidad presente en estos ecosistemas.

En cuanto a materia ambiental, los gobiernos de la mayoría de países, carecen de políticas fuertes de que favorezcan a la protección de los ecosistemas, la población no tiene una buena conciencia ambiental y las grandes empresas carecen de controles ambientales estrictos. Todo esto termina resultando en graves daños a la biodiversidad y sumando a los problemas de escala global como lo es el calentamiento global. A nivel más específico, la deforestación por el avance de la frontera agrícola a estos sitios, colonización, creación de vías y estructuras de forma descontrolada o mal manejo de desechos hacen que los páramos se vean afectados de forma negativa (Mena, 2007). Datos tomados en la década de los 90 estiman la remanencia de la flora nativa de Ecuador en un 68 %; actualmente, ese porcentaje es inferior al 56 %, y del porcentaje afectado, alrededor del 48 % corresponden a ecosistemas de la región andina (Sierra et al., 2019).

Las especies vegetales que forman parte de la biodiversidad del país son valiosas, por lo que se hace énfasis en la importancia de utilizar estrategias alternativas para su conservación. El establecimiento de un banco de germoplasma es una opción para salvaguardar las semillas de especies en peligro de extinción o en situaciones de elevada amenaza (Machado et al., 2016). En el ámbito de la conservación de especies, es imperativo evaluar tanto las características generales como morfológicas, procedencia genética, evaluación de viabilidad y pruebas de germinación (Merritt & Dixon, 2011). Todo lo anterior requiere de protocolos que deben ser desarrollados de ser el caso para contribuir al banco de información de las especies en estudio (GENMEDOC, 2008).

La familia *Ericaceae* cuenta con 22 géneros y 221 especies en el Ecuador y de estas 98 especies son endémicas del país, por lo que se considera una de las familias con mayor endemismo en el territorio nacional. Las especies de la familia *Ericaceae* se presentan de manera abundante en regiones templadas, normalmente se caracterizan por sus usos ornamentales y comestibles, de donde radica su importancia económica. Su distribución es amplia dado que también están presentes en las montañas de las regiones tropicales. La diversidad e importancia ecológica de la familia *Ericaceae* es significativa ya que sus especies eligen los ecotonos de los bosques, y estas se destacan como grupo dominante en ciertos tipos de vegetación como caminos, trochas, barrancos y claros. Adicionalmente, son un componente importante del proceso de sucesión ecológica del bosque andino y brindan alimento a un gran grupo de animales (León-Yáñez, y otros, 2019).

Por otro lado, la familia *Rubiaceae* está constituida por unos 600 géneros y al menos 10000 especies de herbáceas, arbustos, árboles, trepadoras y epífitas, las cuales están distribuidas principalmente en áreas tropicales del mundo. En el Ecuador se encuentran 84 géneros y 557 especies de esta familia (León et al., 2019) de las cuales varias son de importancia económica, pues son fuentes de productos químicos útiles y algunas incluso se cultivan con fines ornamentales (Britannica, 2020). Adicionalmente, varias especies de esta familia generan especial interés debido a que poseen propiedades medicinales (Yashasvi, 2021).

Es por estas razones que la realización de un estudio utilizando especies vegetales que habitan en el páramo es algo de especial importancia, en este caso específico la caracterización de semillas y análisis de la germinación se considera como pasos iniciales indispensables en los programas de conservación. Por lo que a largo

plazo ayudarán a un mejor manejo de estos ecosistemas delicados y generarán grandes beneficios ambientales.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en el Ecuador.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente mediante el peso y tamaño a semillas de cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.).
- Calcular el porcentaje de viabilidad de semillas en cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce para describir sus rasgos de historia de vida reproductiva previa a la germinación.
- Establecer el tratamiento óptimo de desinfección por medio del porcentaje de contaminación de semillas de cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce para su aplicación como pretratamiento al estudio de germinación.
- Determinar el efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre el porcentaje de germinación de las semillas de cuatro especies de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude,

Galium hypocarpium (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce.

Capítulo II: Marco Teórico

El Páramo Andino

Los páramos son regiones que se encuentran distribuidas a lo largo de los Andes en Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Costa Rica y Panamá (Hofstede, y otros, 2014), ubicados en la alta montaña; en el caso del Ecuador, a una altitud promedio de 3300 m.s.n.m. (Chuncho & Chuncho, 2019). Como resultado, los páramos se caracterizan por sus bajas temperaturas las cuales se presentan particularmente en la noche. Debido a esto, las múltiples especies vegetales que se existentes en el páramo, han tenido que desarrollar estrategias de supervivencia ante las bajas temperaturas (Sklenar, Kucerova, Mace, & Macková, 2010).

Parque Nacional Cayambe - Coca

El Parque Nacional Cayambe - Coca tiene un total de cuatro ecosistemas de páramo, los cuales ocupan el 26% del territorio total de la reserva según el Ministerio del Ambiente (2020). El porcentaje restante lo ocupan cuerpos de agua, bosques nativos, entre otras áreas.

Dentro del parque nacional encontramos gran variedad de especies de flora y fauna las cuales se encuentran distribuidas entre los distintos ecosistemas y pisos altitudinales existentes en el territorio del parque (Ministerio del Ambiente, 2020).

Familia Ericaceae

Es una familia proveniente de los Andes, con gran concentración de especies en las zonas de Colombia y Ecuador, y, por tanto, adaptada a sus ecosistemas caracterizados por ser montañosos, húmedos y templados (Suárez-Ballesteros, Calderón-Hernández, & Mancipe-Murillo, 2018). Las especies de esta familia son principalmente arbustos o hierbas sufrutescentes. Se caracterizan por tener hojas alternas, opuestas, simples, normalmente coriáceas y persistentes; flores bisexuales,

actinomorfas o con tendencia a la zigomorfia que producen frutos comúnmente capsula o baya, se distribuyen en zonas templadas de ambos hemisferios y en los trópicos en elevaciones altas (Montiel, 1980).

En el territorio ecuatoriano esta familia está representada por aproximadamente 230 especies de las cuales se cree que 131 son endémicas y pertenecen a 17 géneros entre los cuales tenemos *Cerastoterna*, *Psammisia*, *Disterigma*, *Gaultheria*, *Pernettya* (Luteyn, 2021).

***Pernettya prostrata* (Cav.) DC.**

Descripción: Es un arbusto prostrado, erecto, de hojas alternas con pecíolo canaliculado de 1 a 4 mm de longitud. Presenta inflorescencias solitarias con ocho a diez estambres. Su fruto es una baya violeta, casi negra de forma subglobosa.

Usos: Sus frutos son usados en alimentación (en pequeñas cantidades) y sus hojas como forraje (Romoleroux et al., 2019).

Figura 1

Especie Pernettya prostrata perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.



***Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude**

Descripción: Es un arbusto pequeño, con hojas verticiladas simples de máximo 1.5 mm de longitud, lanceoladas, con inflorescencias axilares de seis flores, ocho estambres. Los frutos son de color violeta.

Usos: El fruto se usa como alimento para aves. Sus hojas en infusión pueden servir como purgante y relajante (Romoleroux, Cárate-Tandalla, Erlar, & Navarrete, 2019).

Figura 2

Especie Disterigma empetrifolium perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.



Familia Rubiaceae

Es una de las familias más representativas dentro de las angiospermas, con flores bisexuales, con diversas formas de inflorescencias, cuatro a cinco estambres. Hojas opuestas, simples; estípulas interpeciolares, persistentes o cadúcas. Fruto una drupa, baya o cápsula. En esta familia se encuentran árboles, arbustos, hierbas y lianas (Xu & Chang, 2017). Consta de unos 600 géneros con más de 10 000 especies, de distribución cosmopolita, aunque concentrada en zonas tropicales. Los estudios realizados en Ecuador en la década de los 30, reportan unos 45 géneros y 178

especies, pero se cree que estos números se han duplicado. Alrededor de 14 géneros nativos de esta familia se concentran en la zona Andina (Andersson & Taylor, 1994).

Nertera granadensis (Mutis ex L. f.) Druce

Descripción: Es una hierba postrada con hojas opuestas simples de 0.6 a 7 mm de longitud. Presenta flores solitarias, bisexuales con cuatro estambres. Su fruto es de color naranja en forma de drupa globosa. Propia de páramos nativos y selvas húmedas adaptada hasta altitudes de 3400m y distribuida en diversos países de América latina y Oceanía.

Usos: Infusiones para propósitos medicinales (Romoleroux, Cárate-Tandalla, Eler, & Navarrete, 2019).

Figura 3

Especie Nertera granadensis perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.



Galium hypocarpium (L.) Endl. ex Griseb.

Es una hierba escandente, con hojas agrupadas de a cuatro por nudo de hasta 11 mm. Sus inflorescencias son axilares o terminales, con flores bisexuales, con lóbulos ovados y de cuatro a cinco estambres. El fruto es de color anaranjado pálido con

pequeños pelos. Esta especie se encuentra comúnmente en bosques mesófilos y de coníferas. Altamente distribuido en América desde México hasta Argentina.

Usos: Se usa como alimento y como colorante, se lo conoce como achotillo o sachá achiote en algunas regiones. Las personas locales usan la infusión de sus hojas para curar el espanto de los niños (Romoleroux, Cárate-Tandalla, Eler, & Navarrete, 2019).

Figura 4

Especie Galium hypocarpium perteneciente al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.



Estrategias para la Conservación de Especies Vegetales

Conservación de germoplasma

Según la Décima Conferencia de las Partes sobre el Convenio sobre la Diversidad Biológica (COP-10), la restauración ecológica es una oportunidad para lograr objetivos de conservación globales. De hecho, esta misma comisión estima que casi dos tercios de los ecosistemas del mundo han sido degradados, haciendo de la restauración un interés global que crece en términos de inversión económica (Nelleman & Corcoran, 2010).

Debido a esta misma degradación del ecosistema, ha aumentado considerablemente el riesgo de extinción de múltiples especies vegetales, por lo que se busca la aplicación de técnicas biotecnológicas para la preservación de recursos genéticos. Esta técnica denominada conservación de germoplasma es considerada una de las mejores opciones para el mantenimiento del ecosistema y la biodiversidad, asegurando la supervivencia de múltiples especies amenazadas (Quazi, Golani, & Martino, 2021).

El germoplasma proporciona conocimientos sobre la composición genética de una especie y es fundamental para la diversidad biológica. Es menester comprender la biología de regeneración básica para regenerar plantas y menguar la posibilidad de inestabilidad genética (Priyanka, Kumar, Dhaliwal, & Kaushik, 2021). Las estrategias de conservación pueden realizarse *In situ* o *Ex situ*. Las metodologías *Ex situ* son aplicadas como su nombre lo indica, fuera de los hábitats naturales en condiciones controladas, aquí se incluyen a los bancos de semillas, los cuales son mantenidos y producidos por institutos de investigación y universidades (Quazi, Golani, & Martino, 2021).

Bancos de semillas

Este es un enfoque sencillo, rentable y se espera que sea fundamental en la preservación y restauración de la biodiversidad. Involucra la gestión eficiente de las colecciones de semillas para que sean aprovechables. El Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos (GCDT) desempeña un papel clave en la mejora de las técnicas de conservación *ex situ* y la gestión de la diversidad mundial de cultivos (Priyanka, Kumar, Dhaliwal, & Kaushik, 2021).

El concepto de banco de semillas para la restauración de ecosistemas nace por la necesidad de plantear estrategias de conservación que puedan ser aplicadas *ex situ*

y en terrenos a gran escala. Los bancos de semillas hacen uso del germoplasma con base científica para la restauración, mediante el cultivo de semillas, capacitación y divulgación además de la vinculación de la comunidad e industria; con el objetivo de aprovechar el conocimiento tradicional para el desarrollo de alimentos o medicinas (Merritt & Dixon, 2011).

El almacenamiento de semillas es una solución a corto plazo y barata ante las pérdidas producidas por talas, embalses de agua, insectos, enfermedades. El almacenamiento a largo plazo es factible para algunas especies si se mejorara la tecnología de almacenamiento, y esto sería un gran avance en la lucha contra la deforestación tropical (Bonner, 1990).

Además de la semilla en sí, se debe considerar la fuente, disponibilidad, manejo y uso efectivo de las mismas. Satisfaciendo estas carencias se debe investigar la fenología del desarrollo y maduración de semillas silvestres, factores espaciales y temporales, y las condiciones de almacenamiento en ambientes muy fluctuantes. El ignorar esto, podría ocasionar que la germinación no se dé cuando se quiera sembrar las semillas (Merritt & Dixon, 2011).

Para poder aplicar la metodología de bancos de semillas se utilizan técnicas de cultivo de tejido, para lo cual, primero se deben establecer protocolos exactos y correctamente documentados para el establecimiento de las especies deseadas. Estos protocolos deben comenzar con la investigación de las condiciones adecuadas a las cuales crecen las semillas, además de los análisis morfológicos y de viabilidad pertinentes (Quazi, Golani, & Martino, 2021).

Test de Viabilidad

La prueba de germinación es el mejor indicador del potencial de un lote de semillas para emerger en condiciones de campo; el problema es el tiempo que toma hacer esta prueba, que puede llegar a ser meses. La prueba de tetrazolio o TZ puede generar estimaciones rápidas de la germinación de las semillas, resultando útil para procesamiento y almacenamiento de grandes cantidades de semillas en tiempos reducidos, y para determinar el vigor de estas y diagnosticar posibles causas de deterioro (Patil & Dadlani, 2009).

Germinación de Semillas

Posterior al análisis de viabilidad de las semillas, se estudia su germinación, la cual se estima desde el momento en que se observa el rompimiento de la cubierta de la semilla y brote de la radícula. Como indicador, se introduce el porcentaje de germinación que mide la eficacia de este proceso y se analizan las variables que influyen en el proceso, las cuales son: la temperatura; tiempo; almacenamiento en seco; luz; hormonas y- desinfección de semillas (Deno, 1993)

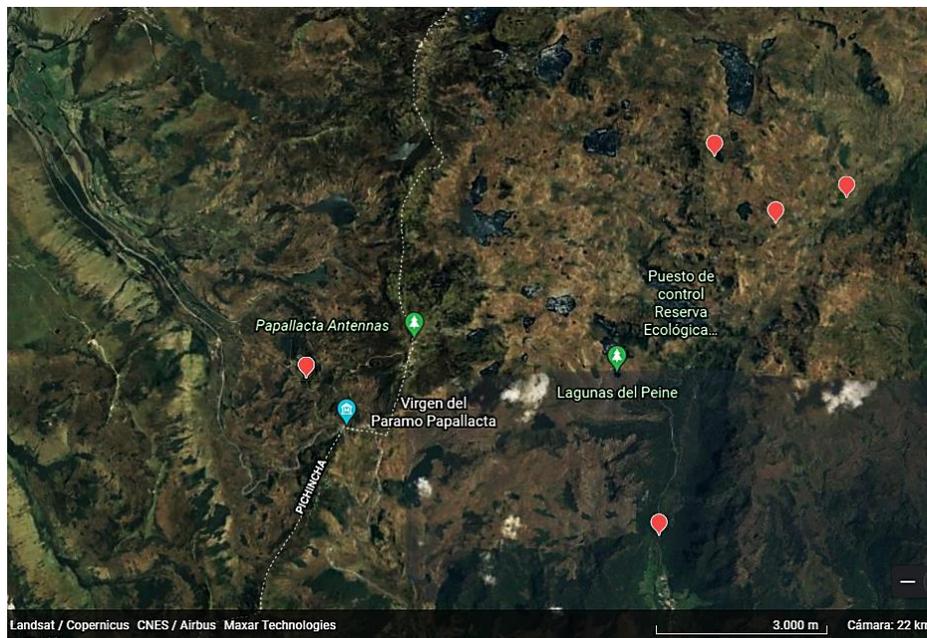
Capítulo III: Metodología

Ubicación del trabajo de investigación y área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del Instituto Nacional de Biodiversidad – INABIO que colabora con el proyecto BIO-GEEC: Consorcio alemán – ecuatoriano sobre biodiversidad – Quito. Las muestras de las especies fueron recolectadas en cinco parcelas previamente delimitadas (**Figura 5**) del Parque Nacional Cayambe – Coca, las cuales son: parche de Polylepis (819056, 9966764); laguna (818733, 9968756); ladera (820350, 9967260); ingreso (817135, 9961126); la virgen (810731, 9964073).

Figura 5

*Puntos de estudio; en color rojo las cinco coordenadas pertenecientes al **Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.***



Fase de Campo

Recolección del Material Vegetal

Durante los meses de noviembre del 2020 a septiembre del 2021, se colectó el material vegetal del Parque Nacional Cayambe – Coca. Se cosecharon frutos maduros, es decir, aquellos que presentaron una coloración apropiada e indicadores de madurez fisiológica. Se recogió en tubos Falcon de 50 mL para su conservación y análisis morfológico. Después, se procesó la muestra y se extrajeron semillas. Posteriormente, las semillas fueron almacenadas hasta su uso. A cada muestra se asignó un código de accesión (recolección), fotografías y fichas de campo descriptivas.

Fase de Laboratorio

Procesamiento y Almacén de Muestras Vegetales

Muestras de frutos

Las muestras colectadas para morfología en tubos Falcon de 50 ml conservaron sus estructuras en refrigeración durante dos o tres días hasta ser trasladadas al laboratorio. Posteriormente, se lavaron los frutos con agua corriente hasta quitar las impurezas y con agua destilada se realizaron tres lavados y se secó para realizar el análisis morfológico: medida del diámetro.

Muestras de semillas

A partir de los frutos se extrajeron las semillas, realizando un corte superficial a los frutos, con precaución para evitar dañar las muestras de semillas y se procedió a lavar tres veces con agua destilada. Se las colocó sobre papel filtro para ser secadas y se realizó sus correspondientes ensayos: se contó el número de semillas por fruto en 50 frutos; se realizó el análisis morfológico. Se realizó el secado en papel filtro durante 3 días, una vez secas se almacenaron en tubos Eppendorf a 4 °C en oscuridad (Vargas Ríos & Pérez-Martínez, 2014).

Análisis Morfológico del Fruto y Semilla

Para el análisis morfológico se consideraron las siguientes características: estructura, tamaño y peso. Para la estructura se utilizaron 100 semillas de las cuales se tomó fotografías en el estereomicroscopio con el programa MShot Image para determinar la forma, color y tamaño de la semilla, y se midió el largo y ancho. Para determinar el peso se utilizó 10 lotes de 100 semillas y se pesó en una balanza de precisión para las especies.

Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ)

Los tratamientos se aplicaron en 100 semillas. Se sumergieron en agua durante 24 horas. Para la prueba se efectuó un corte longitudinal en las especies de la familia *Rubiaceae*, mientras que se hizo un corte basal en las especies *Ericaceae* (Mancipe-Murillo, Calderón-Hernández, & Pérez-Martínez, 2018). Se utilizó tetrazolio a concentración general de 1% a 30 °C en oscuridad durante 24 horas y durante la evaluación se registró el número de semillas viables y no viables (Hernández P, Lobo A, Medina C, Cartagena V, & Delgado P, 2009).

Desinfección de Semillas

Este ensayo se realizó en la cámara de flujo laminar, para lo cual, las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada. Luego se aplicó alcohol etílico al 70% durante 1 minuto y se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril. Posteriormente se colocó en tres concentraciones de hipoclorito de sodio NaClO (1, 2 y 3%), en tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min), se lavó tres veces con agua estéril previo a la siembra y un tratamiento control. Para las especies de *Ericaceae* se sembró 20 semillas, mientras que para las especies de *Rubiaceae* se sembró 15 semillas por caja Petri en medio agar 1% a temperatura ambiente selladas con Parafilm y se realizó tres repeticiones por tratamiento (GENMEDOC, 2008), (Vargas Ríos & Pérez-Martínez, 2014) En la Tabla 1 se detallan los tratamientos que fueron probados.

Tabla 1

Tratamientos empleados en la desinfección de semillas de las especies de estudio

Tratamiento	Condiciones
TD0	Control

Tratamiento	Condiciones
TD1	1% NaClO – 5 min
TD2	1% NaClO – 10 min
TD3	1% NaClO – 15 min
TD4	2% NaClO – 5 min
TD5	2% NaClO – 10 min
TD6	2% NaClO – 15 min
TD7	3% NaClO – 5 min
TD8	3% NaClO – 10 min
TD9	3% NaClO – 15 min

Nota: tratamiento de desinfección

Germinación in vitro

Se evaluaron once tratamientos con diferentes temperaturas, a distintos fotoperiodos, y concentraciones de ácido giberélico (Tabla 2).

En cámara de flujo laminar se sembraron 20 semillas de Ericaceae y 15 semillas de Rubiaceae por caja Petri en medio agar al 1% y fueron selladas con Parafilm. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento. Se contó las semillas germinadas dos veces por semana durante dos meses. Las semillas cuya radícula está expuesta se denomina como germinada.

Tratamientos de Temperatura

Se probaron tres temperaturas: 5 °C baja, 15 °C media y 25 °C alta en incubadora con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, el control a temperatura ambiente.

Tratamientos de Luz

Se analizó dos tratamientos: un tratamiento con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad; y otro tratamiento en completa oscuridad, para el cual las cajas Petri se cubrieron con papel aluminio. La luz fue proporcionada por luminaria LED de 6W con temperatura de color de 6500K que corresponde a luz blanca.

Ácido Giberélico AG₃

Se evaluaron tres concentraciones (50,100 y 200 mg/L) de ácido giberélico, colocándolo directamente en el medio de cultivo y el control sin ácido giberélico. Este ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente y periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Tabla 2

Tratamientos para la germinación in vitro

Tratamiento	Condiciones
TG1	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad
TG2	Temperatura ambiente; oscuridad total
TG3	5 °C;12 horas luz / 12 oscuridad
TG4	5 °C; oscuridad total
TG5	15 °C;12 horas luz / 12 oscuridad
TG6	15 °C; oscuridad total
TG7	25 °C;12 horas luz / 12 oscuridad
TG8	25 °C; oscuridad total
TG9	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 50 mg/L AG ₃
TG10	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 100 mg/L AG ₃
TG11	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 200 mg/L AG ₃

TG: tratamiento de germinación

Variables

Las variables que fueron estudiadas se detallan a continuación con su respectiva fórmula.

Porcentaje de viabilidad:

$$V = \frac{V_n}{N} \times 100$$

Donde,

- V_n número de semillas viables
- N número total de semillas

Porcentaje de contaminación (PC):

$$PC = \frac{C_n}{N} \times 100$$

Donde,

- C_n El número de semillas contaminadas
- N número total de semillas

Porcentaje de germinación fisiológica (PGF):

$$PGF = \frac{C_n}{N} \times 100$$

Donde,

- C_n El número de semillas germinadas
- N número total de semillas

Análisis estadístico de los datos

En el presente estudio se realizaron dos tipos de análisis. El primero corresponde a un análisis de estadística descriptiva de los rasgos de historia de vida

reproductivos; tamaño, peso y viabilidad de las semillas y el segundo, constituido por el análisis estadístico de la germinación *in vitro* se realizaron en etapas: desinfección, temperatura, luz, y ácido giberélico.

Posteriormente, se realizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk para determinar si los datos siguen una distribución normal. A continuación, para los datos que seguían una distribución normal, se aplicó un análisis de varianza ANOVA y una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en caso de que no se cumpla esta distribución normal. Por último, para la comparación de las medias de los resultados obtenidos se realizó el Test de Duncan ($p < 0,05$). Todo este procedimiento se aplicó en el paquete estadístico R versión 4.1.2.

Capítulo IV: Resultados

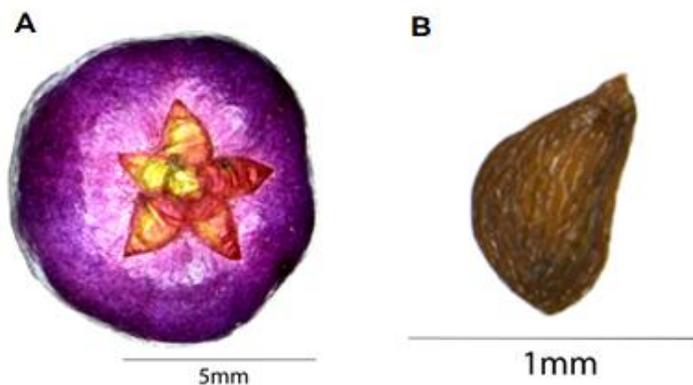
Análisis Morfológico del Fruto y Semilla

En la especie *Pernettya prostrata*, el fruto es en baya subglobosa de color violeta, su longitud en promedio es 8,2340 mm de diámetro, Figura 6. Poseen entre 53 y 296 semillas por fruto. El peso promedio de 100 semillas es de 4,4760 mg, Figura 11.

Semillas elipsoide, reticuladas, embrión axial enano y testa dura. Color pardo claro y oscuro. El tamaño de la semilla, en promedio de una muestra de 100 semillas midió de largo 0,7530 mm y ancho 0,4923 mm, Figura 12

Figura 6

Vista estereoscópica de fruto y semilla de Pernettya prostrata. A) Vista frontal del fruto, B) Semilla

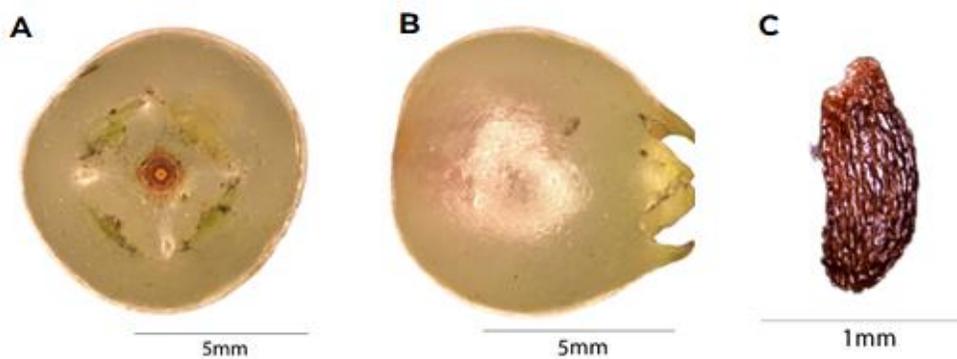


En la especie *Disterigma empetrifolium*, el fruto es en baya esférica de color blanco translúcido, su longitud en promedio es 8,1701 mm de diámetro, Figura 7. Poseen entre 2 y 194 semillas por fruto. El peso promedio de 100 semillas es de 16,9770 mg, Figura 11.

Semillas elipsoide, reticuladas, embrión axial enano y testa dura. Color pardo claro y oscuro. El tamaño de la semilla, en promedio de una muestra de 100 semillas midió de largo 1,2014 mm y ancho 0,6934 mm, Figura 12

Figura 7

Vista estereoscópica de fruto y semilla de *Disterigma empetrifolium*. A) Vista frontal del fruto, B) Vista lateral del fruto, C) Semilla



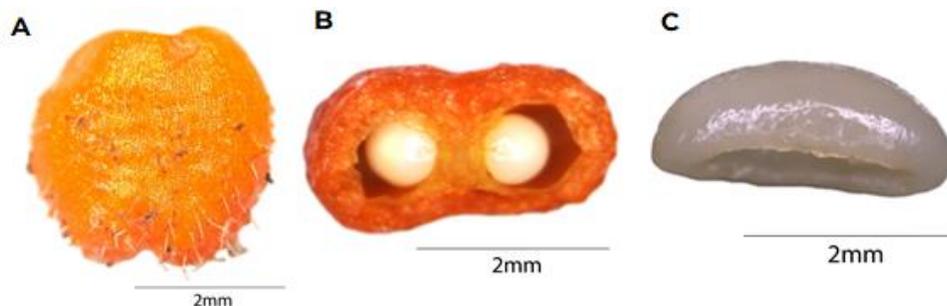
La especie *Galium hypocarpium*, el fruto es en baya pubescente de color anaranjada, su longitud en promedio es 3,0812 mm de diámetro, Figura 8.

Poseen entre 1 y 2 semillas por fruto. El peso promedio de 100 semillas es de 157,8550 mg, Figura 11.

Semillas reniformes, dorsalmente convexas y testa membranosa; embrión axial foliado espatulado. El tamaño de la semilla, en promedio de una muestra de 100 semillas midió de largo 2,6605 mm y ancho 1,3274 mm, Figura 12.

Figura 8

Vista estereoscópica de fruto y semilla de *Galium hypocarpium*. A) Vista lateral, B) Corte transversal, C) Semilla.



La especie *Nertera granadensis*, el fruto es en drupa globosa glabro de color anaranjado a rojo, su longitud en promedio es 3,0059 mm de diámetro, Figura 9

Poseen entre 2 semillas por fruto. El peso promedio de 100 semillas es de 85,9500 mg, Figura 11.

Semillas elíptico-oblongas obtusas a los extremos, embrión axial foliado espatulado. El tamaño de la semilla, en promedio de una muestra de 100 semillas midió de largo 2,2538 mm y ancho 1,3418 mm,

Figura 12.

Figura 9

Vista estereoscópica de fruto y semilla de *Nertera granadensis*. A) Vista Frontal, B) Vista trasera, C) Vista lateral con hojas, D) Semilla

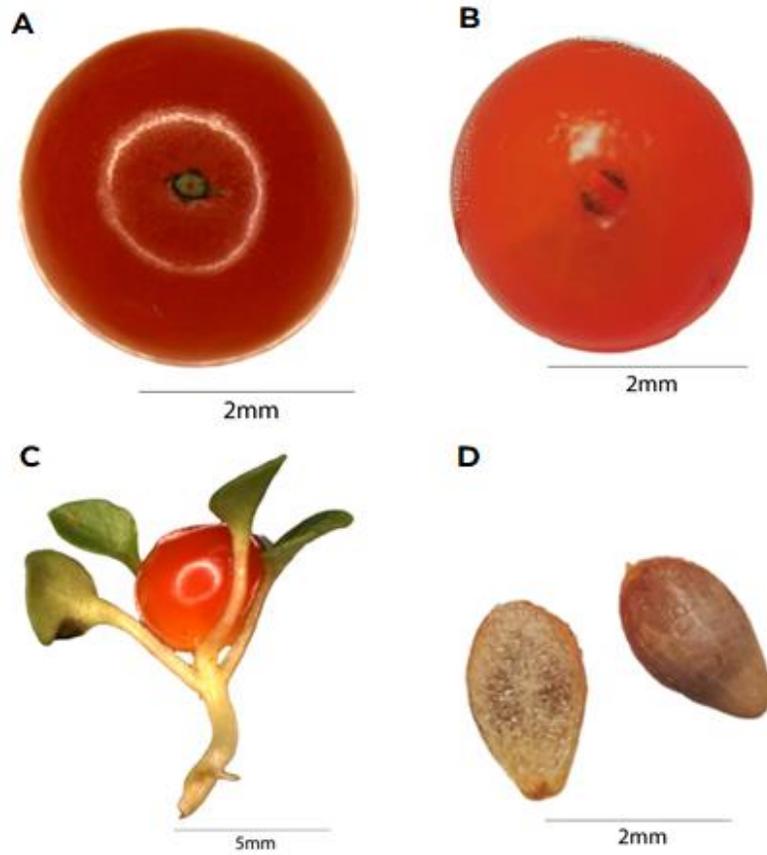


Figura 10

Longitud del fruto, diámetro de las cuatro especies; Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)

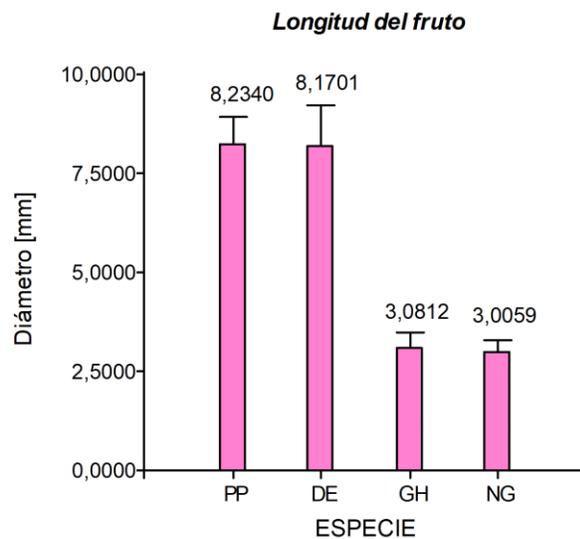


Figura 11

Peso promedio de 100 semillas de las cuatro especies; Pernettya prostrata (PP); Disterigma empetrifolium (DE); Galium hypocarpium (GH); Nertera granadensis (NG)

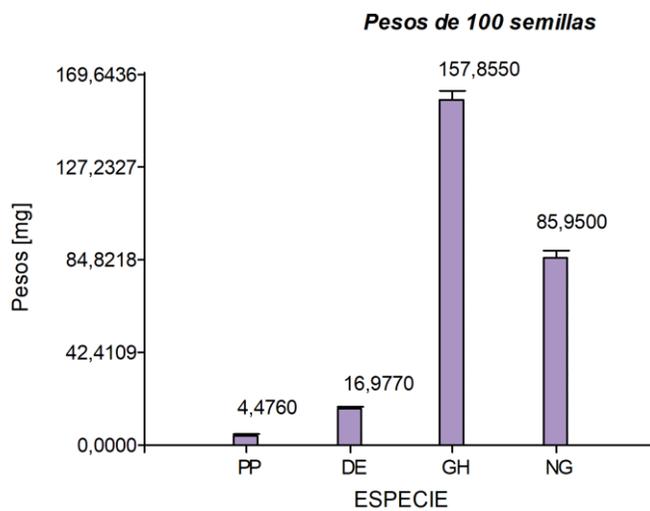
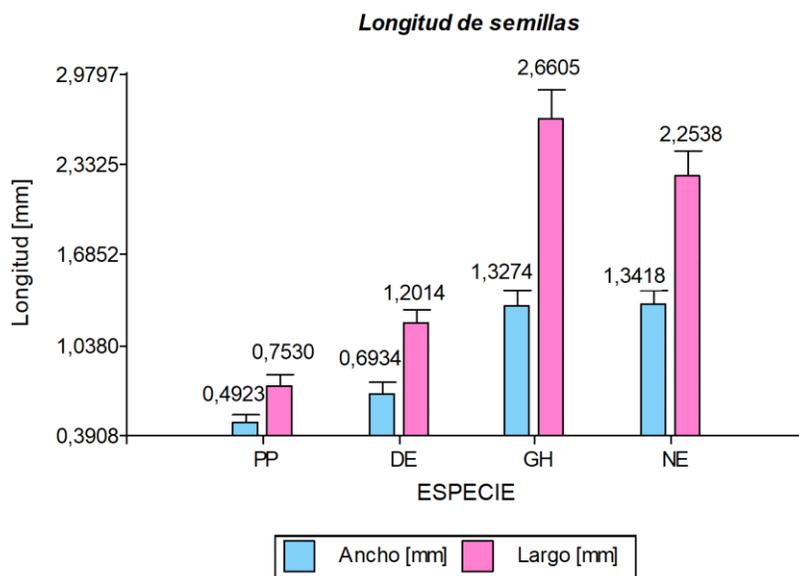


Figura 12

Tamaño de la semilla, largo (rosado) y ancho (celeste) de las cuatro especies; *Pernettya prostrata* (PP); *Disterigma empetrifolium* (DE); *Galium hypocarpium* (GH); *Nertera granadensis* (NG).

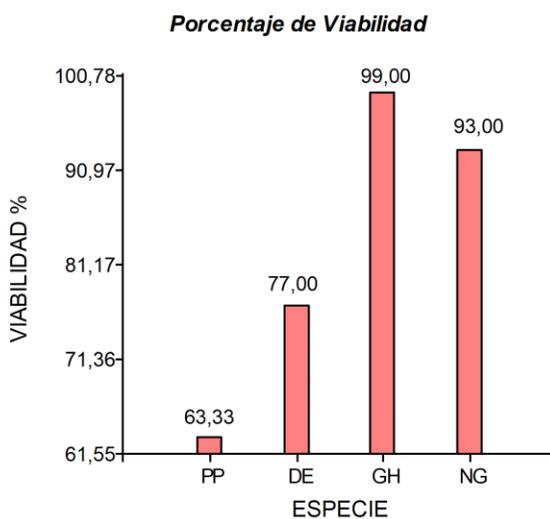


Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ)

Se obtuvo el porcentaje de viabilidad por medio de la prueba de tetrazolio de una muestra de 100 semillas por especie Figura 13. Para las especies de la familia Ericaceae se obtuvo el 63.33% de semillas viables en *P. prostrata* Figura 14 y el 77% de semillas viables en *D. empetrifolium* Figura 15. Las especies de la familia Rubiaceae obtuvieron alcanzaron valores del 99% de semillas viables en *G. hypocarpium* Figura 16 y del 93% de semillas viables en *N. granadensis* Figura 17. Como se observa en la Figura 13. El total de las muestras que se utilizaron en esta prueba para cada una de las especies se observaron en embriones y mostraron coloración completa de dicha estructura.

Figura 13

Porcentaje de viabilidad de las cuatro especies: *Pernettya prostrata* (PP); *Disterigma empetrifolium* (DE); *Galium hypocarpium* (GH); *Nertera granadensis* (NG).

**Figura 14**

Prueba de viabilidad en embriones de *Pernettya prostrata*. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja.

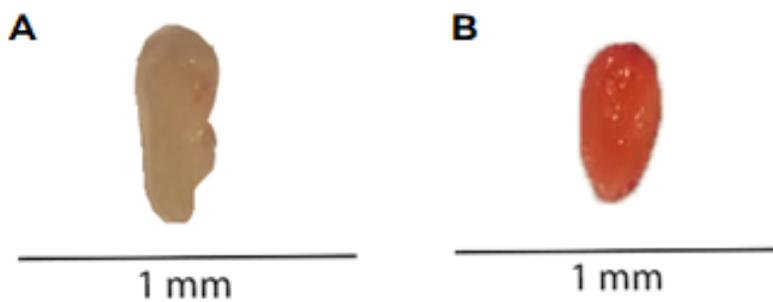
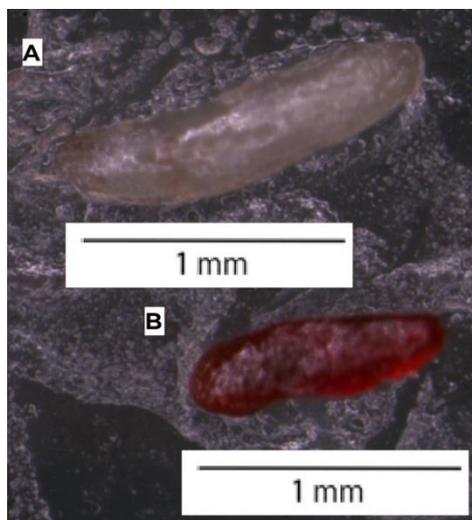


Figura 15

Prueba de viabilidad en embriones de *Disterigma empetrifolium*. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja.

**Figura 16**

Prueba de viabilidad en embriones de *Galium hypocarpium*. A) Embrión no viable sin coloración, B) Embrión viable con coloración roja.

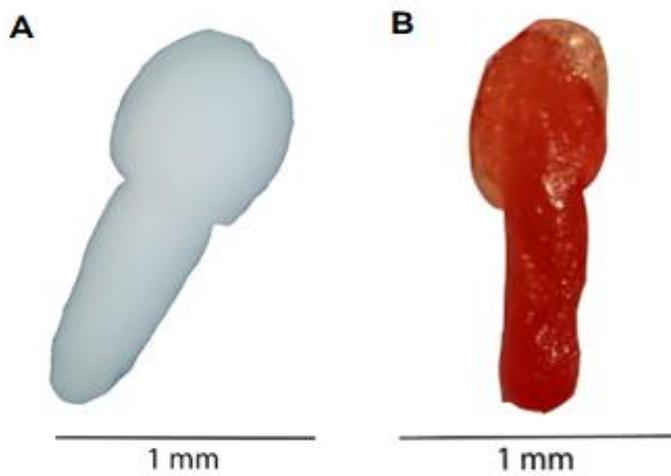
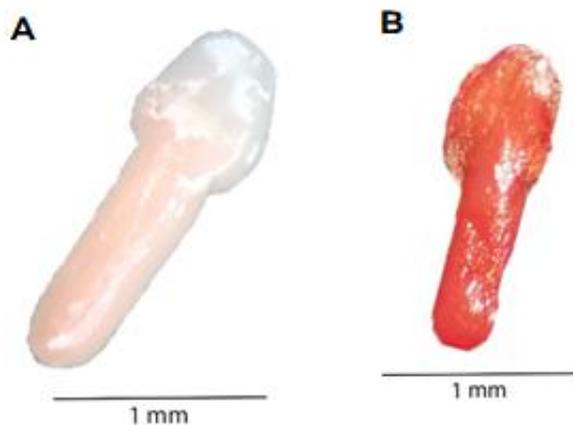


Figura 17

Prueba de viabilidad en embriones rojo no viable, blanco viable. Nertera granadensis

***Desinfección de Semillas***

Los porcentajes de contaminación para las cuatro especies que formaron parte del estudio los tratamientos de control TD0 presentaron los valores más altos correspondientes al 13,3% para *P. prostrata*, 100% en *D. empetrifolium*, 22,2% *N. granadensis* y 42,2% de *G. hypocarpium*. Al aplicar los diferentes tratamientos de desinfección que diferían en la concentración de hipoclorito y el tiempo de aplicación se observó la disminución del porcentaje de contaminación, haciendo efectiva la desinfección en cada una de las especies

Para los tratamientos de desinfección de *D. empetrifolium*, la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, muestra que estos no siguen una distribución normal ($p=5.51e-10$), además, del análisis Kruskal-Wallis se concluye que como $p=0.0006663$ por lo que las medias de los tratamientos son diferentes. Resultante de esto, todos los tratamientos mostraron menor porcentaje de contaminación en contraste con el tratamiento control Tabla 3 y Figura 18.

Tabla 3.

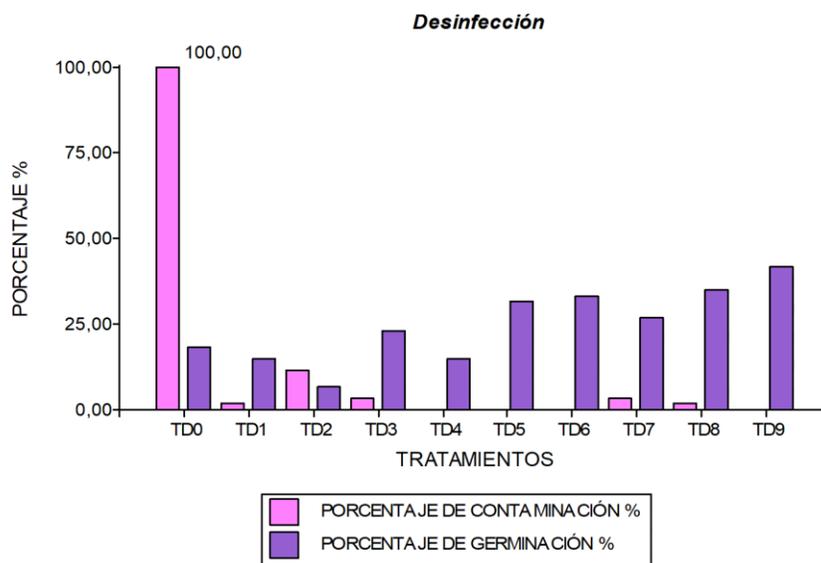
Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de D. empetrifolium

Especie	Tratamiento	Condiciones		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
		NaClO (%)	Tiempo (min)		
<i>D. empetrifolium</i>	TD0	0	0	100 a	18,3
	TD1	1	5	1,7 b	15,0
	TD2	1	10	11,7 b	6,7
	TD3	1	15	3,3 b	23,3
	TD4	2	5	0 b	15,0
	TD5	2	10	0 b	31,7
	TD6	2	15	0 b	33,3
	TD7	3	5	3,3 b	26,7
	TD8	3	10	1,7 b	35,0
	TD9	3	15	0 b	41,7

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 18

Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Disterigma empetrifolium



Los tratamientos de desinfección de *P. prostrata* no muestran una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk, con $p=5.5e-10$ respectivamente. Asimismo, la prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.0006663$) sugiere que entre los tratamientos de desinfección existe una diferencia significativa principalmente debido a que en el control existe contaminación y los tratamientos de desinfección utilizados no tienen contaminación, por lo que se considera que son efectivos Tabla 4 y Figura 19.

Tabla 4

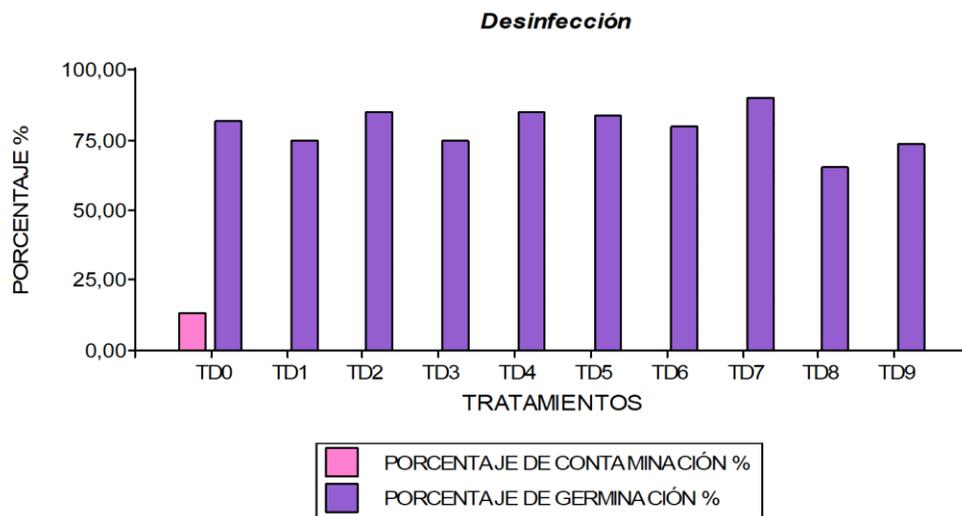
Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de P. prostrata

Especie	Tratamiento	Condiciones		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
		NaClO (%)	Tiempo (min)		
<i>P. prostrata</i>	TD0	0	0	13,3 a	81,7
	TD1	1	5	0,0 b	75,0
	TD2	1	10	0,0 b	85,0
	TD3	1	15	0,0 b	75,0
	TD4	2	5	0,0 b	85,0
	TD5	2	10	0,0 b	83,3
	TD6	2	15	0,0 b	80,0
	TD7	3	5	0,0 b	90,0
	TD8	3	10	0,0 b	65,0
	TD9	3	15	0,0 b	73,3

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 19

Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de *Pernettya prostrata*



Los tratamientos de desinfección de *N. granadensis* tampoco muestran una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk, con $p=0.01489$. Además, la prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.008091$) apunta a que los tratamientos si presentan diferencias significativas entre medias, observándose la disminución del porcentaje de contaminación al aplicar los tratamientos de desinfección en relación con el control Tabla 5 y Figura 20.

Tabla 5

Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de *N. granadensis*.

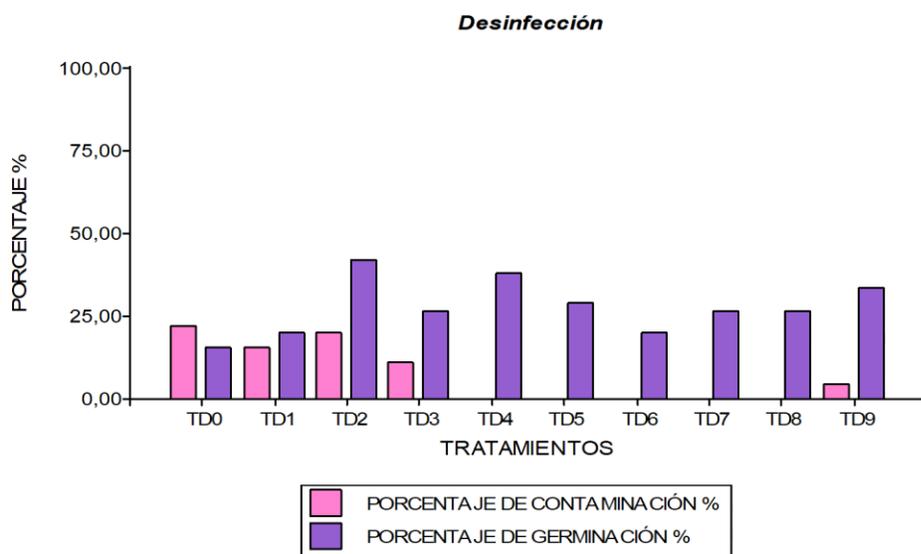
Especie	Tratamiento	Condiciones		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
		NaClO (%)	Tiempo (min)		
<i>N. granadensis</i>	TD0	0	0	22,2 a	15,6
	TD1	1	5	15,6 abc	20,0
	TD2	1	10	20,0 ab	42,2
	TD3	1	15	11,1 abc	26,7
	TD4	2	5	0,0 c	37,8
	TD5	2	10	0,0 c	28,9

Especie	Tratamiento	Condiciones		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
		NaClO (%)	Tiempo (min)		
	TD6	2	15	0,0 c	20,0
	TD7	3	5	0,0 c	26,7
	TD8	3	10	0,0 c	26,7
	TD9	3	15	4,4 bc	33,3

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 20

Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de *Nertera granadensis*



Lo mismo ocurre con *G. hypocarpium*, al no seguir una distribución normal según la prueba Shapiro-Wilk ($p=4.45e-10$), y la diferencia de medias, analizada según Kruskal-Wallis ($p=0.0006724$) existe diferencias, ya que en el control existe un porcentaje considerable de contaminación y en los tratamientos con hipoclorito no existe contaminación Tabla 6 y Figura 21.

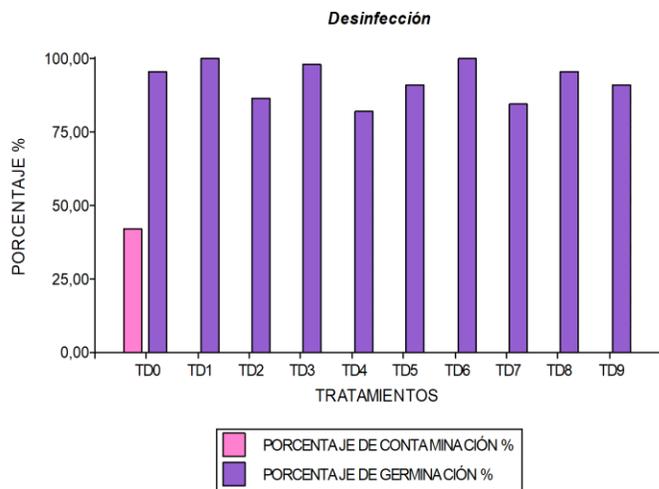
Tabla 6*Efecto de los tratamientos en la desinfección de semillas de G. hypocarpium*

Especie	Tratamiento	condiciones		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
		NaClO (%)	Tiempo (min)		
<i>G. hypocarpium</i>	TD0	0	0	42,2 a	95,6
	TD1	1	5	0,0 b	100,0
	TD2	1	10	0,0 b	86,7
	TD3	1	15	0,0 b	97,8
	TD4	2	5	0,0 b	82,2
	TD5	2	10	0,0 b	91,1
	TD6	2	15	0,0 b	100,0
	TD7	3	5	0,0 b	84,4
	TD8	3	10	0,0 b	95,6
	TD9	3	15	0,0 b	91,1

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 21

Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de Galium hypocarpium



Germinación in vitro

El rango de la temperatura ambiental en los tratamientos TG1 y TG2 fue de 15.6-21.7 °C. para el estudio de luz y temperatura. Mientras que en los tratamientos TG9, TG10 Y TG11 fue de 15.4-20.9 °C.

En la especie de *P. prostrata*, la prueba estadística Shapiro-Wilk muestra una distribución normal con $p=0.2489$ y la prueba Anova sugiere que no hay diferencia de medias ($p=0.3314$) por lo que se considera que los distintos tratamientos no afectan los porcentajes de germinación de manera significativa. El tratamiento que resulta en más porcentaje de germinación en este caso sucede a una temperatura de 5° C y con oscuridad total.

Tabla 7

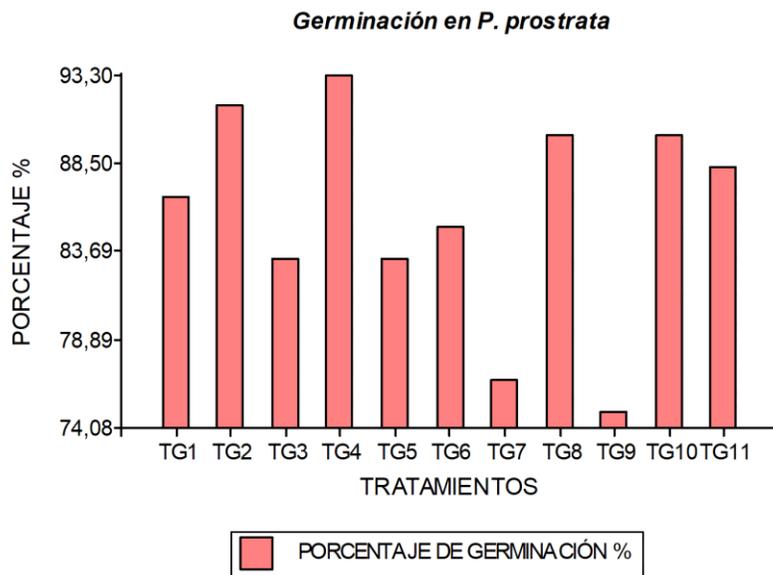
Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de P. prostrata

Especie	Tratamiento	Temperatura (°C)	Luz (horas)	AG ₃ (mg/L)	Índice de latencia (d)	Porcentaje de germinación fisiológica (%)
<i>P. prostrata</i>	TG1	Ambiente	12	-	15	86,7 ab
	TG2	Ambiente	0	-	26	91,7 ab
	TG3	5	12	-	59	83,3 ab
	TG4	5	0	-	61	93,3 a
	TG5	15	12	-	14	83,3 ab
	TG6	15	0	-	16	85,0 ab
	TG7	25	12	-	10	76,7 ab
	TG8	25	0	-	18	90,0 ab
	TG9	Ambiente	12	50	14	75,0 b
	TG10	Ambiente	12	100	12	90,0 ab
	TG11	Ambiente	12	200	13	88,3 ab

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 22

Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de *Pernettya prostrata*

**Figura 23**

Germinación *in vitro* de *Pernettya prostrata* a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias.



Hablando de germinación, para *D. empetrifolium*, al haber resultado un $p=0.1289$ en el test Shapiro-Wilk, se tiene una distribución normal. El test Anova establece que

existe diferencia significativa en las medias ($p=0.0003523$) por lo que las combinaciones planteadas de temperatura, luz y ácido giberélico afecta significativamente los porcentajes de germinación. El test de Duncan establece que los mejores resultados de germinación se dieron con los tratamientos de temperatura ambiente, con 12 horas luz y 12 en oscuridad, y a temperatura ambiente en oscuridad.

Tabla 8

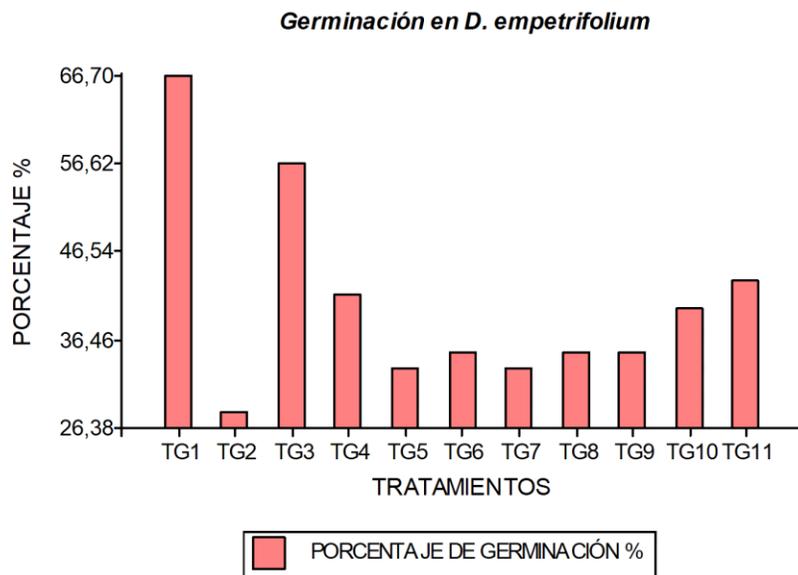
Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de D. empetrifolium

Especie	Tratamiento	Temperatura (°C)	Luz (horas)	AG ₃ (mg/L)	Índice de latencia (d)	Porcentaje de germinación fisiológica (%)
<i>D. empetrifolium</i>	TG1	Ambiente	12	-	17	66,7 a
	TG2	Ambiente	0	-	42	28,3 c
	TG3	5	12	-	68	56,7 ab
	TG4	5	0	-	72	41,7 c
	TG5	15	12	-	20	33,3 c
	TG6	15	0	-	38	35,0 c
	TG7	25	12	-	21	33,3 c
	TG8	25	0	-	28	35,0 c
	TG9	Ambiente	12	50	24	35,0 c
	TG10	Ambiente	12	100	16	40,0 c
	TG11	Ambiente	12	200	24	43,3 bc

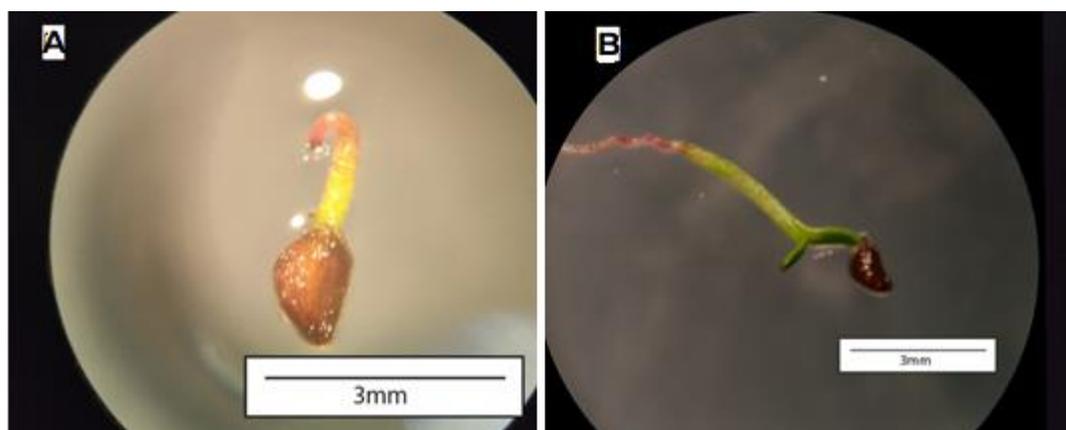
Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 24

Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de *Disterigma empetrifolium*

**Figura 25**

Germinación *in vitro* de *Disterigma empetrifolium* a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias.



En el caso de *G. hypocarpium*, el test Shapiro-Wilk ($p=0.004432$) muestra que la distribución no es normal. La prueba Kruskal-Wallis sin embargo, establece que existe diferencia significativa entre sus medias (0.0007161), por lo que estas condiciones establecidas de temperatura y tiempo de exposición a la luz afectan significativamente

los porcentajes de germinación. El test de Duncan permite determinar que los tratamientos con más porcentaje de germinación fueron a temperatura ambiente, con 12 horas luz y 12 en oscuridad, a temperatura ambiente en oscuridad y a 5° C en oscuridad.

Tabla 9

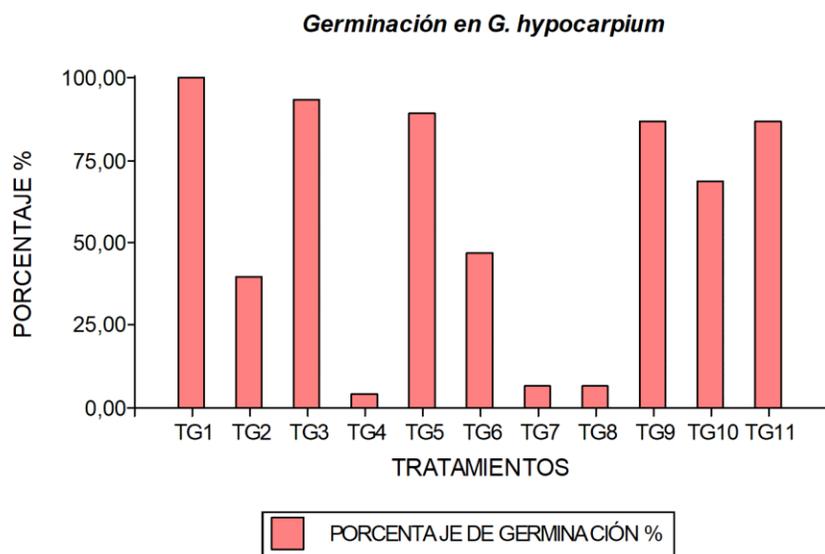
Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de G. hypocarpium.

Especie	Tratamiento	Temperatura (°C)	Luz (horas)	AG ₃ (mg/L)	Índice de latencia (d)	Porcentaje de germinación fisiológica (%)
<i>G. hypocarpium</i>	TG1	Ambiente	12	-	20	100,0 a
	TG2	Ambiente	0	-	14	40,0 d
	TG3	5	12	-	72	93,3 ab
	TG4	5	0	-	74	4,4 e
	TG5	15	12	-	14	88,9 ab
	TG6	15	0	-	27	46,7 d
	TG7	25	12	-	31	6,7 e
	TG8	25	0	-	40	6,7 e
	TG9	Ambiente	12	50	14	86,7 b
	TG10	Ambiente	12	100	16	68,9 c
	TG11	Ambiente	12	200	24	86,7 b

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares.

Figura 26

Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de *Galium hypocarpium*

**Figura 27**

Germinación *in vitro* de *Galium hypocarpium* a partir de semillas. A) emergencia del brote radicular, B) hojas primarias.



De los resultados de la prueba Shapiro-Wilk para *N. granadensis*, se concluye que estos tienen una distribución normal ($p= 0.7703$). Además, sus medias están estadísticamente diferenciadas de acuerdo con la prueba Anova ($p=1.15e-08$), por lo que se determina que las combinaciones de temperatura y luz sí afectan significativamente los porcentajes de germinación de esta especie. Los mejores resultados se obtienen de los tratamientos a temperatura ambiente, con 12 horas luz y 12 en oscuridad, 50 mg/L AG3; a temperatura ambiente, con 12 horas luz y 12 en oscuridad y a 15° C, con 12 horas luz y 12 en oscuridad.

Tabla 10

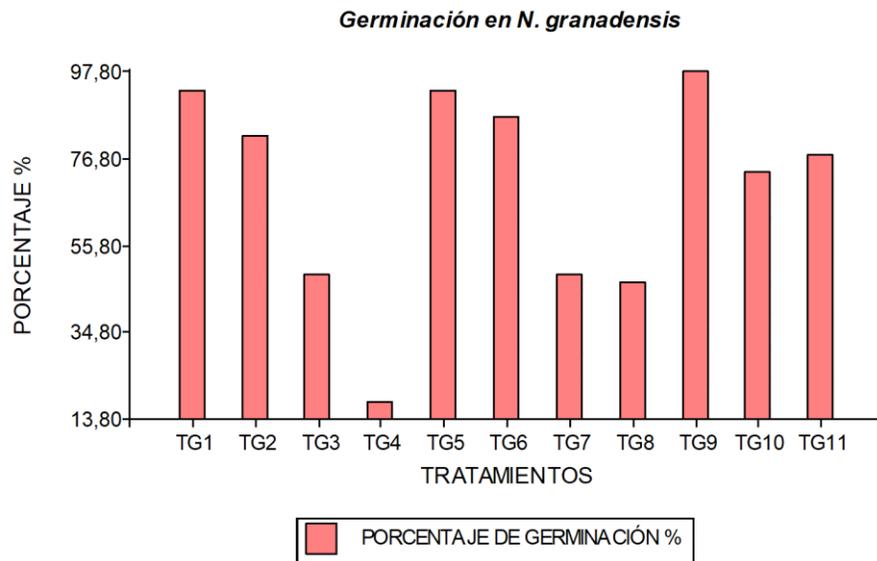
Efecto de diferentes concentraciones de AG₃, temperatura y fotoperiodo en la germinación in vitro de semillas de N. granadensis

Especie	Tratamiento	Temperatura (°C)	Luz (horas)	AG ₃ (mg/L)	Índice de latencia (d)	Porcentaje de germinación fisiológica (%)
<i>N. granadensis</i>	TG1	Ambiente	12	-	9	93,3 ab
	TG2	Ambiente	0	-	12	82,2 abc
	TG3	5	12	-	63	48,9 d
	TG4	5	0	-	65	17,8 e
	TG5	15	12	-	11	93,3 ab
	TG6	15	0	-	11	86,7 abc
	TG7	25	12	-	13	48,9 d
	TG8	25	0	-	10	46,7 d
	TG9	Ambiente	12	50	11	97,8 a
	TG10	Ambiente	12	100	9	73,3 c
	TG11	Ambiente	12	200	9	77,8 bc

Nota: letras minúsculas representan grupos estadísticamente similares

Figura 28

Porcentaje de germinación en los tratamientos de temperatura, luz y ácido giberélico de *Nertera granadensis*

**Figura 29**

Germinación *in vitro* de *Nertera granadensis* a partir de semillas. A) hojas primarias, B) emergencia del brote radicular



Capítulo V: Discusión

Análisis Morfológico del Fruto y Semilla y Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio (TZ)

El páramo andino es reconocido por su única biodiversidad y su gran vulnerabilidad a las amenazas ambientales (Camacho & Peyre, 2022). Además, estos ecosistemas son relevantes ya que proveen de recursos a las poblaciones humanas asentadas en los Andes. Los páramos son suministro de agua para grandes ciudades (Farley, Bremer, Harden, & Hartsig, 2013), almacenadores de carbón y grandes reguladores de agua (Buytaert et al., 2006; Suarez et al., 2022). Estas áreas son consideradas como los ecosistemas de altitud elevada más diversos (Diazgranados & Barber, 2017), y es por esto por lo que hay la necesidad de investigar y generar estrategias de conservación para las especies que mantienen este ecosistema.

En la investigación para la conservación de especies, al ser limitada la bibliografía sobre las múltiples especies vegetales que habitan el páramo, es necesario comenzar desde lo fundamental, recolectando y analizando muestras vegetales para posteriormente estudiar la germinación de las semillas. La germinación *in vitro* contribuye en los procesos de investigación, translocación de especies y proyectos de reintroducción de especies, Estas condiciones hacen indispensable el establecimiento de protocolo específicos de cultivo *in vitro* como un paso inicial para la conservación (Reed, Sarasan, Kane, Bunn, & Pence, 2011).

Dentro de este marco, se ha seleccionado a las semillas como material de inicio ya que estas contienen toda la información genética necesaria para generar una nueva planta (Quazi, Golani, & Martino, 2021). Para empezar con la investigación de semillas se comienza comúnmente con pruebas de viabilidad, mediante las cuales se determina si estas son utilizables después de la recolección o el almacenamiento (Pradhan et al.,

2022). En este estudio los ensayos se llevaron a cabo en dos especies de la familia Ericaceae *P. próstata* y *D. empetrifolium* y dos especies de la familia Rubiaceae *N. granadensis* y *G. hypocarpium*.

Normalmente, las semillas pertenecientes a la familia *Ericaceae* se observan dentro de frutos pequeños, de colores brillantes, carnosos y fácilmente accesibles; además en estas frutas podemos encontrar a una gran cantidad de semillas, las cuales gracias a su pequeño tamaño pueden ser dispersadas fácilmente con la ayuda de la fauna local, principalmente aves, que se ven atraídas por las frutas para su alimentación (Ayala-Cordero et al., 2004; Castor, 2002). Las observaciones realizadas de los frutos confirman lo anterior ya que para las especies *P. próstata* y *D. empetrifolium* los frutos tenían una media de 8mm de diámetro, colores brillantes rosas y blancos respectivamente. Las semillas son de un tamaño promedio de 0.75mm y se encuentran varias de estas en cada fruto, de 53 a 296 para *P. próstata* y de 2 a 194 para *D. empetrifolium*

La masa y la morfología de la semilla son rasgos de la historia de vida de la planta que influyen en la capacidad de dispersión de la semilla, el éxito del establecimiento de la semilla y el patrón de distribución de la población (Wang, Wang, Lai, Jiang, & Zhuang, 2014). Estas características buscan aumentar la probabilidad de éxito de supervivencia, lo cual también se puede evidenciar, principalmente al observar las características de los frutos y el tamaño y viabilidad semillas de varias especies de la familia *Ericaceae*, como menciona Mancipe-Murillo et al., (2018), en dos especies, se obtuvieron porcentajes de viabilidad del $57.2 \pm 3.2\%$ para *P. prostata* y un $79.1 \pm 7.6\%$ para *V. floribundum*.

De manera análoga a lo anterior mencionado, en nuestros resultados para las especies de *P. prostata* y *D. empetrifolium* se observaron porcentajes del 63% y 77% de viabilidad respectivamente. Estos resultados demuestran una gran capacidad reproductiva que va de la mano con el número de semillas encontradas en cada fruto. Pero se debe mencionar que, en futuros estudios, se deberían tomar en cuenta otros factores que pueden afectar a las semillas, como el estado de maduración del fruto y variación de tamaño (Castro et al., 2012), para estudiar de mejor manera la reproducción de estas especies.

En el caso de los frutos de *N. granadensis* y *G. hypocarpium* presentan colores rojizos y anaranjados, diámetro aproximado de 3mm y con una o dos semillas en su interior, esto, según mencionan Ayala-Cordero et al., (2004) y Castor, (2002). Son colores llamativos que facilitan su dispersión mediante animales intermediarios a pesar de su diminuto tamaño, además el número de semillas forma parte de una estrategia aplicada por estas especies, en la cual se designa una menor cantidad de energía en la producción de semillas, pero estas semillas resultan ser altamente viables y resistentes (Ayala-Cordero et al., 2004; Castor, 2002).

Los resultados de viabilidad obtenidos en estudios de *N. granadensis*, también reportan altos porcentajes como se mencionó anteriormente, ya que Pachón (2014), indica en sus resultados un 80% de viabilidad para esta especie, similar a los altos porcentajes obtenidos en nuestros resultados los cuales fueron del 93%. En el caso de *G. hypocarpium*, Pachón (2014), obtiene unos resultados de viabilidad del 33.33%, donde además se reportaron varias semillas vacías, muy distinto a los resultados obtenidos en este estudio, que muestran una viabilidad del 99% para esta especie además de que todas las semillas estaban completas. En este caso, la diferencia de porcentaje de viabilidad puede estar ligada a la presencia de semillas vacías, lo cual

comúnmente sugiere la presencia de depredadores o también se pueden producir abortos por incompatibilidad.

Las muestras recolectadas en este estudio se encontraron en un excelente estado, sin observarse semillas vacías, lo que se puede deber a una baja población de depredadores en la zona de muestreo y al buen estado de las especies en las cuales se realizó la recolección, lo cual muestra un gran potencial de estas especies para su preservación en bancos de semillas a mediano y largo plazo.

Desinfección de Semillas

El desarrollo de un protocolo óptimo de desinfección para cada especie vegetal es necesario para minimizar la contaminación y evitar la pérdida de material vegetal en micropropagación. En el desarrollo de un método óptimo de esterilización para el Cultivo *In Vitro*, se recomienda el uso de alcohol etílico en conjunto con otros desinfectantes, para maximizar el efecto de esterilización (Yu, Yakupjan, & Lei, 2022).

En conjunto con esto se recomienda, dependiendo de la estructura de la semilla, una desinfección de hipoclorito de sodio (NaOCl) de entre 1-3% durante algunos minutos, lo cual se probó en cada una de las cuatro especies estudiadas variando la concentración de hipoclorito entre 1%, 2% y 3% con tres tiempos de inmersión 5, 10 y 15 minutos (GENMEDOC, 2008). Además, se utilizó cuatro gotas de Tween 20 en las soluciones de NaOCl debido a que tiene la función de proveer una buena humectación de la superficie y ayuda a esparcir el NaOCl de manera uniforme en la superficie de la semilla y actúa como surfactante.

Junto con esto, la bibliografía menciona que los desinfectantes no se deben utilizar en concentraciones muy altas o tiempos elevados, ya que se puede generar daño a los tejidos. (Campos Ruiz, Arteaga Cuba, Campos Ruiz, Chico Ruíz, & Cerna

Rebaza, 2020). Por lo que, se eligieron los tratamientos, con bajo porcentaje de contaminación y cuya concentración de NaOCl sea la más baja en el menor tiempo posible para que su desinfección sea efectiva. Debido a que una exposición prolongada a altas concentraciones de hipoclorito provoca la oxidación del tejido vegetal (Pequeño-Granado, y otros, 2015). La preservación del tejido se observó, al comparar el porcentaje de germinación del control con los diferentes tratamientos y se eligieron a los cuales no se vieron afectados.

En el caso *D. empetrifolium*, las pruebas estadísticas en los protocolos de desinfección sugieren que, si existe una diferencia significativa entre los tratamientos, ya que el NaOCl mostró una acción efectiva contra la contaminación, disminuyéndose esta drásticamente en todos los tratamientos. Además de esto, es necesario también analizar el porcentaje de germinación por lo que se consideró al tratamiento TD5 como la mejor alternativa, manteniendo bajo el riesgo de oxidación de la muestra junto a un buen porcentaje de germinación.

Asimismo *P. prostrata*, muestra estadísticamente una diferencia significativa entre los tratamientos analizados, el hipoclorito de sodio en cualquier concentración utilizada fue capaz de eliminar por completo la contaminación de las muestras, en comparación al control. De igual manera al analizar el porcentaje de germinación se considera al tratamiento TD2 como el mejor. En este caso, el tratamiento control poseía un porcentaje de germinación alto (81.7%), por lo que, para elegir al mejor tratamiento, se buscaron primero los que superaron este porcentaje de germinación y en conjunto con una baja concentración de NaClO se eligió al tratamiento TD2.

De manera similar, los ensayos realizados con *N. granadensis* muestran una acción efectiva del hipoclorito de sodio ante la contaminación, especialmente en los tratamientos con porcentaje de 2% y 3%. El análisis estadístico determina diferencias

significativas por lo que, el alto porcentaje de germinación obtenido por el tratamiento TD4, junto con su bajo tiempo de exposición al hipoclorito lo hacen un candidato óptimo como protocolo de desinfección.

En la especie *G. hypocarpium*, los protocolos de desinfección aplicados lograron reducir al 0% el porcentaje de contaminación en todos los casos y en el caso de los tratamientos TD1 y TD6 se obtuvo un porcentaje de germinación del 100%, por lo que al tomar en cuenta la concentración y tiempo de exposición del NaClO, se eligió al TD1 como el mejor tratamiento.

De manera general para las 4 especies estudiadas, los resultados indican que el hipoclorito de sodio es un excelente agente desinfectante, aún en bajas concentraciones, pero se debe tener precaución en que no termine deteriorando las muestras vegetales usadas, por lo que cada tratamiento elegido busca mantener un equilibrio entre una buena desinfección y la preservación de los tejidos.

Germinación de Semillas

En el análisis de la germinación de semillas, se consideran a cuatro factores ambientales como los principales influenciadores del proceso, estos son luz, agua, oxígeno y temperatura (Kołodziejek & Patykowski, 2015). Debido a que cada especie posee sus propios requerimientos ambientales basados en sus adaptaciones ecológicas es importante analizar cómo afecta la variación de estos factores, aunque los principales factores que se toman en cuenta en los ensayos científicos son la luz y temperatura.

En cuanto a la luz, el estudio de Pedroza-Manrique (2007) establece que su efecto está relacionado a la intensidad de las longitudes de onda junto a la naturaleza y cantidad de los fotorreceptores de las especies. Por lo que es común que en cada

especie varíen las condiciones óptimas de luz para la germinación. Por otro lado, la temperatura influye sobre el porcentaje de germinación, debido a su influencia en la actividad de las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en el interior de la semilla después de su rehidratación (Castro, Olarte, Rache, & Pacheco, 2012).

Los resultados de la familia Ericaceae para la especie *P. prostrata* muestran que los tratamientos de únicamente oscuridad, presentan un porcentaje de germinación mayor que con fotoperiodo, pero el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre las medias del porcentaje de germinación. Esto sugiere que la especie es fotoblástica neutra, es decir que la luz no es relevante en la germinación, al igual que otras especies reportadas de la misma familia (Castro, Olarte, Rache, & Pacheco, 2012). De igual manera, la temperatura no parece ser un factor relevante para la germinación ya que se observan resultados similares entre los tratamientos. Entonces para determinar el mejor tratamiento, adicionalmente tomamos en cuenta el índice de latencia, que hace referencia al tiempo que tarda en germinar la primera semilla, por lo que el tratamiento elegido que mayor porcentaje de germinación se dio en menor tiempo es el TG2.

En la especie *D. empetrifolium* existen diferencias significativas entre medias, lo cual también se puede observar en los resultados, principalmente en los tratamientos TG1 y TG3 la presencia de un alto porcentaje de germinación en comparación a los demás. En este caso, coincide el mejor resultado de germinación con el menor índice de latencia, por lo que se puede concluir que el mejor tratamiento es TG1.

Al analizar específicamente al factor luz con la germinación de *D. empetrifolium*, no se puede concluir si es un factor determinante ya que, a pesar que en los tratamientos a temperatura ambiente (TG1 y TG2) se nota un claro favorecimiento por la

luz; En los tratamientos a 15°C y 25°C este factor parece ser irrelevante. Por lo que cabe mencionar que se necesitan más estudios relacionados a este aspecto para determinar su relevancia.

Por otro lado, el factor de la temperatura muestra un favorecimiento por la temperatura ambiental en la germinación de *D. empetrifolium*. Esto puede deberse a que las temperaturas ambientales utilizadas en este estudio oscilaron entre 15,6 - 21.7°C, lo cual favorece el porcentaje de germinación en las cuatro especies estudiadas debido a que simulan las condiciones ambientales. En condiciones del ecosistema del páramo, es decir el día (luz y temperaturas altas) y la noche (oscuridad y temperaturas bajas), existe heterogeneidad ambiental (Vargas & Pérez, 2014).

En cuanto a la familia Rubiaceae la especie *G. hypocarpium* los tratamientos demuestran fotoblastia positiva al tener resultados de germinación mejores en un fotoperiodo de 12 horas. Esta característica se expone de manera igual en la especie *Calycophyllum candidissimum* de la misma familia, que se considera fotoblástica positiva estricta, ya que únicamente germina si existe presencia de luz (Gutiérrez, Pernús, & Sánchez, 2020).

Siguiendo con la especie *G. hypocarpium* la fotoblastia positiva se cumple con excepción de los tratamientos a 25°C, en este caso ambos porcentajes de germinación son muy bajos, lo que sugiere que las altas temperaturas son desfavorables en la germinación de esta especie. Concluyendo así que el mejor tratamiento es TG1 que combina un fotoperiodo de 12 horas con temperatura ambiente (15,6 - 21.7°C) que parece ser la más óptima en la germinación.

De manera similar, en la especie de la misma familia *N. granadensis* se observaron resultados similares en los tratamientos de luz, mostrando un porcentaje de

germinación mayor que los tratamientos de oscuridad (fotoblastia positiva), a excepción de los tratamientos TG7 y TG8 a 25°C. Por lo que se selecciona como mejor tratamiento al TG1.

Asimismo, parece ser que las temperaturas entre 15°C y 22°C son las mejores para la germinación de *Rubiaceae*, evidenciándose esto también en el estudio de Kołodziejek & Patykowski (2015). Donde se estudia a *Galium cracoviense* y se reporta que la temperatura que favorece la germinación es de 22°C. Y de igual manera Pachón-Alfonso (2014) determina que la velocidad de germinación de las semillas de *G. hypocarpium* y *N. granadensis* disminuye considerablemente al aumentar en 10°C su temperatura ambiental.

Bohórquez-Quintero, Araque-Barrera, & Pacheco-Maldonado (2016) evalúan de manera simultánea temperatura y luz, obteniendo resultados para especies de páramo en los que los niveles de temperatura muy bajos no favorecen la germinación por los daños que podrían causar a las semillas a nivel fisiológico, pues incide en el metabolismo, y afecta estructuras celulares importantes (Engelmann, 1991). Lo cual también es evidente en nuestros resultados ya que en los tratamientos con las temperaturas más bajas se tiende a índices de latencia altos en la germinación, lo cual no favorece a la germinación *in vitro*.

Sumado a la evaluación de la influencia de factores ambientales en la germinación, existen varios estudios que examinan el efecto del ácido giberélico. Pedroza-Manrique (2007), en su estudio de germinación de semillas concluye que el ácido giberélico estimula favorablemente la germinación, no obstante, el exceso puede resultar en alteraciones fisiológicas (Pedroza, Corchuelo, & Angarita, 1997). Esto se debe a que las concentraciones de giberelinas estimula el metabolismo durante el desarrollo de embriones (Rojas, 1993).

El ácido giberélico en la familia *Ericaceae* tanto en la especie *Ericaceae*, *P. prostrata* como en *D. empetrifolium* presenta diferencias entre los tratamientos TG9, TG10 y TG11, en comparación con el control TG1. Lo cual también se puede ver en la especie *Vaccinium meridionale* Swartz de la misma familia, donde Magnitskiy y Ligarreto (2011), reportaron que las concentraciones de AG₃ entre 200 y 500 mg/l promueven la germinación de semillas.

En la especie *P. prostrata* el mejor porcentaje de germinación se observa en el tratamiento G10, a concentración de 100 de AG₃, en este tratamiento se sugiere que el ácido giberélico puede tener un efecto positivo en la germinación aunque al compararlo con el mejor tratamiento para la especie elegido anteriormente vemos que no supera el resultado de TG2, por lo que son necesarios estudios posteriores analizando el ácido giberélico no únicamente con fotoperiodo sino también en pura oscuridad para que la comparación de porcentajes sea más exacta.

Por otro lado, para la especie *D. empetrifolium* el mejor tratamiento de ácido giberélico es el TG11 de un 43.3%, pero este no se acerca al porcentaje de germinación del tratamiento TG1 que fue del 66.7%. En relación a estos resultados, se determina que no se está generando un efecto positivo al aplicar esta fitohormona, ya que no se supera el porcentaje de germinación de los tratamientos sin AG₃, pero si se observa un aumento proporcional del porcentaje de germinación junto con el aumento de concentración de ácido giberélico, esto nos sugiere la posibilidad de que es necesario ensayos posteriores analizando concentraciones mayores de AG₃ para determinar si sigue aumentando el porcentaje de germinación.

En el caso de la familia *Rubiaceae*, en *G. hypocarpium* no se observó un efecto positivo en los tratamientos con ácido giberélico. En un estudio realizado por (Lima Jiménez, y otros, 2018) para la especie *Cinchona officinalis* L de la familia *Rubiaceae*

se determina que los mejores tratamientos para la germinación con GA3 suceden a concentraciones de 1mg/l, lo cual nos indica que la concentración usada en nuestro estudio fue muy alta. Aunque, por otro lado, se debe tomar en cuenta que el mejor resultado para la germinación se dio con el tratamiento TG1 que fue del 100%, por lo que en este caso podemos prescindir del uso de fitohormonas ya que los resultados sin estas son muy altos.

Por último, para la especie de *N. granadensis* se observó un porcentaje de germinación mayor en el tratamiento TG9 (97.8%) a concentración de 50mg/L de GA3, este resultado si es significativamente superior al mejor tratamiento mencionado anteriormente para esta especie, ya que TG1 únicamente alcanzó un porcentaje de germinación de 93.3%. En este caso, aunque el tratamiento TG9 arroja resultados muy favorecedores, podrían sugerirse ensayos posteriores, que analicen si una concentración menor de ácido giberélico mejora los porcentajes de germinación.

En base a toda la información planteada anteriormente, se pueden desarrollar protocolos óptimos de germinación para las cuatro especies evaluadas (*Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce). Estos protocolos sirven a su vez como la base teórica indispensable en el momento de desarrollar programas de conservación de especies vegetales, los cuales son especialmente necesarios en hábitats tan importantes como el páramo.

Capítulo VI: Conclusiones

Las características morfológicas del peso de 100 semillas y tamaño (ancho y largo) de semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. son 4.47 mg, 0.49 y 0.75 mm, *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude son 16.97 mg, 0.69 y 1.20 mm, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. son 157.85 mg, 1.32 y 2.66 mm y finalmente en *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) son 85.95 mg, 1.34 y 2.25 mm respectivamente.

El porcentaje de viabilidad de semillas fueron en *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. es de 63%, *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude es 77%, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. es 99% y del 93% en *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce lo cual describe sus rasgos de historia de vida reproductiva previa a la germinación.

El tratamiento con el menor porcentaje de contaminación de semillas correspondiente a cada una de las especies fue TD2 (1% NaOCl, 10 min) en *Pernettya prostrata* (Cav.) DC, el TD5 (2% NaOCl, 10 min) en *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, el TD1 (1% NaOCl, 5 min) *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y TD4 (2% NaOCl, 5 min) *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce para su aplicación como pretratamiento al estudio de germinación.

Se determinó que la temperatura ambiental de entre 15,6 a 21,7°C tiene un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación de las semillas de cuatro especies de estudio. En las especies de la familia *Ericaceae*, *P. prostrata* presenta fotoblastia neutra, mientras que, en *D. empetrifolium* no se obtuvieron resultados claros. Por otro lado, las dos especies de la familia *Rubiaceae* tienen fotoblastia positiva. El ácido giberélico a pesar de que sugiere un efecto positivo en la germinación de las especies de la familia *Ericaceae*, se requieren estudios posteriores. Y en el caso de las especies de la familia *Rubiaceae*, en *G. hypocarpium* no parece ser necesario el uso de AG3 y de manera contraria en *N. granadensis* si se presenta una mejora en la germinación a 50mg/l.

Capítulo VII: Recomendaciones

El fruto maduro de la especie *D. empetrifolium* tiene una coloración blanca translúcido, el fruto en tonos de color verde se encuentra en su estado inmaduro. Para encontrar muestra de frutos, primero se debe localizar e identificar la planta y abrir con cuidado de no maltratar la muestra ya que sus frutos se localizan debajo de sus abundantes hojas.

En las especies estudiadas en este trabajo, se consideran las muestras de semillas pequeñas por ende se recomienda utilizar pinzas entomológicas para una mejor manipulación.

En la desinfección de semillas es importante etiquetar adecuadamente, y cuidar los tiempos determinados. Su manipulación es compleja, utilizar tubos eppendorf de 2 mL ayuda a una desinfección más amigable. Se aconseja realizar los lavados dentro de los mismos y ayudarse de una micropipeta para sus enjuagues. En las especies de la familia Ericaceae procurar tener muestra extra en cada tratamiento.

Usar tubos falcón y mantener en refrigeración las muestras de frutos, ayuda a la conservación de estas estructuras, previamente realizar un lavado con agua destilada. Así el material vegetal será procesado en el laboratorio, preserva su estructura sin ser afectada en su morfología.

Realizar ensayos con diferentes termoperiodos y fotoperiodos, tratando de utilizar rangos (altos, medios y bajos), tratando de simular las condiciones normales de temperatura (diferenciar día y noche), si se cuenta con cámaras de germinación. Estos estudios permiten establecer el rango de temperatura óptimo para la germinación *in vitro* de las semillas.

Al emplear ácido giberélico en los medios de cultivo, se recomienda aumentar los rangos de concentraciones evaluados para que se pueda determinar con mayor veracidad si se produce un efecto positivo, negativo, o neutro en la germinación.

Bibliografía

- Andersson, L., & Taylor, C. (1994). *Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae*. Goteborg: University of Goteborg.
- Betancur, A., & Pérez, M. (2016). Parques y páramos naturales de Colombia como zonas de importancia para el desarrollo minero energético del país. *Revista del CESLA*, 19, 33-56.
- BirdLife International. (2008). *Important Bird Areas factsheet: Parque Nacional Cayambe-Coca*. Recuperado el 31 de Julio de 2021, de <http://datazone.birdlife.org/site/factsheet/parque-nacional-cayambe-coca-iba-ecuador>
- Bonner, F. T. (1990). Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. . *Forest Ecology and Management*, 35(1-2), 35–43.
doi:10.1016/0378-1127(90)90230-9
- Britannica. (2020). Rubiaceae . *Enciclopedia Británica* . Obtenido de <https://www.britannica.com/plant/Rubiaceae>
- Campos Ruiz, J., Arteaga Cuba, M., Campos Ruiz, S., Chico Ruíz, J., & Cerna Rebaza, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156. doi:10.22497/arnaldoa.271.27107
- Campos, F. (2014). *Diseño de la agenda de investigación y modelo de gestión para el Instituto Nacional de Biodiversidad. Producto 1 de consultoría: Línea base de la investigación sobre biodiversidad en el Ecuador*. Quito: MAE-CAF.

- Castro, C., Olarte, Y., Rache, L., & Pacheco, J. (2012). Establecimiento de un protocolo para germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 30.
- Chuncho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *REBID*, 71-83.
- Deno, N. C. (1993). *Seed Germination Theory And Practice. Second.* National Agricultural Library.
- Duarte, B., & Roa, T. (2014). El dilema del páramo: diferentes concepciones en un contexto de justicia hídrica. El caso del páramo de Santurbán. *Revista Universidad Javeriana*, 3, 1-9.
- GENMEDOC. (2008). *Prácticas de germinación en los bancos de semillas de la red GENMEDOC.*
- Guacho, M. (2018). *Valoración económica del servicio ecosistémico del complejo de humedales Ñucanchi Turupamba, en la zona alta del Parque Nacional Cayambe Coca, para el desarrollo de un plan de turismo sustentable y educación ambiental.* Quito: Universidad Internacional SEK.
- Gutiérrez, A., Pernús, M., & Sánchez, J. A. (2020). Rasgos funcionales de semillas de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae), árbol pionero del Neotrópico - Functional seed traits of *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae), pioneer tree of Neotropic. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 41, 71-77.
doi:<https://www.jstor.org/stable/26975227>
- Hernández P, M. I., Lobo A, M., Medina C, C. I., Cartagena V, J. R., & Delgado P, O. A. (2009). omportamiento de la germinación y categorización de la latencia en

semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 15-23.

Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., . . . Cerra, M. (2014). *Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el*. Quito: UICN.

Jara, P. (2015). *Propuesta de Diseños de Servicios y Facilidades Turísticas para la Cascada del Duende en la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Cayambe Coca*. Quito: UTE.

Kołodziejek, J., & Patykowski, J. (2015). The Effect of Temperature, Light and Calcium Carbonate on Seed Germination and Radicle Growth of the Polycarpic Perennial *Galium Cracoviense* (Rubiaceae), a Narrow Endemic Species from Southern Poland. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica*, 57. doi:10.1515/abcsb-2015-0006

Lasso, G. (2009). *Guión Turística de la Reserva Ecológica Cayambe - Coca*. Quito: Ministerio del Ambiente.

León-Yáñez, S. R., Valencia, N., Pitmam, L., Endara, C., Ulloa, U., & Navarrete, H. (2019). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>

Lima Jiménez, N. R., Moreno Serrano, J. A., Eras Guamán, V. H., Minchala Patiño, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M., & Valarezo Ortega, C. (2018). Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(2), 169-178. doi:<http://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.361>

- Luteyn, J. (2021). The Plant Family Ericaceae (“blueberries”) in Ecuador: Ecology, Diversity, Economic Importance, and Conservation. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(2), 79-98. doi:10.26807/remcb.v42i2.911
- Machado, L. C., Oliveira, V. C., Paraventi, M. D., Cardoso, R. N., Martins, D. S., & Ambrósio, C. E. (2016). *Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank*. (Vol. 36). doi:https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000100010
- Magnitskiy, S. V., & Ligarreto, G. A. (2011). El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1, 137-141.
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., & Pérez-Martínez, L. M. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio / Assessment of seed viability of 17 high andean tropical species by germination and tetrazolium tests. 40(2), 366-382. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. doi:https://dx.doi.org/10.1544 6/caldasia.v40n2.68251
- Mena, P. (2005). *La biodiversidad del Ecuador*. Quito: EcoCiencia.
- Mena, P. (2007). *La biodiversidad del Ecuador*.
- Merritt, D. J., & Dixon, K. W. (2011). Restoration seed banks—a matter of scale. *Science*, 332(6028), 424-425. doi:10.1126/science.1203083
- Ministerio del Ambiente. (2020). *Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe Coca 2020 - 2030*. Quito.

- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2016). *Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030, primera edición*. Quito-Ecuador.
- Montiel, M. (1980). *Introducción a la flora de Costa Rica*. San Jose: Universidad de Costa Rica.
- Montúfar Flores, M. (2015). *Reserva Ecológica Cayambe Coca (Cayambe Coca, ecological reserve)*. Quito: Cotopaxi Magazine.
- Nelleman, C., & Corcoran, E. (2010). *Dead planet, Living planet: Biodiversity and Ecosystem Restoration for Sustainable Development*. Obtenido de <https://www.grida.no/publications/215>
- Oliveira, F., Barros, S., Nogueira, N., & Oliveira, R. (2016). Viabilidad de las semillas de *Simira gardneriana* MR Barbosa & Peixoto mediante la prueba de tetrazolio. *Journal of Seed Science*, 38(1), 7-13. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v38n1153565>
- Pachón Alfonso, P. (2014). *Efecto de la temperatura en el proceso de germinación de cuatro especies de páramo-escenario de cambio climático*. Bogotá-Uniandes: Bachelor's thesis.
- Patil, V. N., & Dadlani, M. (2009). Tetrazolium test for seed viability and vigour. En *Handbook of seed testing* (Vol. 209, págs. 209-241).
- Pequeño-Granado, I., Martínez-Ávila, G., Aguirre-Arzola, V., Iracheta-Donjuan, L., Mojica-Marín, V., Rodríguez-Pérez, G., & Ojeda-Zacarías, M. (2015). Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. *Bioagro*, 27(3), 167-172.

- Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I., & Kaushik, P. (2021). Germplasm Conservation: Instrumental in Agricultural Biodiversity—A Review. *Sustainability*, 13(12), 6743.
- Quazi, S., Golani, T., & Martino, A. (2021). Germplasm Conservation. En *Endangered Plants*. Intechopen. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.96184>
- Romero-Saritama, J. M., & Cueva-Ojeda, D. N. (2020). Tamaño de semillas y germinación de *Pernettya prostrata*. *Caldasia*, 42(2).
doi:10.15446/caldasia.v42n2.77247
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019). *Disterigma empetrifolium* En: *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. PUCE. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Disterigma%20empetrifolium>
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019). *Galium hypocarpium* En: *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. PUCE. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Galium%20hypocarpium>
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019). *Nertera granadensis* En: *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. PUCE. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Nertera%20granadensis>
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019). *Pernettya prostrata* En: *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. PUCE. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Pernettya%20prostrata>

- Sierra, R., Calva, O., & Guevara, A. (2019). La Deforestación en el Ecuador, 1990-2018. Factores promotores y tendencias recientes. Quito, Ecuador: Ministerio de Ambiente y Agua del Ecuador, Ministerio de Agricultura del Ecuador, en el marco de la implementación del Programa Integral Amazónico de Conservación de Bosques y Producción Sostenible.
- Sklenar, P., Kucerova, A., Mace, P., & Macková, J. (2010). Does plant height determine the freezing resistance in the páramo plants? *Austral Ecology*, 35, 929-934.
- Suárez-Ballesteros, C., Calderón-Hernández, M., & Mancipe-Murillo, C. (2018). Propagación sexual y tolerancia a la desecación del agraz (*Vaccinium meridionale* Sw) de tres fuentes semilleras localizadas en Ráquira, San Miguel de Sema (Boyacá) y Gachetá (Cundinamarca). *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 42(163), 207-215. doi:10.18257/raccefyn.614
- Vargas Ríos, O., & Pérez-Martínez, L. V. (Edits.). (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Vargas, O., & Pérez, V. (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
- Villa, J., Mejía, G., Velásquez, D., Botero, A., Acosta, S., Marulanda, J., . . . Bohrer, G. (2019). Carbon Sequestration and Methane Emissions along a Microtopographic Gradient in a Tropical Andean Peatland. *Science of the Total Environment*, 564, 651-661.
- Wang, Y., Wang, J., Lai, L., Jiang, L., & Zhuang, P. a. (2014). Geographic variation in seed traits within and among forty-two species of *Rhododendron* (Ericaceae) on

the Tibetan plateau: Relationships with altitude, habitat, plant height, and phylogeny. *Ecology and Evolution*, 4. doi:10.1002/ece3.1067

Xu, Z., & Chang, L. (2017). Rubiaceae. En: Identificación y control de malezas comunes: Volumen 3. Springer, Singapur. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-10-5403-7_16

Yashasvi, B. (2021). Rubiaceae: caracteres, distribución y tipos. *Biology Discussion*.

Yu, S., Yakupjan, H., & Lei, W. (2022). Optimum Sterilization Method for In Vitro Cultivation of Dimorphic Seeds of the Succulent Halophyte Suaeda aralocaspica. *Horticulturae*, 8(4), 2311-7524. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/4/289>