



**Germinación *in vitro* de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del  
Parque Nacional Cayambe Coca**

Pazmiño Araujo, Gabriela Alejandra

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

PhD. Salcedo Segovia, María Claudia

23 de agosto de 2021



### Document Information

Analyzed document	ARCHIVO_URKJND_PAZMIÑO_GABRIELA.docx (D111561336)
Submitted	8/22/2021 6:08:00 PM
Submitted by	SEGOVIA SALCEDO CLAUDIA
Submitter email	msegovia@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	msegovia.espe@analysis.urkund.com

### Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>CATALOGO DE PLANTAS RPFCH.pdf</b> Document CATALOGO DE PLANTAS RPFCH.pdf (D80117868)	 2
<b>SA</b>	<b>Tesis Jessica Duque UEA 04_07_2015.docx</b> Document Tesis Jessica Duque UEA 04_07_2015.docx (D13860135)	 3
<b>W</b>	URL: <a href="https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3703/1/T-ESPE-031370.pdf">https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3703/1/T-ESPE-031370.pdf</a> Fetched: 7/28/2020 3:37:36 AM	 1
<b>W</b>	URL: <a href="http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI19092.pdf">http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI19092.pdf</a> Fetched: 1/9/2021 7:10:36 PM	 1
<b>SA</b>	<b>Propagacion in Vitro.docx</b> Document Propagacion in Vitro.docx (D14874964)	 2



Urkund document generated on:  
 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, “**Germinación in vitro de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca**” fue realizado por la señorita **Pazmiño Araujo Gabriela Alejandra**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido. Por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 23 de agosto de 2021



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

---

**Segovia Salcedo María Claudia, PhD**

CI. 1709055998



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Pazmiño Araujo Gabriela Alejandra**, con cédula de ciudadanía N° 1724553795, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación, "**Germinación *in vitro* de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca**" es de mi autoría y responsabilidad. Por lo tanto, cumple 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, 07 de septiembre de 2021



**Pazmiño Araujo, Gabriela Alejandra**

CI. 1724553795



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Pazmiño Araujo Gabriela Alejandra**, con cédula de ciudadanía N° 1724553795, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación, "**Germinación *in vitro* de semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 07 de septiembre de 2021



**Pazmiño Araujo, Gabriela Alejandra**

CI. 1724553795

## Dedicatoria

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

A mis padres, Tatiana y Angel quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han ayuda a conseguir este logro tan importante para mí.

A mis hermanos, Esteban y Emilia quienes con su cariño y apoyo incondicional me llenan de vida y me motivan a seguir adelante.

Finalmente, en memoria de mi abuelito, Angel Manuel quien en su momento con su sabiduría y visión fue una guía importante para aspirar a grandes cosas en mi vida.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a Dios por llenarme siempre de bendiciones y a toda mi familia por estar siempre a mi lado apoyándome.

Un agradecimiento especial a mi directora María Claudia Segovia, PhD por su guía profesional y personal a lo largo del desarrollo de mi trabajo y por la inspiración que para mí representa al ser una científica tan reconocida.

Gracias a Mónica Jadán, PhD, a la Ing. Marianela Mariño y a la M. Sc. Andrea Ortega por su guía técnica en el desarrollo del presente trabajo de titulación.

A mis amigos, Andrés, Kerly, Lore, David, Kathy, Juan Carlos, Jenny, Diego y Karla gracias por su amistad y por enseñarme lo importante que es rodearte de personas que te guían y se alegran de cada paso importante en tu vida.

Gracias a los proyectos BIO-GEEC y HANS-BANK, así como también a todas las entidades Nacionales e Internacionales por el apoyo financiero; a la Universidad de las Fuerzas Armadas y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por la apertura a la entrada a sus instalaciones. Sin ustedes el presente trabajo no hubiera sido posible.

## Índice de contenidos

Carátula.....	1
Informe Urkund.....	2
Certificación Docente .....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas .....	12
Índice figuras.....	13
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Planteamiento de problema .....	17
Justificación del problema.....	18
Objetivos.....	20
Objetivo general .....	20
Objetivos específicos.....	20
Capítulo II: Marco Teórico .....	21
Los páramos, ecosistemas menospreciados y amenazados.....	21

Características generales de los páramos.....	21
Relevancia de los páramos como ecosistema.....	21
Actividades que amenazan a los páramos .....	22
Asteraceae, una familia vegetal representativa de los páramos.....	22
Generalidades de la familia Asteraceae .....	22
Familia Asteraceae y su estado actual en el Ecuador.....	23
Área de estudio y especies de la familia Asteraceae representativas de la zona....	24
Especies de la familia Asteraceae dentro del estudio.....	25
Estrategias para conservación de especies vegetales .....	31
Bancos de germoplasma y herbarios .....	31
Germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	32
Capítulo III: Metodología .....	33
Recolección y tratamiento preliminar del material vegetal.....	33
Descripción de las especies.....	33
Descripción morfológica de las semillas.....	33
Dimensionamiento.....	34
Pesaje .....	34
Estado de madurez de las semillas .....	34
Número de semillas por flor.....	35
Pruebas de viabilidad de las semillas.....	35
Preparación de la solución de tinción .....	35

	10
Preparación pre-tinción .....	35
Tratamiento de tinción .....	36
Preparación pre-evaluación.....	36
Ensayos de germinación <i>in vitro</i> .....	37
Desinfección de las semillas.....	37
Pruebas de germinación <i>in vitro</i> .....	38
Análisis estadístico .....	39
Diseño experimental.....	39
Análisis gráficos .....	40
Desinfección.....	40
Germinación .....	40
Capítulo IV: Resultados.....	42
Descripción morfológica de las especies .....	42
Descripción morfológica de las semillas por especie .....	44
Número de semillas por flor.....	44
Estado de madurez de las semillas .....	45
Peso promedio de las semillas por especie.....	51
Dimensionamiento promedio de las semillas por especie.....	52
Prueba de viabilidad de las semillas .....	52
Género <i>Monticalia</i> .....	53
Género <i>Gynoxys</i> .....	55

Género <i>Diplostephium</i> .....	56
Desinfección de las semillas .....	57
Germinación <i>in vitro</i> de las semillas .....	58
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Monticalia andicola</i> .....	60
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Monticalia peruviana</i> .....	62
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Diplostephium rupestre</i> .....	64
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Diplostephium rhomboidale</i> .....	66
Capítulo V: Discusión .....	69
Capítulo VI: Conclusiones .....	77
Capítulo VII: Recomendaciones .....	79
Capítulo VIII: Bibliografía .....	80
Anexos .....	87

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en el ensayo de desinfección de semillas.....	38
<b>Tabla 2</b> Medio de cultivo recomendado para la germinación de semillas de la familia Asteraceae .....	39
<b>Tabla 3</b> Número promedio de semillas encontradas por flor en cada especie de la familia Asteraceae estudiada.....	44
<b>Tabla 4</b> Peso promedio de un lote de 100 semillas por cada especie de la familia Asteraceae estudiada.....	51
<b>Tabla 5</b> Dimensionamiento promedio de las semillas por cada especie de la familia Asteraceae estudiada.....	52
<b>Tabla 6</b> Valores promedio de semillas contaminadas en cada tratamiento de desinfección aplicado para cada una de las especies de estudio.....	58
<b>Tabla 7</b> Valores promedio de semillas germinadas en cada tratamiento de desinfección aplicado para cada una de las especies de estudio.....	59

## Índice figuras

<b>Figura 1</b> Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.....	25
<b>Figura 2</b> Ejemplar de <i>Monticalia andicola</i> .....	26
<b>Figura 3</b> Ejemplar de <i>Monticalia arbutifolia</i> .....	27
<b>Figura 4</b> Ejemplar de <i>Monticalia peruviana</i> .....	28
<b>Figura 5</b> Ejemplar de <i>Gynoxys parvifolia</i> .....	29
<b>Figura 6</b> Ejemplar de <i>Diplostephium rupestre</i> .....	30
<b>Figura 7</b> Ejemplar de <i>Diplostephium rhomboidale</i> .....	31
<b>Figura 8</b> Estructuras analizadas en el dimensionamiento de las semillas .....	34
<b>Figura 9</b> Patrones de coloración empleados para la determinación de embriones viables .....	36
<b>Figura 10</b> Ficha ejemplo de la descripción general, morfológica y fisiológica de las especies de estudio.....	43
<b>Figura 11</b> Estado de madurez de las semillas del género <i>Monticalia</i> en los meses de recolección .....	46
<b>Figura 12</b> Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras para el género <i>Monticalia</i> .....	47
<b>Figura 13</b> Estado de madurez de las semillas de <i>Gynoxys parvifolia</i> en los meses de recolección .....	48
<b>Figura 14</b> Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras en <i>Gynoxys</i> <i>parvifolia</i> .....	48
<b>Figura 15</b> Estado de madurez de semillas del género <i>Diplostephium</i> en los meses de recolección .....	49
<b>Figura 16</b> Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras para el género <i>Diplostephium</i> .....	50

<b>Figura 17</b> Estado fenológico de las especies en los meses de recolección .....	51
<b>Figura 18</b> Viabilidad de las semillas del género <i>Monticalia</i> .....	54
<b>Figura 19</b> Patrones colorimétricos encontrados en los embriones del género <i>Monticalia</i> .....	54
<b>Figura 20</b> Viabilidad de las semillas de <i>Gynoxys parvifolia</i> .....	55
<b>Figura 21</b> Patrones colorimétricos encontrados en embriones de <i>Gynoxys parvifolia</i> ...	55
<b>Figura 22</b> Viabilidad de las semillas del género <i>Diplostephium</i> .....	56
<b>Figura 23</b> Patrones colorimétricos encontrados en los embriones del género <i>Diplostephium</i> .....	57
<b>Figura 24</b> Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de <i>Monticalia</i> <i>andicola</i> .....	61
<b>Figura 25</b> Germinación y desarrollo de plántulas en <i>Monticalia andicola</i> .....	62
<b>Figura 26</b> Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de <i>Monticalia</i> <i>peruviana</i> .....	63
<b>Figura 27</b> Germinación y desarrollo de plántulas en <i>Monticalia peruviana</i> .....	64
<b>Figura 28</b> Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de <i>Diplostephium</i> <i>rupestre</i> .....	65
<b>Figura 29</b> Germinación y desarrollo de plántulas en <i>Diplostephium rupestre</i> .....	66
<b>Figura 30</b> Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de <i>Diplostephium</i> <i>rhomboidale</i> .....	67
<b>Figura 31</b> Germinación y desarrollo de plántulas en <i>Diplostephium rhomboidale</i> .....	68

## Resumen

El páramo es considerado hotspot por su biodiversidad y potenciales amenazas como el cambio climático. En Ecuador el 87.74% de las especies de la familia Asteraceae restringen su hábitat a los Andes haciéndolas estratégicas para su conservación. El objetivo del presente proyecto es realizar estudios morfológicos, de viabilidad y de germinación *in vitro* para el establecimiento de un banco de semillas. Para ello se colectaron las semillas de seis especies nativas de la familia Asteraceae del Parque Nacional Cayambe Coca (*Monticalia andicola*, *Monticalia arbutifolia*, *Monticalia peruviana*, *Gynoxys parvifolia*, *Diplostephium rupestre* y *Diplostephium rhomboidale*) para el análisis del número de semillas por flor, estado de madurez, peso, largo, ancho, viabilidad y concentración óptima de NaClO y AG<sub>3</sub> para la germinación *in vitro*. Los resultados mostraron que la viabilidad de las especies está entre el 3 al 29% y que la concentración óptima de NaClO para los géneros *Diplostephium* y *Gynoxys* es de 5.5% y para el género *Monticalia* es de 6%. En la germinación *in vitro* de las semillas, se obtuvo que una concentración de AG<sub>3</sub> de 1mg/L para *M. andicola* y *D. rupestre* y de 0.5mg/L para *M. peruviana* y *D. rhomboidale* puede favorecer la capacidad germinativa, la ruptura de la latencia y la velocidad de germinación. La información generada es una línea base para programas de conservación de recursos genéticos y restauración de ecosistemas alto andinos.

### Palabras clave

- PÁRAMO
- HOTSPOT
- CAMBIO CLIMÁTICO
- RECURSOS GENÉTICOS

## Abstract

The paramo is considered a hotspot for its biodiversity and potential threats like climate change. In Ecuador, 87.74% of the species of the Asteraceae family restrict their habitat to the Andes, making them strategic for their conservation. The objective of this project is to carry out morphological, viability, and germination studies *in vitro* for the establishment of a seeds bank. For this, the seeds of six native species of the Asteraceae family from the Cayambe Coca National Park (*Monticalia andicola*, *Monticalia arbutifolia*, *Monticalia Peruviana*, *Gynoxys parvifolia*, *Diplostephium rupestre*, and *Diplostephium rhomboidale*) were collected; for the analysis of the number of seeds per flower, state of maturity, weight, length, width, viability and optimal concentration of NaClO and AG3 for germination *in vitro*. The results showed that the viability of the species is between 3 to 29% and that the optimal concentration of NaClO for the *Diplostephium* and *Gynoxys* generous is 5.5% and for the *Monticalia* generous is 6%. In the *in vitro* germination of the seeds, it was obtained that a concentration of AG3 of 1mg/L for *M. andicola* and *D. rupestre* and of 0.5mg/L for *M. peruviana* and *D. rhomboidale* can favor the germination capacity, the rupture of dormancy, and germination speed. The information generated is a baseline for programs of conservation of genetic resources and restoration of high Andean ecosystems.

## Key words

- **PARAMO**
- **HOTSPOT**
- **CLIMATE CHANGE**
- **GENETIC RESOURCE**

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento de problema

Los páramos son ecosistemas olvidados y menospreciados a pesar de presentar una relevancia biológica, ecológica y socioeconómica. Además son uno de los más propensos al desgaste por actividades de origen humano y por el cambio climático (Mena et al., 2001). Este último, afecta directamente esta zona tan vulnerable al aumento de temperatura en la que su biodiversidad no tiene la posibilidad de migrar a mayores altitudes, representando de esta manera un punto crítico en esta problemática para este medio que se estima se reducirá significativamente en los próximos 30 años si no se toman medidas preventivas (Dangles et al., 2017).

Es por esto que, el realizar planes de conservación es primordial en este tipo de ecosistemas. Sin embargo, la ejecución de dichos planes implica un proceso sistemático extenso para los que se necesita una línea base de la cual apoyarse (Mora, 2008). Lamentablemente, este tipo de estudios se han centrado en especies de interés alimenticio y económico dejando de lado las especie silvestres, las mismas que a nivel ecológico son relevantes para preservar medios como el páramo que es la principal fuente hídrica para el país y alberga gran cantidad de biodiversidad nativa y endémica (J. Romero & Pérez, 2016).

Un paso determinante en este proceso es la selección de especies vegetales aptas para conservación *ex situ* que asegure su variabilidad genética por medio de bancos de semillas (Pezoa, 2001). Esta puede definirse en función de la importancia ecológica y económica de la especie o por las características morfológicas de las semillas para determinar si son candidatas a ser preservadas por tiempos prolongados

sin que las mismas pierdan su viabilidad. Para ello es necesario realizar pruebas en laboratorio acerca de su morfología, viabilidad y germinación al no contarse con la información necesaria por la ausencia de estudios en este campo (Godínez & Flores, 2000).

Uno de los principales retos en semillas de especies de páramo es el bajo porcentaje de semillas con embrión y viables que se presentan (Vargas et al., 2014). Por lo que, el uso de métodos convencionales para su germinación resulta ser ineficiente, y al necesitarse condiciones ambientales homólogas al que se presenta en su medio por las características físicas de este ecosistema es necesario el uso de cámaras de germinación como un determinante en la capacidad germinativa de las semillas (Cueva, 2016).

Por estas razones, el presente estudio tiene como propósito realizar ensayos en el laboratorio que provean información relevante acerca de la morfología, viabilidad y germinación de seis especies estratégicas en el establecimiento de un banco de semillas alto andinas (HANS-BANK) para la Universidad de las Fuerzas Armadas. Por otro lado, también ayudará a cumplir con algunos de los objetivos planteados en el proyecto BIO-GEEC al cual el presente proyecto de investigación se encuentra ligado.

### **Justificación del problema**

El contar con información de los recursos genéticos de especies vegetales de páramo es de suma importancia, ya que este tipo de ecosistema proveen cerca de un 70% de agua al país al transformar la neblina en ríos y lagos (Ochoa et al., 2016). Las especies de páramo resultan ser las más amenazadas por el cambio climático, por lo

que realizar planes de conservación ahora que se cuenta con el material vegetal es de suma importancia para dar una solución a futuro (Posada, 2014).

El estudio se lo realizó en especies de la familia Asteraceae al ser estratégicas para la restauración preliminar de los páramos, ya que el 87,74% de estas en nuestro país restringen su hábitat a la región andina (Rivero, 2020). Se sabe que son las responsables de preparar los suelos y ayudar a la reintroducción de especies que son más sensibles a la presencia de ciertos compuestos como metales pesados o hidrocarburos producto de actividades como la minería. Además de ser un control de biomasa exótica derivada de la introducción de especies foráneas, promoviendo el crecimiento únicamente de vegetación nativa en los páramos (Pérez & Castañeda, 2017).

Adicionalmente, estas especies tienen un interés económico al contener metabolitos secundarios con propiedades antitumorales y antifúngicas como en el caso de *M. andicola*, *M. arbutifolia* y *M. Peruviana*. Por otro lado, *Gynoxys parvifolia* se la utiliza como materia prima para forraje, leña y además es considerada una especie apícola. Por lo que su conservación podría aportar en futuros estudios de interés biotecnológico (Romoleroux et al., 2016).

Estudios realizados previamente en géneros y especies relacionadas con las especies de interés en el presente proyecto, han demostrado que el uso de nuevas tecnologías como el cultivo *in vitro* promueven la ruptura de la latencia de las semillas. Ya que a través del uso de reguladores de crecimiento y condiciones controladas en el laboratorio como horas de luz/oscuridad y temperatura se pueden cubrir las necesidades de cada especie en particular para de esta manera aumentar las

probabilidades de germinación en la mayor cantidad de semillas con las que se cuenta (Castillo, 2014).

Por medio del banco de semillas y los ensayos *in vitro* que se realizaron en el proyecto, se busca que la ESPE cuente con un reservorio de especímenes y material genético de estas especies nativas de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca. Esto permitirá conservarlas y reintroducirlas en su hábitat en caso de que el mismo se deteriore como se espera en los próximos años (Condón & Rossi, 2018).

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Germinar *in vitro* semillas de seis especies de la familia Asteraceae obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca.

### ***Objetivos específicos***

- Realizar la recolección de semillas de cada especie seleccionada del Parque Nacional Cayambe Coca en la cantidad y estado adecuado para la obtención de resultados favorables en el laboratorio.
- Obtener resultados de la morfología de las semillas de las especies recolectadas por medio de su pesaje, estado, dimensionamiento y número de semillas por flor.
- Realizar pruebas con tetrazolio para la obtención de datos que permitan determinar la viabilidad de las semillas de cada especie estudiada.
- Determinar la influencia del cultivo *in vitro* en la tasa de germinación de las semillas de las especies que se busca estudiar.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Los páramos, ecosistemas menospreciados y amenazados

#### *Características generales de los páramos*

Los páramos son ecosistemas que se encuentran en la alta montaña tropical entre los 3000 msnm en las vertientes más húmedas y a 4500 msnm entre el desierto periglacial y las nieves perpetuas. Estos están distribuidos principalmente en Venezuela, Ecuador, Colombia y Norte de Perú y sus temperaturas oscila entre los -8 y 22°C (Posada, 2014).

Los andes al estar expuestos a bajas temperaturas, niebla, bajas presiones atmosféricas y alta radiación UV; sus especies han creado estrategias adaptativas únicas, siendo hogar de un 6.7% de plantas endémicas a nivel mundial. En Ecuador este tipo de ecosistemas ocupan el 7% del territorio contándose con 27 áreas protegidas de las cuales 14 contienen importantes extensiones de páramo (Chuncho, 2019).

#### *Relevancia de los páramos como ecosistema*

Los páramos son catalogados como tierras hostiles, improductivas y poco llamativas. Sin embargo, lo que se desconoce es que los mismos tienen una gran importancia biológica, ecológica y socioeconómica al proporcionar el 70% del agua por medio de la transformación de la neblina en ríos y lagos los cuales se utilizan posteriormente para riego de cultivos y como fuente de agua de consumo humano. Además de que, muchas de las plantas que forman parte de estos ecosistemas se las utiliza con fines medicinales o como materia prima (Correa et al., 2017).

Debido a la poca cobertura del páramo en el territorio en comparación a otros ecosistemas que existen en el país, como es el caso de la Selva Amazónica, no se le da la relevancia a pesar de ser considerado un hotspot por el Organismo de Conservación Internacional por su biodiversidad y por las potenciales amenazas que este enfrenta (Hofstede et al., 2002).

### ***Actividades que amenazan a los páramos***

La Ley de Biodiversidad vigente en el Ecuador cataloga a los páramos como un ecosistema frágil principalmente por la influencia de actividades antropogénicas como quema, producción agrícola inadecuada, minería, entre otras. Las mismas que amenazan la estabilidad biológica del lugar al dañar principalmente los suelos (Díaz et al., 2005).

Otro factor que influye en gran medida en el desgaste de estos ecosistemas es el cambio climático. Se han analizado varios modelos en los que se predicen que en 30 años este tipo de ecosistemas podrían verse gravemente afectados debido al acelerado incremento de las temperaturas. Las especies de este lugar al no poder evolucionar al mismo ritmo de este fenómeno y tampoco tener la posibilidad de migrar a mayores altitudes como las especies de ecosistemas más bajos, pueden desaparecer poco a poco en los próximos años (Valencia et al., 2020).

### **Asteraceae, una familia vegetal representativa de los páramos**

#### ***Generalidades de la familia Asteraceae***

El nombre Asteraceae se deriva del griego “*aster*” que significa estrella, haciendo alusión a la forma de su inflorescencia. A esta familia se la conoce también

como compuestas y constan de 32913 especies repartidas en 1911 géneros representando de esta manera a la familia con mayor diversidad biológica de las Angiospermas (Pedraza et al., 2004). Se la considera cosmopolita por lo que, se las puede encontrar tanto en zonas frías como tropicales; sin embargo, se encuentran en mayor abundancia en regiones áridas o semiáridas de zonas montañosas altas (Rivero, 2020).

### ***Familia Asteraceae y su estado actual en el Ecuador***

En Ecuador se cuenta con 217 géneros en esta familia en los que hay 918 especies. De este total 360 son endémicas y tan solo 19 de ellas se encuentran fuera de peligro, el resto están consideradas en algún nivel de amenaza establecido por el UICN e incluso una se encuentra extinta (*Delilia inelegans*). Por lo expuesto anteriormente, esta familia ocupa uno de los primeros lugares junto con la familia Orchidaceae con la mayor cantidad de especies endémicas del Ecuador, las cuales son principalmente arbustos y hierbas que en su mayoría se encuentran distribuidas en los Andes del país (León et al., 2011).

Esta familia en la actualidad a pesar de ser un grupo taxonómicamente complejo no cuenta con una representación completa en los herbarios del país, principalmente de 140 plantas endémicas. A esto se suma que no existen suficientes estudios que brinden datos relevantes acerca de su morfología y ecología, dificultando de esta manera su conservación. El realizar trabajos para la recolección de los recursos genético es de gran importancia en este punto, debido a que sus hábitats naturales especialmente los interandinos se encuentran gravemente deteriorados; lo que ha disminuido en un 4% la presencia de estas especies en los ecosistemas (Mena et al., 2001).

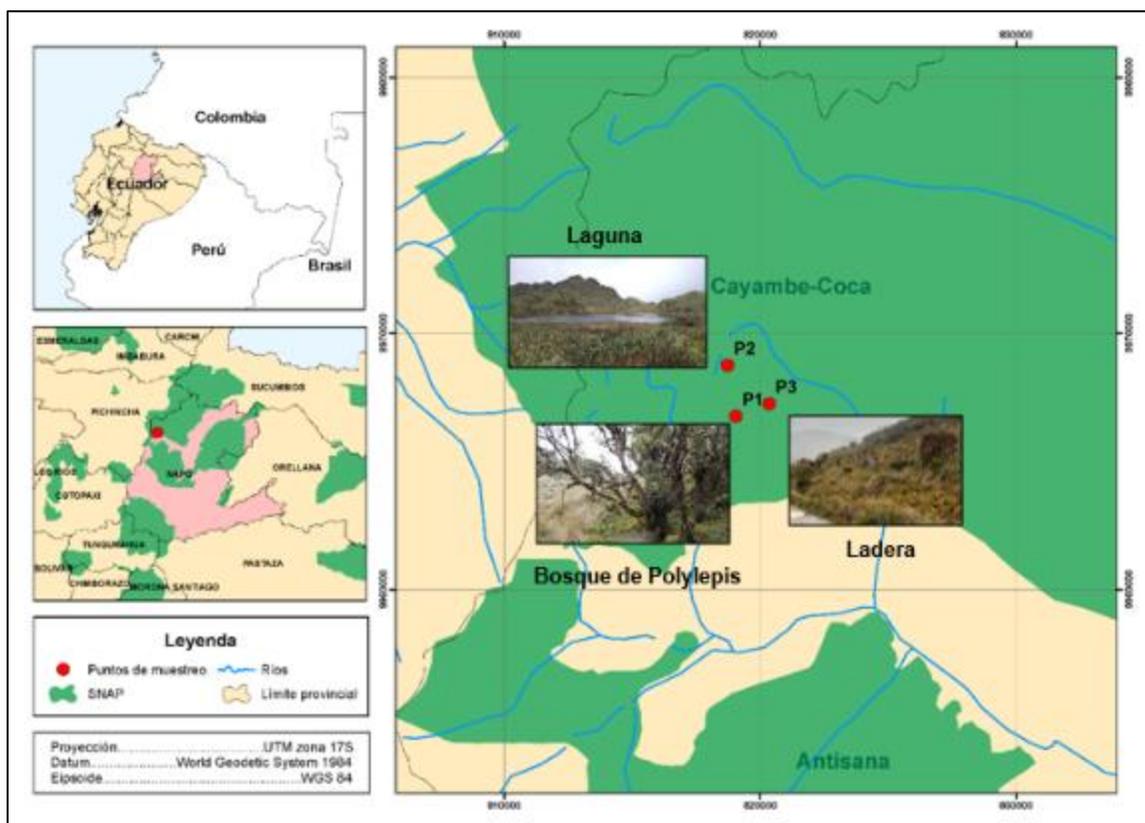
### ***Área de estudio y especies de la familia Asteraceae representativas de la zona***

El área de estudio está ubicada dentro del Parque Nacional Cayambe Coca, el cual está al noreste del país distribuido en cuatro provincias: Imbabura, Pichincha, Napo y Sucumbíos. Tiene un rango altitudinal de 3100 a 5790msnm con una temperatura que oscila entre 5 a 22°C; posee una gran variedad de fauna contando con 106 especies de mamíferos, 395 especies de aves, 70 de reptiles y 116 de anfibios. Así como también con una gran variedad de flora con más de 100 especies endémicas dentro de la zona en la que abundan pajonales, ichus, helechos y licopodios (MAE, 2020).

El mayor porcentaje de la vegetación del páramo del Parque está representado por especies de la familia Asteraceae y dentro de estas los géneros que se encuentran comúnmente son: *Aetheolaena*, *Baccharis*, *Cotula*, *Diplostephium*, *Gamochoeta*, *Gynoxys*, *Laestadia*, *Monticalia*, *Munnozia*, *Oritrophium* y *Senecio* (Romoleroux et al., 2016). En la Figura 1 se observan los tres puntos que fueron seleccionados por el proyecto BIO-GEEC para ser muestreados.

Figura 1

Ubicación geográfica de los puntos de muestreo



### ***Especies de la familia Asteraceae dentro del estudio***

Las especies de estudio que fueron seleccionadas se encuentran dentro de los tres plots designados por el proyecto BIO-GEEC. En los mismos se encuentra el suficiente material vegetal con el cual se puede trabajar y dichas especies además tienen una importancia ecológica y económica. De manera general los individuos de la familia Asteraceae se utilizan principalmente en planes de conservación de páramos ya que ayudan a preparar el suelo para la introducción de especies más sensibles y así mismo son un control natural de biomasa foránea de estos ecosistemas (Romoleroux et al., 2016). Las especies seleccionadas para realizar el estudio son: *Monticalia andicola*,

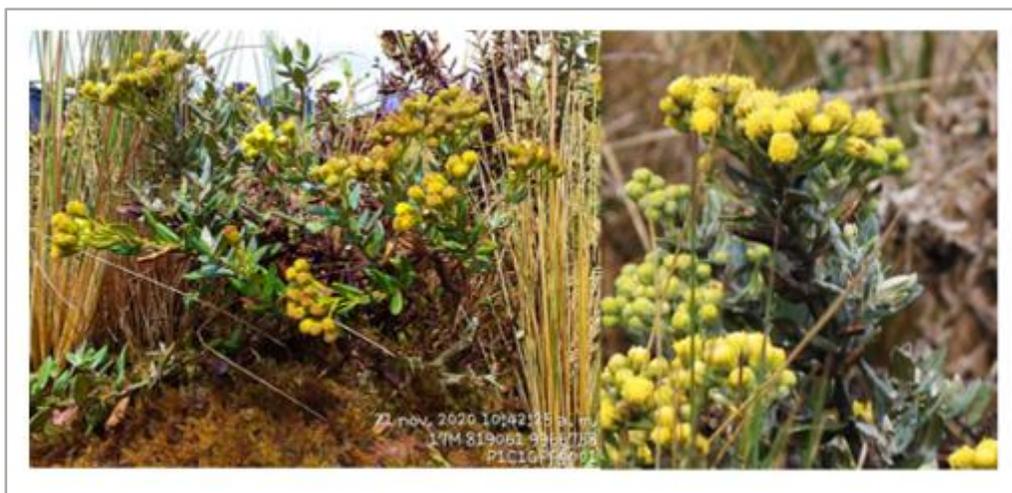
*Monticalia arbutifolia*, *Monticalia peruviana*, *Diplostegium rupestre*, *Diplostegium rhomboidale* y *Gynoxys Parvifolia*.

***Monticalia andicola* (Turcz.) C. Jeffrey**

Conocida comúnmente como matorral, esta especie nativa se encuentra ampliamente distribuida en las provincias de Azuay, Carchi, Pichincha, Tungurahua, Loja, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Chimborazo, Cotopaxi e Imbabura a una altura de entre 2000 a 4500msnm y dentro del área de estudio se la encontró en los plots 1 y 3. Como se muestra en la Figura 2 es un arbusto densamente ramificado de hasta 60cm cuyas hojas crecen pegadas al tallo y en tiempo de florecimiento posee flores abundantes y amarillas. Adicionalmente, se ha reportado que este género tiene propiedades antifúngicas y antitumorales (Calisto, 2019).

**Figura 2**

*Ejemplar de Monticalia andicola*



***Monticalia arbutifolia* (Kunth) C. Jeffrey**

Conocida comúnmente como romero, esta especie nativa se encuentra distribuida a lo largo de las provincias de Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha y Tungurahua a una altura de entre 2500 a 4500msnm; en el área de estudio se la encontró únicamente en el plot 3. Es un arbusto escandesciente de hasta 1.5m de alto, sus hojas crecen pegadas al tallo y sus flores son de color amarillo (Figura 3). Además se ha reportado que este género tiene propiedades antitumorales y antifúngicas (Romoleroux et al., 2016).

**Figura 3**

*Ejemplar de Monticalia arbutifolia*



***Monticalia peruviana* (Pers.) C. Jeffrey**

Esta especie nativa del país la se encuentra en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha y Tungurahua a una altura de entre 2500 a 4500msnm, en el área de estudio se la encontró en los plots 2 y 3. Es un arbusto con tallos teretes cuyas ramas se encuentran densamente foliadas y sus flores son de color

amarillo (Figura 4). Su género de manera general se ha reportado que posee propiedades antitumorales y antifúngicas (Calisto, 2019).

#### Figura 4

Ejemplar de *Monticalia peruviana*



#### *Gynoxys parvifolia* Cuatrec.

Esta especie se la conoce comúnmente como Chamato y se encuentra ampliamente distribuida en las provincias de Azuay, Cañar, Tungurahua, Pichincha, Sucumbíos, Napo, Cotopaxi, Loja, Carchi y Chimborazo a una altura de entre 3000 a 4000msnm, en la zona de estudio se la encontró únicamente en el plot 3. Es un arbusto nativo de hasta 2m de alto, posee tallos teretes y sus inflorescencias son de color amarillo (Figura 5). Se lo utiliza como materia prima para leña y forraje además de que es considerada como una especie apícola (Romoleroux, Cárate, Eler, & Navarrete, 2017).

**Figura 5**

Ejemplar de *Gynoxys parvifolia*

***Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.**

Su nombre común es algodoncillo de páramo, esta especie nativa se encuentra distribuida en el país en las provincias de Azuay, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pastaza, Pichincha y Tungurahua a una altura de entre 3000 a 5000msnm; dentro del área de estudio se la encontró en los plots 1 y 2. Como se observa en la Figura 6 es un arbusto muy ramificado de hasta 1m de alto, sus hojas se encuentran recubiertas por pelos para soportar las bajas temperaturas a las cuales se encuentran expuestas y sus flores son de color amarillo. Dentro de este género se encuentran especies de carácter endémico y que están en algún nivel de riesgo según la UICN (Calisto, 2019).

**Figura 6**

Ejemplar de *Diplostephium rupestre*



***Diplostephium rhomboidale* Cuatrec.**

Esta especie nativa del país se encuentra distribuida únicamente en las provincias de Carchi, Napo y Pichincha a una altura de entre 3000 a 4500msnm, dentro del área de estudio se la encontró en los plots 2 y 3. Como se observa en la Figura 7 es un arbusto muy ramificado de hasta 3m de alto, es tomentoso y se torna negruzco hacia sus partes viejas; sus flores son de color violeta o marrón dependiendo del estado en el que se encuentre la planta. En este género se reportan varias especies de carácter endémico y que están en algún nivel de riesgo según la UICN (Pedraza et al., 2004).

**Figura 7**

Ejemplar de *Diplostegium rhomboidale*



### **Estrategias para conservación de especies vegetales**

#### ***Bancos de germoplasma y herbarios***

Por medio de los bancos de germoplasma se puede obtener un repositorio de recursos fitogenéticos de especies de interés o que se encuentran en peligro de extinción. Esto por medio de la preservación de semilla, tejidos o plantas enteras; con la finalidad de investigar, mejorar o incluso conservar *ex situ* dichas especies con varios fines en los que es importante reducir los riesgos de pérdida y de contaminación física o genética del material vegetal (Condón & Rossi, 2018).

Los herbarios son una colección de ejemplares vegetales completos los cuales fueron recolectados, secados, prensados y montados para su conservación. Este método se lo utiliza para estudios botánicos de plantas que tienen un interés ecológico, socioeconómico, que se encuentran en peligro de extinción o son endémicas. Esto con el objetivo de tener un documento para estudiar la diversidad, textura, color y

estructuras que poseen dichas plantas y a su vez tener un registro histórico en tiempo y espacio de las mismas. Al igual que el banco de germoplasma esta es una estrategia de conservación *ex situ* (Fernández, 2015).

### ***Germinación in vitro de semillas***

Las semillas de las especies de la familia Asteraceae presentan una viabilidad baja por lo que su propagación por métodos convencionales es deficiente. Es por ello que, el emplear métodos como germinación *in vitro* podría ser una solución para aumentar la tasa de germinación mediante el uso de fitorreguladores como giberelinas (Castillo, 2014). Por medio de esta técnica adicionalmente se puede mantener el control de los parámetros determinantes en el rompimiento de la latencia de las semillas como lo son la temperatura, la luz y humedad, evitando de esta manera que agentes externos como condiciones ambientales o plagas intervengan en la tasa de germinación (Pérez & Castañeda, 2017). Otra de las ventajas que se tiene a través de este método, es que es un sistema en el que se puede obtener un mayor número de plantas en menor tiempo. Este método de conservación *ex situ* es un paso previo a la aclimatación y reintroducción de las especies a su medio de ser necesario en algún punto (Castillo, 2014) .

Es necesario realizar investigaciones útiles para la conservación de los páramos al ser considerados un hotspot por la biodiversidad que albergan y por las potenciales amenazas como el cambio climático que los mismos enfrentan. La presente investigación busca dar una línea base que ayude con esta problemática; por medio del estudio morfológico, de viabilidad y germinación de las seis especies seleccionadas. Esto ayudará al establecimiento de un banco de semillas alto andinas (por sus siglas en inglés HANS-BANK) en la Universidad de las Fuerzas Armadas.

### **Capítulo III: Metodología**

#### **Recolección y tratamiento preliminar del material vegetal**

El material vegetal utilizado en los ensayos se obtuvo del Parque Nacional Cayambe Coca, en donde se recolectó los frutos maduros de diez plantas por especie entre noviembre del 2020 hasta junio del 2021, se los guardó en bolsas de papel y se las etiquetó con el código de acceso fijado por el proyecto. Cada muestra fue transportada al laboratorio en el que se extrajeron las cipselas (semillas), se las dejó secar a temperatura ambiente de tres a cinco días dependiendo de la humedad y se las almacenó en Cajas Petri a 5°C en oscuridad por un máximo de ocho meses; además, se realizó una ficha técnica y registro fotográfico de cada recolección (Masini et al., 2015).

#### **Descripción de las especies**

Por medio de las fichas de muestreo tomadas en campo se realizó un informe de la distribución, forma de vida, hábitat, descripción de flor, fruto, hoja, tallo, semillas y presencia de plagas. Adicionalmente se realizó una revisión bibliográfica para complementar las mismas (Masini et al., 2015).

#### **Descripción morfológica de las semillas**

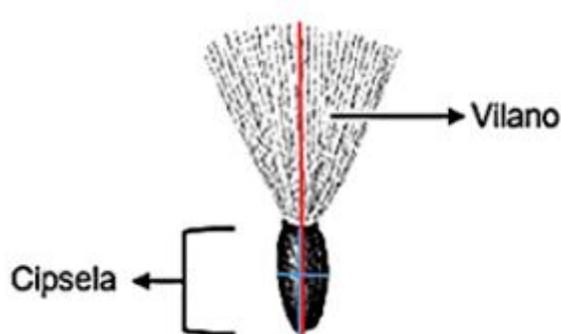
Se evaluaron cuatro parámetros para cada una de las seis especies de estudio, los cuales fueron: (1) Dimensionamiento; (2) Pesaje; (3) Estado de madurez de las semillas y (4) Número de semillas por flor (Masini et al., 2015).

### **Dimensionamiento**

Se utilizaron 100 semillas de cada especie a las que se colocó sobre papel milimetrado como referencia y por medio de una fotografía realizar con el programa ImageJ versión 1.52p las mediciones del largo y ancho de la cipsela y del largo de la cipsela incluyendo el vilano (Figura 8).

### **Figura 8**

*Estructuras analizadas en el dimensionamiento de las semillas*



*Nota.* La figura muestra el largo del fruto (línea roja) y largo-ancho de la cipsela (línea azul), estructuras que fueron medidas en el análisis de dimensionamiento en las semillas de las especies de estudio.

### **Pesaje**

Se seleccionaron diez lotes de 100 semillas para cada especie y se las colocó en cajas Petri para obtener el peso por medio de una balanza de precisión.

### **Estado de madurez de las semillas**

Se realizó el conteo del número de semillas maduras e inmaduras presentes en un total de 100 semillas en los meses de recolección, esto por medio de su color.

Adicionalmente, a través de este parámetro y por observaciones realizadas campo se reportó el estado fenológico de las especies estudiadas.

### ***Número de semillas por flor***

A la par del procesamiento del material vegetal se efectuó el conteo del número de semillas encontradas por especie en un total de 50 flores en los meses de recolección.

### **Pruebas de viabilidad de las semillas**

Para cada una de las seis especies de estudio se hizo uso de un total de 100 semillas a las que se les realizó el tratamiento recomendado para la familia Asteraceae (Internacional Seed Testing Association, 2016). El procedimiento se explica a continuación:

#### ***Preparación de la solución de tinción***

Se realizó una solución tampón con 1.816g de ortofosfato dihidrógeno de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 2.842g fosfato monobásico de sodio anhidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) con un pH de 6.7 en 500mL de agua destilada. A la misma se adicionó 5g de 2, 3, 5-Trifenil-2H-Tetrazolio Cloruro (TZ) para obtener una solución 1%.

#### ***Preparación pre-tinción***

Se seleccionaron al azar 100 semillas maduras de cada especie de estudio y se las mantuvo en imbibición en agua por 18h, pasado ese tiempo se retiró la testa para exponer al embrión y facilitar el contacto con la solución de TZ al 1%. En este paso

adicionalmente se contó el número de semillas vacías encontradas en la muestra seleccionada.

### ***Tratamiento de tinción***

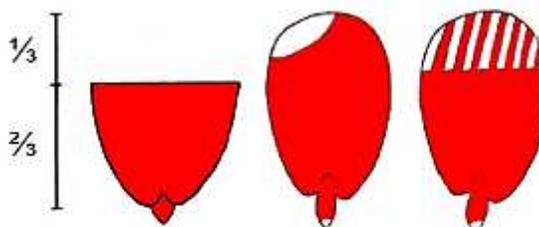
Se colocaron los embriones en una solución al 1% de 2, 3, 5-Trifenil-2H-Tetrazolio Cloruro (TZ) y se los incubó por tres horas a una temperatura de 30°C.

### ***Preparación pre-evaluación***

Se lavaron y sumergieron en agua los embriones para evitar su decoloración y deshidratación, posteriormente se realizó la determinación del tejido no viable permitido el cual solo puede ser  $\frac{1}{3}$  de radícula medido desde su punta,  $\frac{1}{2}$  del extremo distal de los cotiledones o  $\frac{1}{3}$  del extremo distal de los cotiledones (Figura 9). Parámetro empleado para establecer el porcentaje de embriones viable y no viables en cada una de las especies de estudio.

### **Figura 9**

*Patrones de coloración empleados para la determinación de embriones viables*



*Nota.* La figura muestra los patrones de coloración y el tejido no viable permitido empleados para determinar la viabilidad de las semillas en las especies de interés de estudio. Tomado de *International Rules for Seed Testing* (pag 6-21), por International Seed Testing Association, 2016.

## Ensayos de germinación *in vitro*

### ***Desinfección de las semillas***

Se realizó el protocolo propuesto por Pérez & Castañeda (2017). Para ello se seleccionó al azar una muestra de 200 semillas maduras por especie, las cuales fueron divididas en cuatro tubos falcon y se procedió a tratarlas de la siguiente manera:

1. Se realizó un lavado inicial con agua corriente, seguido de un lavado con alcohol al 70% por un minuto.
2. Se las enjuagó con agua destilada y posteriormente se las agitó en hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 1, con dos gotas de Tween 20 por cinco minutos.
3. Finalmente se realizó lavados en agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar, la misma que fue previamente desinfectada y expuesta a luz UV por 30 minutos

Las semillas ya desinfectadas se sembraron en medio MS  $\frac{1}{2}$  y se las mantuvo a condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad. La toma de datos del número de semillas contaminadas, germinadas, necrosadas u oxidadas se la realizó dos semanas posteriores a la siembra, tiempo promedio de aparecimiento de hongo y bacteria endógenas y exógenas (Laguna et al., 2019).

**Tabla 1**

*Concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en el ensayo de desinfección*

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de NaClO (%)</b>
<b>TD1</b>	0
<b>TD2</b>	5
<b>TD3</b>	5.5
<b>TD4</b>	6

*Nota.* La tabla muestra los tratamientos de desinfección (TD) empleados en el ensayo con sus respectivas concentraciones de hipoclorito de sodio.

### ***Pruebas de germinación in vitro***

La unidad experimental fue de diez semillas en estado maduro por frasco de vidrio con 20mL de medio. Se manejaron cuatro repeticiones por tratamiento con un total de 120 semillas evaluadas por especie a las que se empleó el protocolo seleccionado en el ensayo de desinfección. En una cámara de flujo laminar previamente preparada se sembraron las semillas en medio MS  $\frac{1}{2}$  enriquecido con diferentes concentraciones de ácido giberélico. La composición del medio de cultivo empleado en el ensayo se resume en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Medio de cultivo recomendado para la germinación de semillas de la familia Asteraceae*

<b>Componente (mg/L)</b>	<b>TG1</b>	<b>TG2</b>	<b>TG3</b>
<b>Sales MS (1/2)</b>	2165	2165	2165
<b>Sacarosa</b>	30000	30000	30000
<b>Bactogar</b>	8000	8000	8000
<b>Ácido giberélico (AG<sub>3</sub>)</b>	0	0.5	1
<b>pH</b>	5.8	5.8	5.8

*Nota.* La tabla muestra los tratamientos de germinación (TG) empleados en el ensayo, con los componentes de los medios de cultivo y las diferentes concentraciones de AG<sub>3</sub> con las que fueron enriquecidos.

Se mantuvo los frascos en una cámara de germinación en condiciones ambientales controladas con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 20°C y con una humedad relativa de entre 55 y 70%. Durante un mes se contó tres veces por semana la cantidad de semillas que germinaron por especie en los tratamientos y el tiempo en el que la primera germinó (Pérez & Castañeda, 2017).

### **Análisis estadístico**

#### ***Diseño experimental***

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para los ensayos de desinfección y germinación de las semillas. Los datos que no siguieron una distribución normal se analizaron por medio de una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y una prueba de diferencias de rangos múltiples entre las medias de Duncan ( $p < 0.05$ ), por medio del software R versión 4.1.1 (Negrin & Zalba, 2008).

## **Análisis gráficos**

### ***Desinfección***

Las especies en las que no se presentó diferencias significativas en el análisis estadístico de los tratamientos empleados, este se seleccionó por medio del porcentaje de semillas contaminadas y el que resultó ser menos invasivo para los explantes (Pérez & Castañeda, 2017).

### ***Germinación***

Para el análisis gráfico de los datos de la germinación y para determinar si los tratamientos tienen influencia en la misma se utilizaron los siguientes gráficos descriptivos y analíticos (González & Orozco, 2017).

### **Gráficas descriptivas**

#### **Capacidad de germinación**

Se define como el porcentaje final de semillas germinadas, el mismo permite observar el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa final.

#### **Germinación acumulada**

Es el porcentaje de semillas germinadas tres veces por semana para observar la uniformidad de los datos y el pico de germinación.

## Gráficos analíticos

### Índice de latencia

Da información acerca del tiempo necesario para el inicio de la germinación y la influencia del tratamiento en el rompimiento de la latencia de las semillas.

### Velocidad media de germinación

Es el número de semillas germinadas con el tiempo dependiendo del tratamiento. El mismo se define cómo:

$$VMG = \frac{\sum n_i}{t}$$

**Dónde:** VMG= velocidad media de germinación,  $n_i$ = número de semillas germinadas el día  $i$ ,  $t$ = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

## Capítulo IV: Resultados

### Descripción morfológica de las especies

Por medio de observaciones realizadas en campo y bibliografía se realizó una descripción general de las especies vegetales. Las mismas en las que se observa información de forma de vida, hábitat, una descripción morfológica y fisiológica de sus estructuras enfatizando las características de las semillas como forma, color, textura, dispersión, datos adicionales y de distribución dentro del país.

Los resultados se los presenta a manera de fichas para las especies: *Monticalia andicola* (Anexo 1), *Monticalia arbutifolia* (Anexo 2), *Monticalia peruviana* (Anexo 3), *Diplostephium rupestre* (Anexo 4), *Diplostephium rhomboidale* (Anexo 5) y *Gynoxys parvifolia* (Anexo 6). A continuación, en la Figura 10 se muestra un ejemplo de las fichas realizadas para cada especie:

Figura 10

Ficha ejemplo de la descripción general, morfológica y fisiológica de las especies

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE	
 <p>Foto: Pazmiño, G.</p>	<b>Nombre Científico:</b> <i>Monticalia peruviana</i> (Pers.) C. Jeffrey
	<b>Nombre Común:</b> No se registra
	<b>Familia:</b> Asteraceae
	<b>Rango altitudinal:</b> 2500-4500msnm
	<b>Forma de vida:</b> Arbusto
	<b>Altura:</b> Hasta 2m de alto
MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA ESPECIE	
<b>Flor</b>	Involucro de brácteas campanulado y corola amarilla ligulada
<b>Hojas</b>	Alternas o dísticas discoides
<b>Tallo</b>	Teretes con ramas densamente foliadas, glabras y sin estípulas
<b>Fruto</b>	Coronado por un vilano blanco
<b>Semilla</b>	<b>Forma:</b> Cipsela oblonga
	<b>Color:</b> Verde (Inmaduras) a marrón (madura)
	<b>Textura:</b> Rugosa
	<b>Dispersión del fruto:</b> Se dispersa a través del viento por medio del papus.
DATOS ADICIONALES	DISTRIBUCIÓN
<b>Estatus UICN:</b> Ninguno  <b>Usos:</b> Restauración ecológica  <b>Propiedades:</b> Antifúngico y antitumoral.	Azuay, Bolívar, Cañar, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha, Tungurahua. 
<b>Fuente:</b> Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Ertler, R., Navarrete, H. 2019. <i>Monticalia peruviana</i> En: <i>Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi</i> . Version 2019.0 <a href="https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Monticalia%20peruviana">https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Monticalia%20peruviana</a> .	

## Descripción morfológica de las semillas por especie

Se realizó una evaluación de las semillas en las que se incluyeron parámetros relevantes para su germinación y conservación, como lo son: número de semillas por flor, estado de madurez de las semillas, peso y dimensiones.

### **Número de semillas por flor**

Se realizó el conteo de las semillas encontradas en 50 flores para cada una de las especies de estudio (Tabla 3). Se encontró que las especies con mayor número de semillas fueron *M. andicola*, *D. rupestre* y *M. peruviana*, de manera contraria *M. arbutifolia*, *D. rhomboidale* y *G. parvifolia* son las que menor cantidad de semillas presentaron.

**Tabla 3**

*Número promedio de semillas encontradas por flor en cada especie estudiada.*

<b>Especie</b>	<b>Número de semillas por flor</b>
<i>Monticalia andicola</i>	43±7
<i>Monticalia arbutifolia</i>	22±3
<i>Monticalia peruviana</i>	28±3
<i>Gynoxys parvifolia</i>	17±2
<i>Diplostephium rupestre</i>	37±10
<i>Diplostephium rhomboidale</i>	17±2

*Nota.* La tabla muestra los valores promedio y las variaciones del número de semillas encontradas en 50 flores para cada especie expresada en unidades.

### **Estado de madurez de las semillas**

El análisis del estado de madurez de las semillas se lo realizó durante los ocho meses de recolección para una muestra mensual de 100 semillas en cada una de las especies. Los resultados se expresan en porcentaje de semillas maduras e inmaduras contabilizadas en cada mes, usando como parámetro de clasificación el color de las semillas.

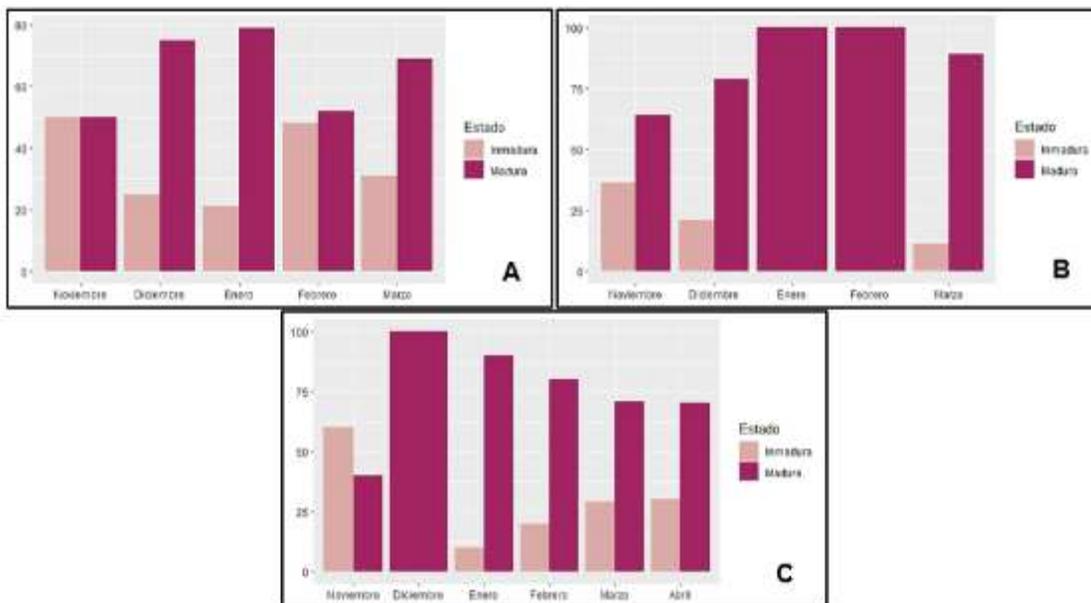
### **Género *Monticalia***

Se encontró que los picos de madurez en *Monticalia andicola* y *Monticalia peruviana* se observaron en los meses de diciembre y enero con un 75 y 79% (Figura 11A) y 100 y 90% de semillas en estado maduro (Figura 11C) respectivamente. En el caso de *Monticalia arbutifolia* este pico se registró en los meses de enero y febrero con un 100% de semillas maduras (Figura 11B).

Los meses restantes de estudio se puede observar que en su mayoría el porcentaje de semillas en estado maduro supera a las inmaduras en las tres especies (Figura 11). Con excepción del mes de noviembre, en el que *M. andicola* presentó igual porcentaje de semillas maduras e inmaduras (Figura 11A) y en el que *M. peruviana* registró un mayor porcentaje de semillas inmaduras (Figura 11C). Adicionalmente, se encontró que *M. andicola* y *M. arbutifolia* entraron en estado vegetativo en los meses de abril a junio y *M. peruviana* en los meses de mayo y junio.

Figura 11

*Estado de madurez de las semillas del género Monticalia en los meses de recolección*

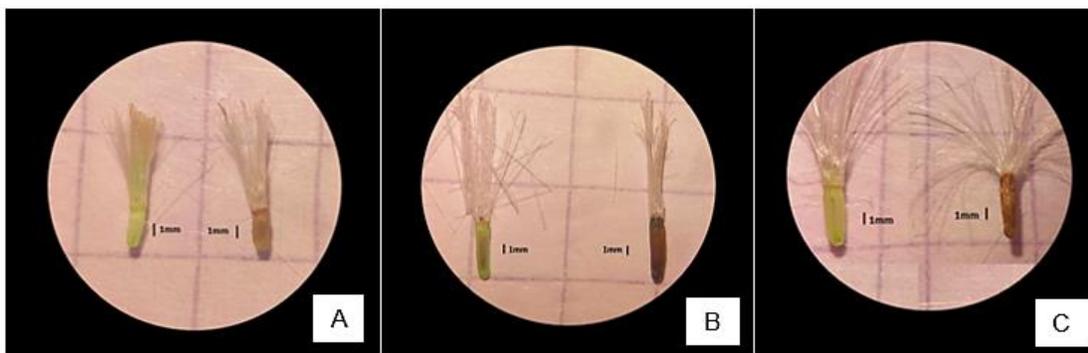


*Nota.* La figura muestra los porcentajes de inmadurez y madurez observados en las semillas de las tres especies del género *Monticalia* estudiadas: (A) *M. andicola*, (B) *M. arbutifolia* y (C) *M. peruviana*.

De manera general en el género *Monticalia* las especies analizadas presentaron semillas de color verde en su estado inmaduro a diferencia de las semillas en estado maduro que presentaban un color marrón (Figura 12). El mismo se utilizó como criterio de clasificación y selección de semillas para los ensayos de viabilidad, desinfección y germinación.

## Figura 12

Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras para el género *Monticalia*



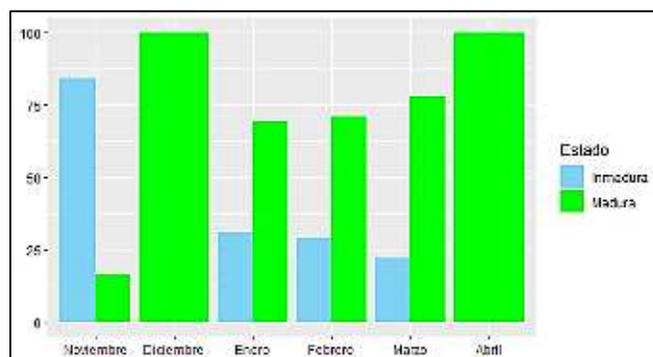
*Nota.* En la figura se observan semillas en estado inmaduro (verde) y maduro (marrón) para las especies del género *Monticalia*: (A) *M. andicola*, (B) *M. arbutifolia* y (C) *M. peruviana* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

## Género *Gynoxys*

La especie *Gynoxys parvifolia* presentó la mayor cantidad de semillas maduras en los meses de diciembre y abril con un porcentaje de 100% de semillas en estado. Por el contrario, en el mes de noviembre se registró que el porcentaje de semillas inmaduras superó notoriamente al porcentaje de semillas maduras (Figura 13) y en los meses de mayo y junio esta especie se halló en estado vegetativo.

### Figura 13

*Estado de madurez de las semillas de Gynoxys parvifolia en los meses de recolección*

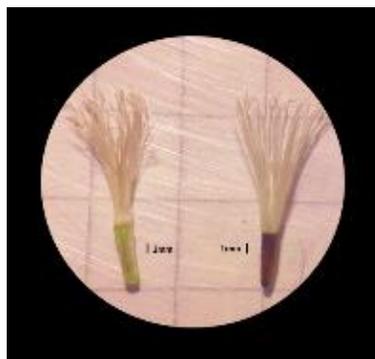


*Nota.* En la figura se puede observar los porcentajes de inmadurez y madurez encontrados en semillas de *Gynoxys parvifolia*.

En la especie *Gynoxys parvifolia* las semillas en estado inmaduro presentaron un color verde y las semillas en estado maduro presentaron un color negro (Figura 14). El mismo se utilizó como criterio de clasificación y selección de semillas para el resto de ensayos realizados en el estudio.

### Figura 14

*Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras en Gynoxys parvifolia*



*Nota.* La figura muestra semillas en estado inmaduro (verde) y maduro (negro) para la especie *Gynoxys parvifolia* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

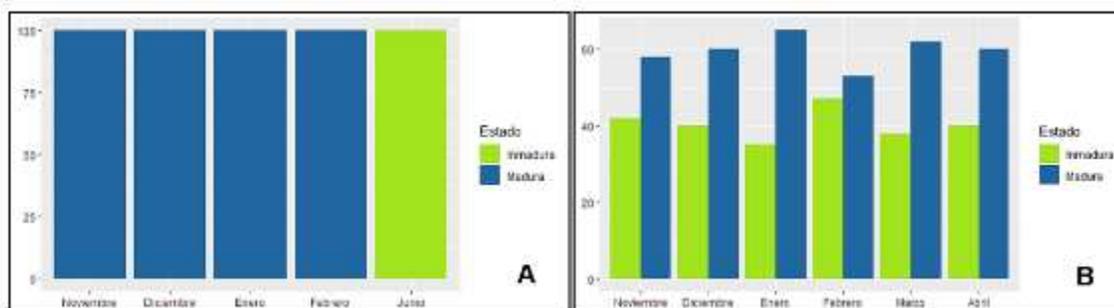
## Género *Diplostephium*

Par la especie *Diplostephium rupestre* los picos de madurez se dieron en los meses de noviembre a febrero con el 100% de semillas en estado maduro (Figura 15A). Sin embargo, la calidad de las semillas disminuyó en los meses de enero y febrero, razón por la cual, muy pocas semillas recolectadas en este tiempo fueron usadas en los ensayos a lo largo de la investigación. A partir del mes de marzo a mayo esta especie se halló en estado vegetativo y en el mes de junio todas las semillas evaluadas se hallaron en estado inmaduro.

Para la especie *Diplostephium rhomboidale* se encontró que en todos los meses el porcentaje de semillas maduras supero al de semillas inmaduras, observándose el mayor pico de madurez en el mes de enero con un porcentaje de 65% de semillas en ese estado (Figura 15B). En los meses de mayo y junio esta especie entro en un estado vegetativo.

### Figura 15

Estado de madurez de semillas del género *Diplostephium* en los meses de recolección

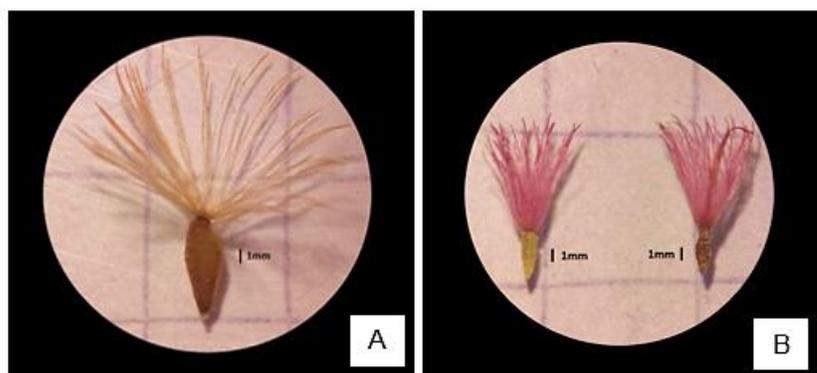


*Nota.* La figura muestra los porcentajes de inmadurez y madurez hallados en las semillas de las dos especies del género *Diplostephium* estudiadas: (A) *D. rupestre* y (B) *D. rhomboidale*.

Para ambas especies evaluadas en el género *Diplostephium* sus semillas presentaron color verde en su estado inmaduro y las semillas en estado maduro adoptaron un color marrón (Figura 16). El mismo se empleó como criterio de clasificación y selección de semillas para los ensayos restantes del estudio.

### Figura 16

*Criterio de clasificación de semillas maduras e inmaduras para el género Diplostephium*

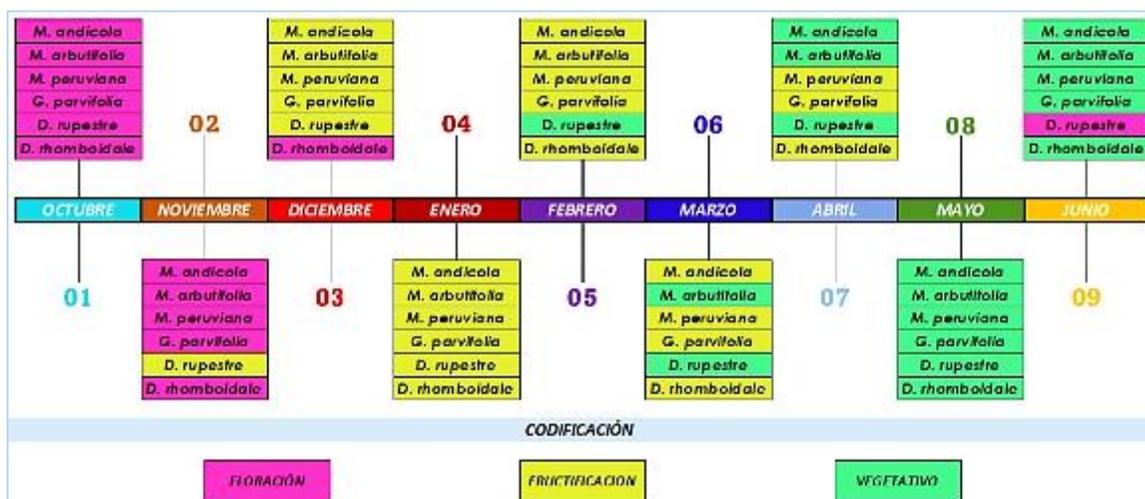


*Nota.* En la figura se observa a las semillas en estado inmaduro (verde) y maduro (marrón) para las especies del género *Diplostephium*: (A) *D. rupestre* y (B) *D. rhomboidale* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

La información de estado de madurez de las semillas en conjunto con observaciones realizadas en campo, se utilizaron para determinar el estado fenológico de las especies que se estudiaron a largo del proyecto. En la Figura 17 se detalló los meses en los que se encontró a las especies vegetales en estado de floración, fructificación y vegetativo.

Figura 17

Estado fenológico de las especies en los meses de recolección



### Peso promedio de las semillas por especie

Se encontró que las semillas más pesadas fueron las de *D. rupestre*, *M. peruviana* y *G. parvifolia*. De manera contraria las más livianas fueron las de *M. arbutifolia*, *D. rhomboidale* y *M. andicola*. La Tabla 4 muestran los resultados del pesaje de un lote de 100 de semillas para cada una de las especies de estudio en miligramos.

Tabla 4

Peso promedio en miligramos de un lote de 100 semillas por cada especie estudiada.

Especie	Peso (mg)
<i>Monticalia andicola</i>	19±1
<i>Monticalia arbutifolia</i>	38±4
<i>Monticalia peruviana</i>	78±3
<i>Gynoxys parvifolia</i>	52±5
<i>Diplostephium rupestre</i>	98±5
<i>Diplostephium rhomboidale</i>	23±1

### **Dimensionamiento promedio de las semillas por especie**

Los resultados del dimensionamiento del largo del fruto (cipsela y vilano) y del ancho y largo de las cipselas (Figura 8) para cada una de las especies de estudio en milímetros se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Dimensionamiento promedio de las semillas por cada especie estudiada.*

<b>Especie</b>	<b>Largo fruto (mm)</b>	<b>Largo cipsela (mm)</b>	<b>Ancho cipsela (mm)</b>
<i>Monticalia andicola</i>	6.399±0.978	1.818±0.431	0.559±0.111
<i>Monticalia arbutifolia</i>	10.058±0.932	3.437±0.379	0.558±0.087
<i>Monticalia peruviana</i>	10.332±1.419	2.953±0.511	0.637±0.107
<i>Gynoxys parvifolia</i>	12.088±1.914	3.191±0.651	0.789±0.169
<i>Diplostephium rupestre</i>	10.409±1.453	4.050±0.702	1.293±0.237
<i>Diplostephium rhomboidale</i>	3.661±0.552	1.192±0.187	0.362±0.080

*Nota.* En la tabla se evidencia las dimensiones promedio con sus variaciones del fruto (cipsela+vilano) y la cipsela de una muestra de 100 semillas por especie estudiada.

### **Prueba de viabilidad de las semillas**

Los resultados de viabilidad se los ilustra en porcentajes de semillas vacías, viables y no viables encontradas en la muestra de 100 semillas tomadas al azar en cada una de las especies. Se utilizó como criterio de evaluación el test colorimétrico con TZ para la determinación de tejido no viable permitido (Figura 9).

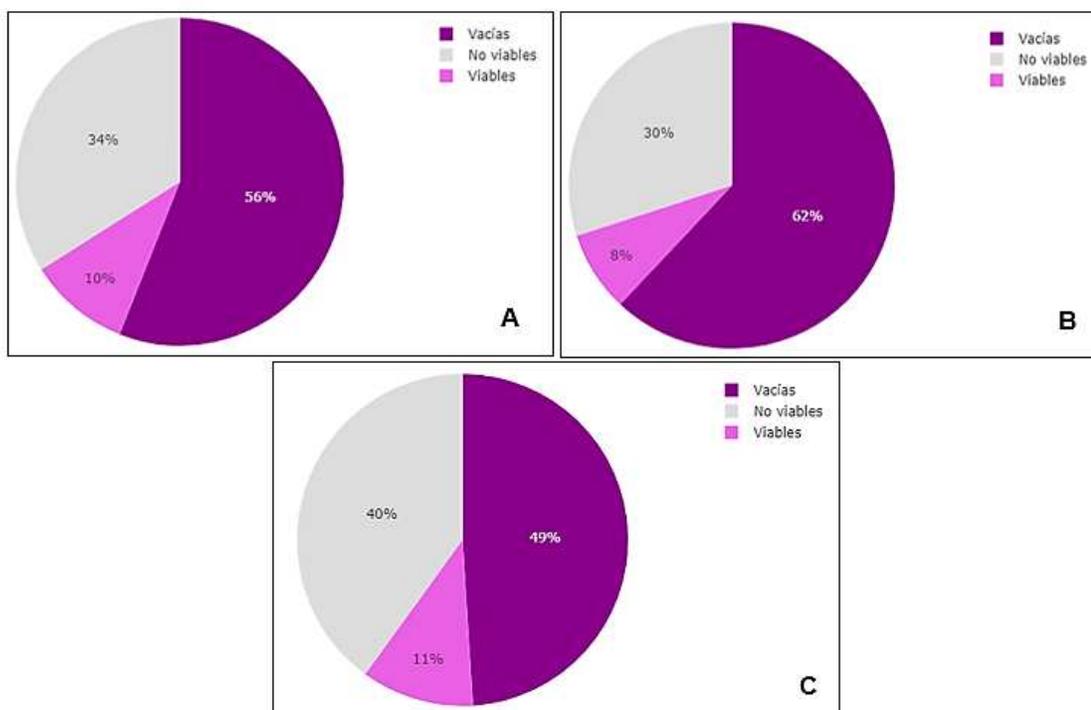
### **Género Monticalia**

En *Monticalia andicola* y *Monticalia arbutifolia* se encontró un mayor porcentaje de semillas vacías que de semillas con embrión, al contrario de *Monticalia peruviana* en la cual las semillas con embrión superaron al porcentaje de semillas vacías (Figura 18). De manera general las especies de este género presentaron un porcentaje de viabilidad bajo de 10% para *M. andicola* (Figura 18A) , 8% para *M. arbutifolia* (Figura 18B) y 11% para *M. peruviana* (Figura 18C).

El test colorimétrico con TZ permitió la determinación de embriones viables y no viables. Sin embargo, en *M. andicola* y *M. arbutifolia* a pesar de que se observó la tinción en las regiones que dan origen a estructuras importantes como la radícula esta fue tenue. Al contrario de lo observado en *M. peruviana* en la que la tinción fue más intensa (Figura 19).

**Figura 18**

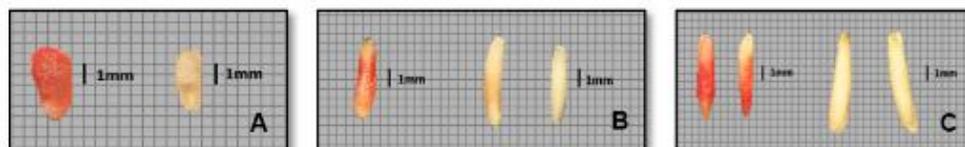
*Viabilidad de las semillas del género Monticalia*



*Nota.* En la figura se puede observar los porcentajes de semillas vacías, viables y no viables para las tres especies de *Monticalia* analizadas: (A) *M. andicola*, (B) *M. arbutifolia* y (C) *M. peruviana*.

**Figura 19**

*Patrones colorimétricos encontrados en los embriones del género Monticalia*



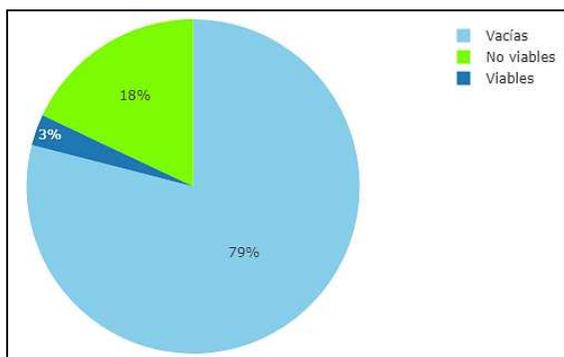
*Nota.* La figura muestra una comparación entre embriones viables (rojo) y no viables (blanco) para las especies del género *Monticalia*: (A) *M. andicola*, (B) *M. arbutifolia* y (C) *M. peruviana* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

## Género Gynoxys

Como se muestra en la Figura 20 en la especie *Gynoxys parvifolia* se observó que el porcentaje de semillas vacías supero al porcentaje de semillas con embrión y se registró una viabilidad de tan solo el 3%. La tinción de los embriones en esta especie fue intensa pero se evidenciaba que las estructuras que da lugar a la radícula no se tiñó o lo hacía de manera tenue (Figura 21).

### Figura 20

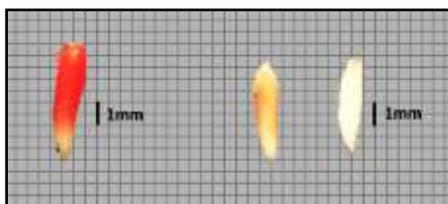
Viabilidad de las semillas de *Gynoxys parvifolia*



*Nota.* En la figura se observan los porcentajes de semillas vacías, viables y no viables encontradas en *Gynoxys parvifolia*.

### Figura 21

Patrones colorimétricos encontrados en embriones de *Gynoxys parvifolia*



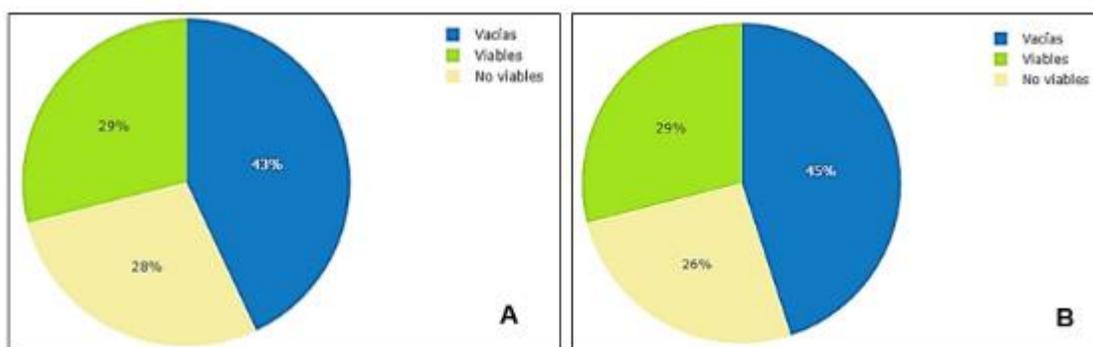
*Nota.* La figura muestra una comparación entre embriones viables (rojo) y no viables (blanco) en *Gynoxys parvifolia* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

### Género Diplostephium

En este género tanto para *Diplostephium rupestre* como para *Diplostephium rhomboidale* se observó que el porcentaje de semillas vacías fue inferior al porcentaje de semillas con embrión. Ambas especies fueron las únicas en las que se obtuvo que el porcentaje de embriones viables superó al de no viable con un 29% de viabilidad (Figura 22). La tinción tras el tratamiento con TZ en este género fue intensa y en todas las estructuras que generan partes vitales como radícula y hojas primarias (Figura 23).

#### Figura 22

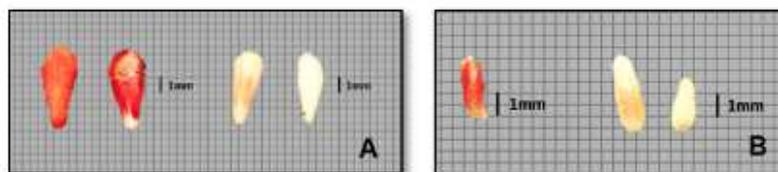
Viabilidad de las semillas del género Diplostephium



*Nota.* La figura muestra los porcentajes de semillas vacías, viables y no viables para las dos especies de *Diplostephium* analizadas: (A) *D. rupestre*, y (B) *D. rhomboidale*.

### Figura 23

Patrones colorimétricos encontrados en los embriones del género *Diplostephium*



**Nota:** En la figura se observa una comparación entre embriones viables (rojo) y no viables (blanco) para las especies del género *Diplostephium*: (A) *D. rupestre* y (B) *D. rhomboidale* vistas en el estereomicroscopio a 1x.

### Desinfección de las semillas

Por medio de la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que al menos uno de los tratamientos influyó sobre la cantidad de semillas contaminadas en todas las especies estudiadas. De manera general se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control TD1 el cual presentó un porcentaje muy alto de contaminación que el resto de tratamientos en los que se empleó hipoclorito de sodio como desinfectante.

Como se muestra en la Tabla 6 en algunas especies la diferencia entre los tratamientos TD2, TD3 y TD4 no es representativa y al no haber necrosis u oxidación de los explantes posterior a estos, el criterio de selección fue en función del porcentaje de contaminación reportado para cada una de las especies y en la menor concentración de hipoclorito de sodio empleado.

**Tabla 6**

Valores promedio de semillas contaminadas en cada tratamiento de desinfección para cada especie estudiada.

Especie	p-valor	Tratamientos %NaClO/min			
		TD1 0/5	TD2 5/5	TD3 5.5/5	TD4 6/5
<i>M. andicola</i>	0.003995	10.00 a	1.00 b	1.00 b	0.20 c
<i>M. arbutifolia</i>	0.001738	5.60 a	0.20 b	0.20 b	0.00 b
<i>M. peruviana</i>	0.019110	9.00 a	3.40 b	3.40 b	0.00 c
<i>G. parvifolia</i>	0.011910	8.60 a	5.40 b	0.60 c	1.20 b
<i>D. rupestre</i>	0.015950	4.20 a	0.60 b	0.40 b	0.40 b
<i>D. rhomboidale</i>	0.004349	5.40 a	2.00 a	0.00 b	0.00 b

Nota. Notación Duncan, valores con letras diferentes denotan que los tratamientos difieren entre ellos con un  $p < 0.05$ .

Tomando esto en consideración, para el género *Monticalia* se determinó que el tratamiento óptimo de desinfección es el TD4 (6%NaClO) con un porcentaje de contaminación del 2% para *M. andicola*, 0% para *M. arbutifolia* y 0% para *M. peruviana*. En el caso de los géneros *Gynoxys* y *Diplostephium* se seleccionó el tratamiento TD3 (5.5%NaClO) con un porcentaje de contaminación de 6% para *Gynoxys parvifolia*, 4% para *Diplostephium rupestre* y 0% para *Diplostephium rhomboidale*.

#### **Germinación *in vitro* de las semillas**

En el caso de *M. arbutifolia* el porcentaje de germinación fue del 3% en ausencia de AG<sub>3</sub> (control), las mismas no desarrollaron y se necrosaron 2 semanas posteriores a la siembra. En el resto de tratamientos para esta especie la germinación fue del 0% al

igual que en *G. parvifolia*, es por esto que no se contó con datos suficientes en estas especies para realizar un análisis estadístico y gráfico de este parámetro.

Para el resto de especies la prueba de Kruskal-Wallis realizada en esta etapa arrojó que ninguno de los tratamientos empleados influyó en el porcentaje de germinación de las semillas, al no haber diferencias significativas entre los tratamientos con ácido giberélico empleados. La Tabla 7 muestra los valores promedio de germinación de semillas encontradas en cada una de las especies a lo largo del mes de observación.

**Tabla 7**

*Valores promedio de semillas germinadas en cada tratamiento para cada una de las especies de estudio.*

Especie	Tratamientos concentraciones de AG <sub>3</sub>			
	p-valor	TG1 0 mg/L	TD2 0.5 mg/L	TD3 1 mg/L
<i>M. andicola</i>	0.6994	0.250 a	0.500 a	0.750 a
<i>M. arbutifolia</i>	NA	NA	NA	NA
<i>M. peruviana</i>	0.4397	4.00 a	5.00 a	4.00 a
<i>G. parvifolia</i>	NA	NA	NA	NA
<i>D. rupestre</i>	0.9208	9.50 a	9.50 a	9.50 a
<i>D. rhomboidale</i>	0.2065	7.00 a	8.50 a	7.50 a

*Nota.* Notación Duncan, valores con letras diferentes denotan que los tratamientos difieren entre ellos con un  $p < 0.05$ .

Por lo expuesto anteriormente, la selección del mejor tratamiento de germinación para las cuatro especies se lo hizo en función de la germinación acumulativa, la

capacidad germinativa, el tiempo de latencia y la velocidad media de germinación observada en cada uno de los procedimientos empleados.

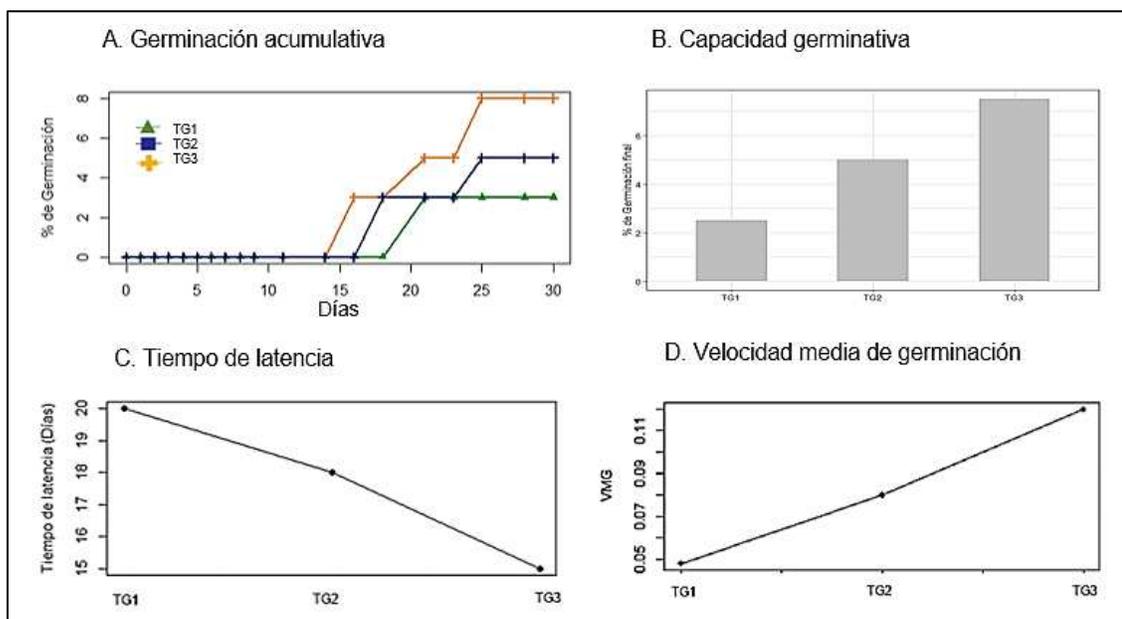
### **Germinación *in vitro* de semillas de *Monticalia andicola***

Por medio de las gráficas descriptivas en *M. andicola* para cada uno de los tratamientos se obtuvo que la germinación acumulativa tuvo un pico para el TG1 a los 21 días mientras que para el TG2 y el TG3 se dio a los 25 días (Figura 24A) y que capacidad germinativa para el TG1 fue de 2.5%, para el TG2 fue de 5% y para el TG3 fue de 7.5% (Figura 24B).

Por otro lado, las gráficas analíticas muestran que la ruptura de la latencia en el TG1 ocurrió a los 20 días, en el TG2 a los 18 días y en el TG3 a los 15 días (Figura 24C) y que la velocidad media de germinación mostrada para el TG1 fue de 0.048, para el TG2 fue 0.08 y para el TG3 fue 0.12 (Figura 24D). Además, las semillas que germinaron desarrollaron estructuras como radícula, hipocótilo, hojas primarias y hojas funcionales (Figura 25).

Figura 24

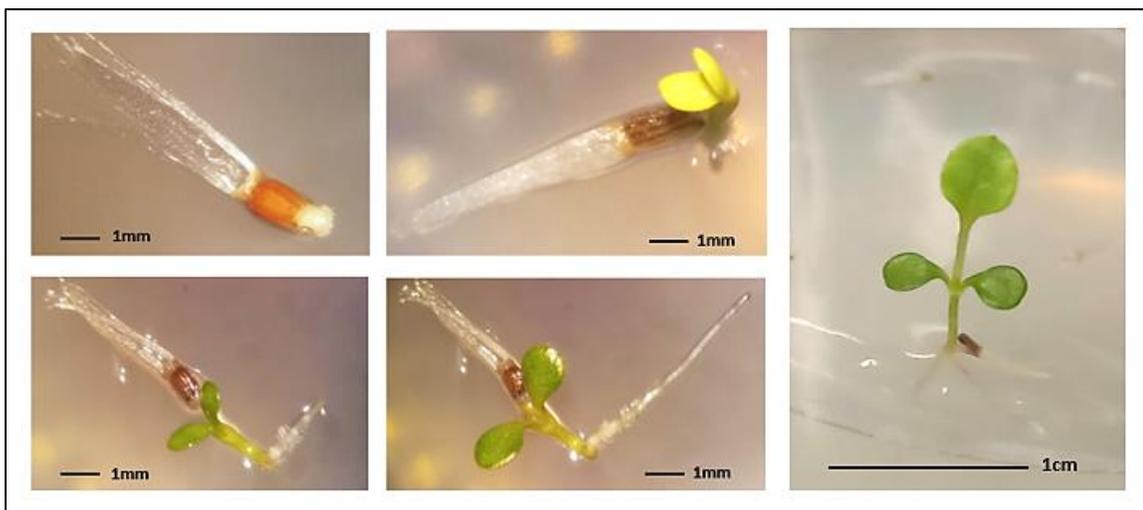
Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de *Monticalia andicola*



*Nota.* La figura muestra el comportamiento germinativo en *M. andicola* durante un mes de estudio por medio de gráficas descriptivas de germinación acumulativa (A) y capacidad germinativa (B) y de gráficas analíticas de tiempo de latencia (C) y velocidad media de germinación (D).

## Figura 25

*Germinación y desarrollo de plántulas de Monticalia andicola en el mes de estudio*



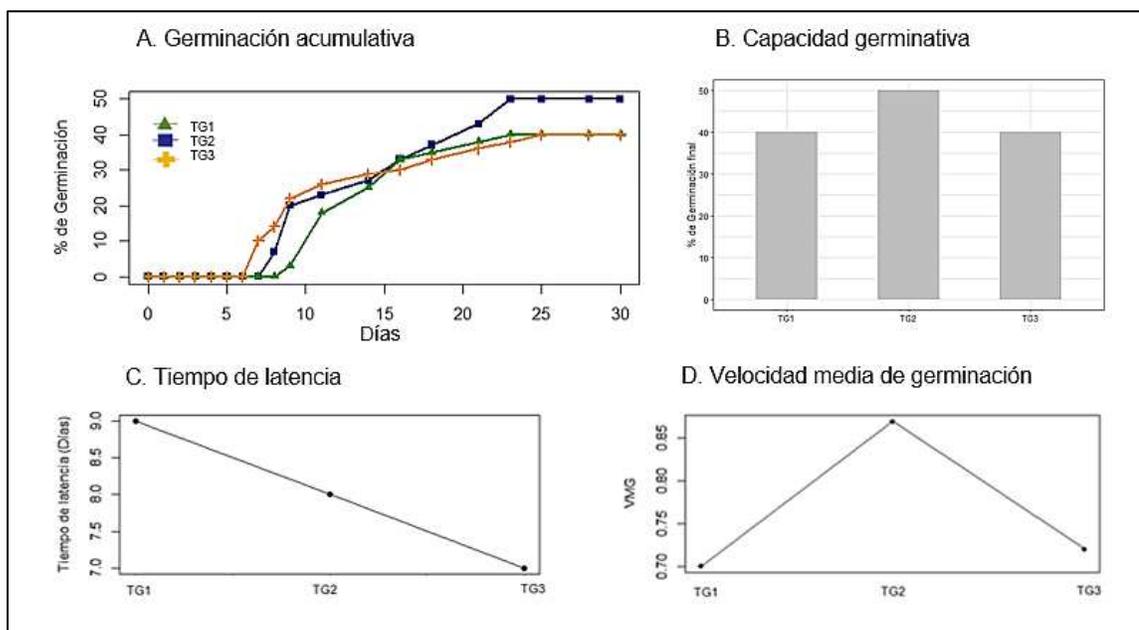
## ***Germinación in vitro de semillas de Monticalia peruviana***

En *M. peruviana* las gráficas descriptivas muestran que la germinación acumulativa tuvo un pico tanto para el TG1 como para el TG2 a los 23 días y el TG3 se dio a los 25 días (Figura 26A) y que la capacidad germinativa para el TG1 fue del 40%, para el TG2 fue del 50% y para el TG3 fue del 40% (Figura 26B).

Por otro lado, en las gráficas analíticas se observa que la ruptura de la latencia en el TG1 se dio a los 9 días, en el TG2 se dio a los 8 días y en el TG3 a los 7 días después de la siembra (Figura 26C) y que la velocidad de germinación mostrada para el TG1 fue 0.7, en el TG2 fue 0.87 y en el TG3 fue 0.72 (Figura 26D). Las semillas que germinaron desarrollaron en plántulas con el apareamiento de radícula, hipocótilo, hojas primarias y hojas funcionales (Figura 27).

Figura 26

Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de *Monticalia peruviana*



*Nota.* En la figura se muestra el comportamiento germinativo en *M. peruviana* durante un mes de estudio por medio de gráficas descriptivas de germinación acumulativa (A) y capacidad germinativa (B) y de gráficas analíticas de tiempo de latencia (C) y velocidad media de germinación (D).

## Figura 27

Germinación y desarrollo de plántulas de Monticalia peruviana en el mes de estudio



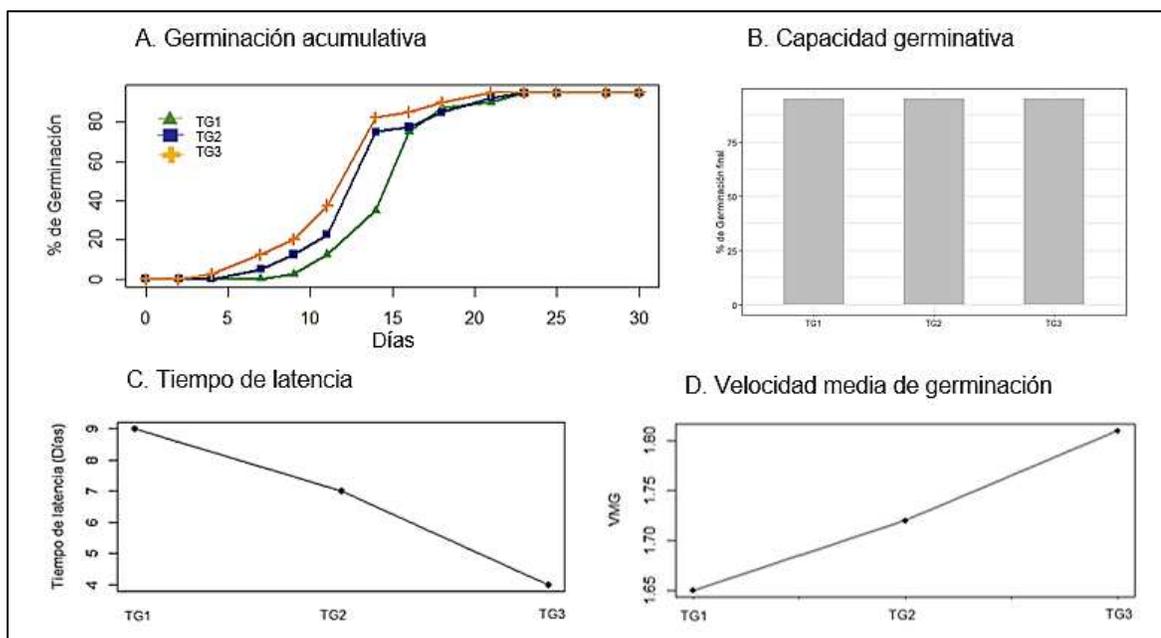
## Germinación in vitro de semillas de Diplostephium rupestre

En *D. rupestre* las gráficas descriptivas muestran que la germinación acumulativa tuvo un pico tanto para el TG1 como para el TG2 a los 23 días y en el TG3 se dio a los 21 días (Figura 28A). Además, de que la capacidad germinativa para todos los tratamientos empleados fue del 95% (Figura 28B).

Las gráficas analíticas por otra parte muestran que la ruptura de la latencia en el TG1 se dio a los 9 días, en el TG2 se dio a los 7 días y en el TG3 a los 4 días después de la siembra (Figura 28C) y que la velocidad de germinación mostrada para el TG1 fue 1.65, para el TG2 fue 1.72 y para el TG3 fue 1.81 (Figura 28D). Todas las semillas que germinaron desarrollaron estructuras como radícula, hipocótilo, hojas primarias y hojas funcionales (Figura 29).

**Figura 28**

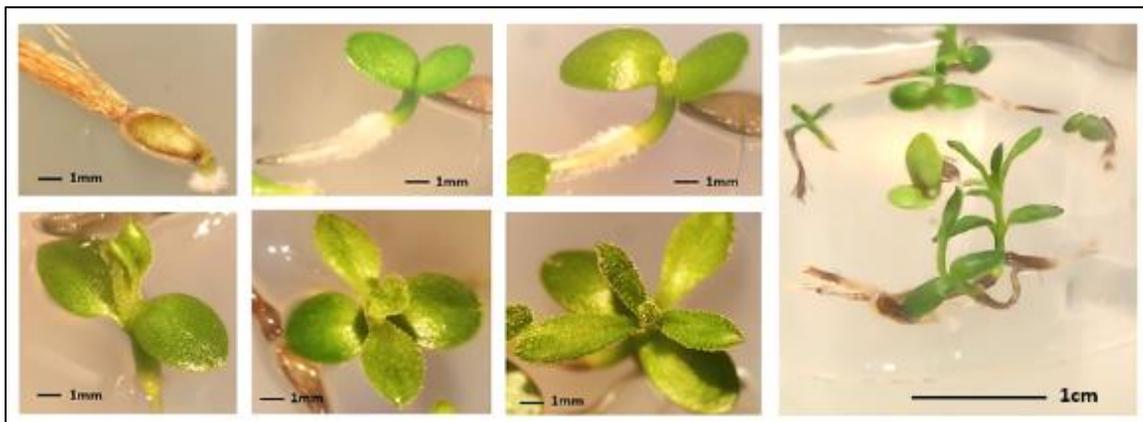
*Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de Diplostephium rupestre*



*Nota.* La figura muestra el comportamiento germinativo en *D. rupestre* durante un mes de estudio por medio de gráficas descriptivas de germinación acumulativa (A) y capacidad germinativa (B) y de gráficas analíticas de tiempo de latencia (C) y velocidad media de germinación (D).

## Figura 29

*Germinación y desarrollo de plántulas de Diplostephium rupestre en el mes de estudio*



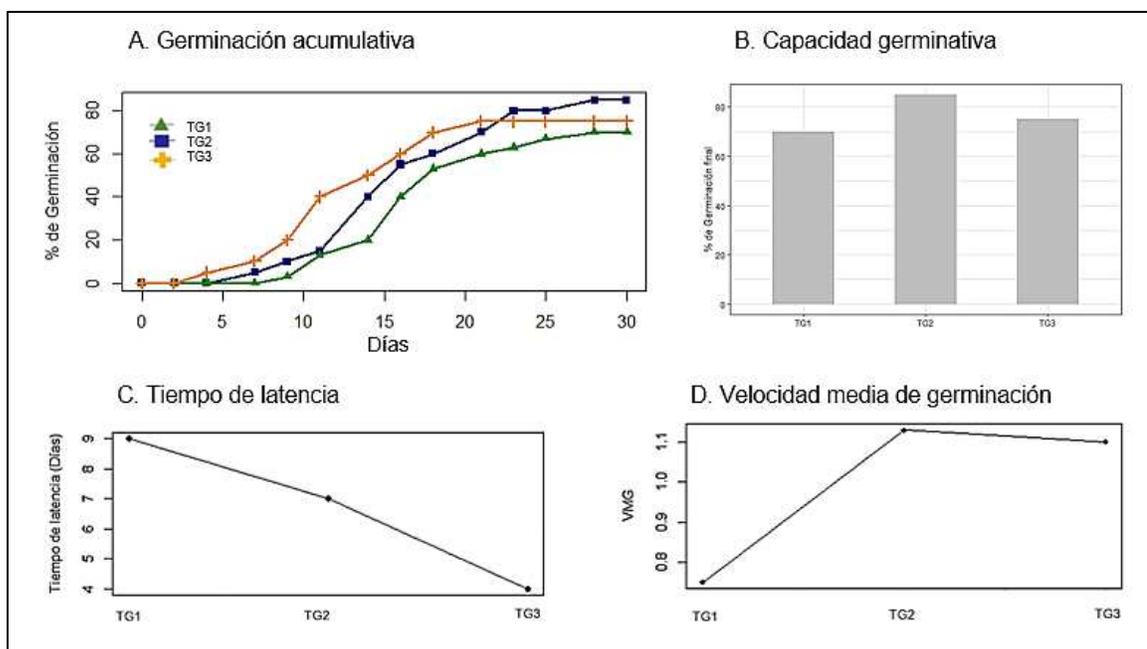
## **Germinación *in vitro* de semillas de Diplostephium rhomboidale**

El comportamiento germinativo para *D. rhomboidale* muestra en las gráficas descriptivas que la germinación acumulativa tuvo un pico tanto para el TG1 como para el TG2 a los 28 días mientras que en el TG3 se dio a los 21 días (Figura 30A). La capacidad germinativa para el TG1 fue del 70%, para el TG2 fue del 80% y para el TG3 fue del 85% (Figura 30B).

Las gráficas analíticas muestran que la ruptura de la latencia en el TG1 se dio a los 9 días, en el TG2 a los 7 días y en el TG3 a los 4 días después de la siembra (Figura 30C). Por otro lado, la velocidad de germinación mostrada en el TG1 fue 0.75, en el TG2 fue 1.13 y en el TG3 fue 1.10 (Figura 30D). Todas las semillas que germinaron desarrollaron en plántulas con el apareamiento de estructuras como radícula, hipocótilo, hojas primarias y hojas funcionales (Figura 31).

**Figura 30**

*Análisis gráfico del comportamiento germinativo en semillas de Diplostegium rhomboidale*



*Nota.* En la figura se observa el comportamiento germinativo en *D. rhomboidale* durante un mes de estudio por medio de gráficas descriptivas de germinación acumulativa (A) y capacidad germinativa (B) y de gráficas analíticas de tiempo de latencia (C) y velocidad media de germinación (D).

**Figura 31**

*Germinación y desarrollo de plántulas de Diplostephium rhomboidale en el mes de estudio*



Por medio del análisis del comportamiento germinativo en los análisis gráficos descriptivos y analíticos realizados se obtuvo que el tratamiento óptimo de germinación para *M. andicola* y *D. rupestre* es el TG3 (1mg/L de AG<sub>3</sub>), y para *M. peruviana* y *D. rhomboidale* el mejor tratamiento fue el TG2 (0.5mg/L de AG<sub>3</sub>).

## Capítulo V: Discusión

La ley para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad del Ecuador cataloga a los páramos como ecosistemas frágiles por sus características biofísicas, potenciales amenazas y por el interés público que los mismos representan (Mena, 2011). Sus propiedades ecológicas lo hacen más sensible a las variaciones de temperatura, siendo el cambio climático uno de los factores que lo ponen en mayor riesgo y afectan negativamente a la funcionalidad, fenología, distribución, dispersión y dinámica de las especies que habitan los mismos (Cabrera et al., 2019). Es por esto que, la implementación de planes de conservación de los recursos genéticos de las especies vegetales, es de suma importancia en este punto tan crítico para mantener este medio que es una relevante fuente hídrica para el país.

Los ecosistemas alto andinos del Ecuador son un hotspot de biodiversidad y endemismo cuyo mayor representante son especies de arbustos y hierbas de la familia Asteraceae, algunas de ellas clasificadas dentro del libro rojo con un grado de amenaza y cuya presencia ha disminuido en un 4% producto del deterioro de los páramos (Rivero, 2020). A pesar de ello, no se cuenta con estudios que brinden información que ayude a su preservación. Por lo que, es necesario realizar estrategias como bancos de semillas, herbarios, estudios de morfología, viabilidad y germinación de sus semillas, para la obtención de una línea base que permita la implementación de planes de conservación y reinserción de estas especies a los páramos, como se tiene previsto ser necesaria en los próximos 30 años (Mena et al., 2001).

La gran cobertura por parte de las especies de la familia Asteraceae en los ecosistemas alto andinos puede deberse a las estrategias ecológicas de pervivencia R y K que estas han adoptado. Estudios sugieren que pueden usar ambas, R produciendo

un gran número de semillas y K con un porcentaje mayor de embriones viables (Honek et al., 2005). Este comportamiento dual se evidenció en la especie *D. rupestre*, en la que se encontraron una gran cantidad de semillas con un mayor porcentaje de viabilidad y una capacidad germinativa del 95%. Por otro lado, en *D. rhomboidale* se encontró un número menor de semillas, pero cuyo porcentaje de viabilidad era mayor y con una capacidad germinativa del 85%, dando a lugar a una adaptación de tipo K. Por último, en las especies *M. andicola* y *M. peruviana* se vio la producción de un gran número de semillas, pero cuya viabilidad era en un porcentaje bajo con una germinación del 7.5 y 50% respectivamente, dando a lugar a una adaptación tipo R.

Los rasgos morfológicos de las estructuras vegetales como las semillas proveen información relevante acerca de la ecología y biología de las especies. Estos ayudan a establecer una metodología óptima de recolección y preservación de dichas estructuras, facilitando de esta manera los procesos *ex situ* de conservación a largo plazo, al dar una idea de cómo responden las mismas a los procesos de almacenamiento (J. Romero & Pérez, 2016). Actualmente este tipo de estudios se centran en especies de interés económico y comercial como lo son las de uso agrícola, siendo necesario comenzar a estudiar especies silvestres y endémicas que también son importantes y altamente amenazadas.

Uno de los rasgos morfológicos relevantes a determinar en semillas de especies que se busca conservar, es la resistencia al proceso de desecación para clasificarlas en recalcitrantes y ortodoxas. El mismo permite seleccionar las especies que pueden ser candidatas a ser conservadas en un banco sin que su viabilidad se vea afectada por factores externos (Magnitskiy & Plaza, 2007). Este parámetro se mide principalmente por medio del porcentaje de humedad de las semillas, el cual necesita varios

tratamientos con tamaños muestrales grandes que en especies de páramo resulta complejo realizar, al no tener la posibilidad de contar con material vegetal suficiente para todos los ensayos. Por lo que, dicho análisis se lo puede realizar a partir de otros datos morfológicos que además dan información a lo largo de todo el proceso de conservación desde la recolección hasta su almacenamiento (J. Romero & Pérez, 2016).

La cantidad de semillas por flor es un parámetro que da una idea de cuanta muestra es necesaria recolectar y está relacionada con la capacidad que tienen las mismas a aguantar la deshidratación. Cuando existe una mayor producción de cipselas estas tienden a llevar un comportamiento ortodoxo manteniendo su viabilidad a largo plazo (J. Romero & Pérez, 2016). De los resultados obtenidos se puede ver que las especies con mayor número de semillas por flor fueron *M. andicola*, *M. peruviana* y *D. rupestre* las cuales pueden ser clasificadas como ortodoxas. De manera contraria las que presentaron menor cantidad fueron *M. arbutifolia*, *G. parvifolia* y *D. rhomboidale* las mismas que podrían ser consideradas como recalcitrantes. Esta información puede ser corroborada de mejor manera con los ensayos de viabilidad y germinación, en los que las especies que se clasificaron como recalcitrante no mantuvieron su viabilidad y no germinaron después de un tiempo de almacenamiento (Del Amo et al., 2009). Con excepción de *D. rhomboidale* cuyo comportamiento germinativo fue el mismo, a pesar de que sus semillas fueron almacenadas por 8 meses, por lo que, pueden clasificarse como ortodoxas al haber mantenido su viabilidad y capacidad germinativa en este lapso.

El tamaño de las semillas juega un papel importante en la recolección, transporte y almacenamiento de las semillas y dan una idea del espacio físico necesario

para su almacenamiento. En el caso de las especies de estudio estas no sobrepasan los 5mm, por lo que, su almacenamiento puede ser en espacios pequeños, fríos y secos (A. Romero et al., 2016). Por otro lado, el peso de las semillas en conjunto con la forma es un parámetro útil para determinar semillas de aspecto viable, este parámetro se empleó para la selección de semillas en los ensayos de germinación y se evidenció que la capacidad germinativa en las especies *D. rupestre*, *D. rhomboidale*, *M. andicola* y *M. peruviana* fue en porcentajes mayores a la viabilidad obtenida (Vargas et al., 2014).

El estado óptimo para el almacenamiento de las semillas es cuando estas alcanzan su madurez fisiológica, ya que en ese punto dejan de recibir protección por parte de la planta madre y adicionalmente alcanzan su máxima capacidad germinativa (Calderón, 2019). En el caso de las especies de estudio este parámetro se lo cualificó en función del color y la apertura del vilano. Para las especies del género *Monticalia* el tiempo óptimo de cosecha sería entre diciembre a febrero, en el género *Diplostephium* de noviembre a enero y en *Gynoxys* de diciembre a abril. Sin embargo, es importante recalcar que debido a las variaciones climáticas la fenología reportada actualmente puede variar en los próximos años.

Otro parámetro a evaluar para asegurar el éxito a mediano y largo plazo de la conservación *ex situ* de las especies de interés son los ensayos de viabilidad de semillas. Muchas especies de ecosistemas alto andinos tienen un problema dual de disponibilidad de semillas al haber una gran cantidad de semillas vacías y un porcentaje bajo de las mismas en estado viable, lo cual dificulta su almacenamiento y capacidad germinativa (Vargas et al., 2014). Por medio de la prueba colorimétrica con tetrazolio esto se corroboró, ya que en el género *M. andicola*, y en la especie *G. parvifolia* se presentó un mayor porcentaje de semillas vacías que de semillas con embrión. Por otro

lado, contrariamente a lo reportado en *D. rupestre* y *D. rhomboidale* se encontró una mayor cantidad de semillas con embrión en comparación a las vacías.

La viabilidad en semillas del género *Monticalia* según estudios previos puede llegar a ser entre 5 a 16% lo que coincidió con los valores obtenidos para este género de 8%, 10% y 11% para *M. arbutifolia*, *M. andicola* y *M. peruviana* respectivamente (Vargas et al., 2014). En el caso del género *Diplostephium* se reporta una viabilidad de 0 a 28%; en *D. rupestre* y *D. rhomboidale* la viabilidad obtenida fue del 29% valor muy cercano a los reportados en la bibliografía (Castañeda et al., 2007). En *G. parvifolia* la viabilidad encontrada fue del 3% valor menor al reportado en este género que fue entre 10 a 25%, esto pudo darse debido a la presencia de larvas que se comen las semillas y afectan de esta manera su viabilidad (Cueva, 2016).

En las especies del género *Monticalia* y *Gynoxys parvifolia* otra razón por la que se encuentra una gran cantidad de semillas vacías puede deberse a un proceso de apomixis, el cual ya se ha visto en otras especies de la familia Asteraceae. Esta es una estrategia adaptativa rápida en respuesta al cambio climático que estas enfrentan, en la que las plantas usan una reproducción asexual y poliploides para asegurar su supervivencia a este fenómeno. Sin embargo, esto genera mayores problemas al producirse plantas idénticas a la madre las cuales son más susceptible a la invasión de plagas y patógenos. Lo cual influye directamente en la ecología y conservación de estas especies que son las más afectadas por el aumento de temperatura (Pegoraro et al., 2020).

El uso de semillas como explantes permite obtener plantas con variabilidad genética lo cual es un punto importante para realizar planes de conservación de estas

especies. El empleo del cultivo *in vitro* por otro lado, permite obtener un mayor número de plántulas en menor tiempo; al tener la posibilidad de darles las condiciones óptimas ambientales como humedad, luz y temperatura y químicas como nutrientes y fitorreguladores (Castillo, 2014). Sin embargo, para el establecimiento de estas en medios de cultivo es necesario pasar por un proceso de desinfección que elimine hongos o bacterias que dificulten la germinación, más en especies silvestres que al no tener un proceso fitosanitario previo contienen gran cantidad de estos (Cárdenas et al., 2019).

En cultivo *in vitro* el principal agente de desinfección es el hipoclorito de sodio debido a sus propiedades antifúngicas, antibióticas, por su fácil manejo y enjuague. Sin embargo, al corroer la materia orgánica puede tener un efecto escarificante que promueve la germinación de las semillas pero también si se lo emplea en altas concentraciones y en tiempos prolongado puede necrosar u oxidar los explantes (Orquera, 2013). Estudios realizados en el género *Pentacalia*, un género relacionado a *Monticalia*, sugiere que el emplear NaClO en concentraciones de 5 a 6% durante cinco minutos reduce significativamente la contaminación de los explantes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de desinfección realizado en el estudio, el cual arrojó que una concentración del 6% en *Monticalia* y 5.5% en *Diplostephium* y *Gynoxys* de NaClO, redujo el porcentaje de contaminación y no daño de los explantes.

Uno de los parámetros importantes a considerar para mejorar la germinación de las semillas de especies de páramo es la temperatura. Se ha reportado que los resultados de germinación fueron favorables a temperaturas de entre 20°C y 25°C esto se puede dar debido a las condiciones ambientales a las cuales están expuestas este tipo de especies en campo y a su sensibilidad a el aumento de temperatura. Otro factor

que influye en gran medida es que el uso de ácido giberélico en los medios de cultivo el mismo que estimula las células aumentado la tasa de germinación de semillas (Díaz et al., 2005). Estos factores fueron considerados para la germinación de semillas en este proyecto de investigación; sin embargo, el uso de ácido giberélico no afectó significativamente en el porcentaje de germinación, pero sí influyó en la ruptura de la latencia y la velocidad de germinación en las especies de interés.

Estudios realizados en especies de la familia Asteraceae de páramo, demuestran que el ácido giberélico aumenta la capacidad germinativa de sus semillas cuando se lo emplea en una concentración de 1mg/L (Pérez & Castañeda, 2017). Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de germinación para las especies *M. andicola* y *D. rupestre* en los que se obtuvo las capacidades germinativas más altas de 7.5 y 95% respectivamente en un medio enriquecido con 1mg/L de ácido giberélico. Sin embargo, en el caso de *M. peruviana* y *D. rhomboidale* las mayores capacidades germinativas se dieron en un medio enriquecido con 0.5mg/L de ácido giberélico con capacidades germinativas de 50% y 85% respectivamente.

Los resultados de porcentaje de germinación en las concentraciones seleccionadas van acordes con los reportados. Para el género *Monticalia* se ha visto que puede ir de 8 a 83%, valores cercanos y dentro de ese rango se obtuvieron en los ensayos realizados que fueron de 7.5 y 50% (Pérez & Castañeda, 2017). En el caso del género *Diplostephium* se obtuvo valores mucho mayores a los reportados en la bibliografía, los cuales son de 0 al 17% y en el ensayo se obtuvieron valores de 85 y 95% (Castañeda et al., 2007).

En el caso de *M. arbutifolia* y *G. parvifolia* no se logró que sus semillas germinaran, esto puede deberse a varios factores como una baja resistencia a la desecación (recalcitrantes) la misma que debe ser comprobada con ensayos de porcentaje de humedad (Magnitskiy & Plaza, 2007), o también a su alto porcentaje de semillas vacías y no viables. Este comportamiento apunta a que su conservación no puede ser en un banco de semillas si no a través de otros métodos como crioconservación o por semillas artificiales (Abdelnour et al., 2007).

Las semillas de *M. andicola*, *M. peruviana*, *D. rupestre* y *D. rhomboidale* mantuvieron su comportamiento germinativo incluso después de 8 meses de conservación en condiciones secas y frías. Las mismas en el ensayo de germinación desarrollaron estructuras como radícula, hipocótilo, hojas primarias y hojas funcionales en el mes de estudio. Lo que indica que si son candidatas a ser conservadas en un banco de semillas sin que las mismas pierdan su viabilidad y capacidad para desarrollarse en plántulas; un importante paso previo para una fase de aclimatización y reintroducción de estas a su medio natural (Castillo, 2014).

El estudio realizado en las seis especies de la familia Asteraceae seleccionadas da información relevante en tres géneros representativos de los páramos ecuatorianos como lo son *Monticalia*, *Diplostephium* y *Gynoxys*, los mismos que a más de tener una importancia ecológica y biológica son estratégicos para el establecimiento del banco de semillas al ser especies representativas de este medio. Por lo que, se cumplieron los objetivos propuestos en el presente proyecto de investigación y darán apoyo a los proyectos HANS-BANK y BIO-GEEC.

## Capítulo VI: Conclusiones

Los estudios en especies estratégicas como las de la familia Asteraceae son prioridad, para proteger el páramo que se encuentra amenazado que por el cambio climático.

Los datos morfológicos son relevantes para comprender la ecología y biología de las especies, además son la línea base que permite determinar las estrategias óptimas de conservación *ex situ* y germinación de las mismas.

Las especies de páramo poseen una gran cantidad de semillas vacías y no viables, lo cual influye directamente en su capacidad germinativa y dificulta su almacenamiento.

Las semillas de especies de ecosistemas alto andinos al ser recolectadas en condiciones naturales poseen problemas de fitosanidad, por lo que su desinfección para introducirlas en el laboratorio es necesaria.

El uso de hipoclorito de sodio como principal agente desinfectante de las semillas provee beneficios como agente escarificante, aumentando el porcentaje de germinación si se lo usa en concentraciones y tiempos que no dañen los explantes.

La concentración óptima para la desinfección de semillas del género *Monticalia* es 6% y para los géneros *Diplostephium* y *Gynoxys* es de 5.5% por 5 minutos.

El ácido giberélico no influyó significativamente en el porcentaje de germinación de las semillas en las especies de estudio, pero si en la ruptura de la latencia y en la

velocidad de germinación en una concentración de 1mg/L para *M. andicola* y *D. rupestre* y de 0.5mg/L para *M. peruviana* y *D. rhomboidale*.

## Capítulo VII: Recomendaciones

La recolección de semillas de especies de la familia Asteraceae es recomendable realizarla en fundas de papel para absorber la humedad hasta su llegada al laboratorio.

Es importante realizar un proceso de secado de las semillas previo a su almacenamiento para evitar que estas se pudran por la proliferación de hongos.

Para el establecimiento del banco de semillas y para completar los rasgos morfológicos es recomendable realizar una evaluación del porcentaje de humedad en cada especie.

Para las especies *G. parvifolia* y *M. arbutifolia* se deberían realizar estudios germinativos en varios estados de inmadurez, para determinar en qué momento las semillas pierden su viabilidad y establecer un método útil para su conservación.

Es recomendable utilizar los datos de peso, forma y estado de las semillas para determinar cuáles son candidatas a ser conservadas en el banco para las especies *M. andicola*, *M. peruviana*, *D. rupestre* y *D. rhomboidale*.

Para *M. andicola*, *M. peruviana*, *D. rupestre* y *D. rhomboidale* se puede utilizar las plantas muestreadas en el presente estudio como plantas madres para la conservación de sus semillas en el banco.

Este es uno de los primeros estudios realizados en estas especies, por lo que es necesario realizar investigaciones en más especies y en diferentes puntos del país para tener un contraste de información que ayude a futuros planes de conservación.

## Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdelnour, A., Rojas, G., & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la criopreservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología En Marcha*. Vol. 20-1 - 2007. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1597026>
- Cabrera, A. P., Armijos, N., & Romero, J. (2019). Rasgos Morfológicos de frutos y su incidencia en la conservación *ex situ* de dos especies de páramo en el Sur del Ecuador. *Universidad Técnica Particular de Loja*.
- Calderón, M. (2019). Potencial de conservación *ex situ* de semillas de especies de páramo. *Universidad Nacional de Colombia*, 137–166.
- Calisto, L. (2019). GUÍA DE PLANTAS ALTO PITA. *Fondo de Protección Del Agua - FONAG*.
- Cárdenas, C., Araque, J., Bohorquez, M. de los Á., Hernández, Y., & Pacheco, J. (2019). Propagación in vitro de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Páramos colombianos. *Scielo*, 70. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970057>
- Castañeda, S., Garzón, Á., Cantillo, M. Á., Torres, M. P., & Silva, L. (2007). ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE OCHO ESPECIES NATIVAS DEL BOSQUE ALTO ANDINO ANTE DOS MÉTODOS DE PROPAGACIÓN. *Colombia Forestal*, 10(20), 79–90. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=423939610004>
- Castillo, A. (2014). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA*. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>

- Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *ResearchGate*.  
[https://www.researchgate.net/publication/344180955\\_Paramos\\_del\\_Ecuador\\_importancia\\_y\\_afectaciones\\_Una\\_revision](https://www.researchgate.net/publication/344180955_Paramos_del_Ecuador_importancia_y_afectaciones_Una_revision)
- Condón, F., & Rossi, C. (2018). BANCO DE GERMOPLASMA INIA:conservando la diversidad de nuestras plantas. *Revista INIA*.
- Correa, A., Windhorst, D., Tetzlaff, D., Crespo, P., Célleri, R., Feyen, J., & Breuer, L. (2017). Temporal dynamics in dominant runoff sources and flow paths in the Andean Páramo. *Water Resources Research*, 53(7), 5998–6017.  
<https://doi.org/10.1002/2016WR020187>
- Cueva, J. S. (2016). Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la geminación de *Gynoxys verrucosa*. *Universidad Técnica Particular de Loja*. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/15917>
- Dangles, O., Rabatel, A., Kraemer, M., Zeballos, G., Soruco, A., Jacobsen, D., & Anthelme, F. (2017). Ecosystem sentinels for climate change? Evidence of wetland cover changes over the last 30 years in the tropical Andes. *PLoS ONE*, 12(5).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0175814>
- Del Amo, S., Vergara, M. del C., Ramos, J. M., & Saiz, C. (2009). Germinación y manejo de especies forestales tropicales. *Germinación y Manejo de Especies Forestales Tropicales*. <https://doi.org/10.25009/UV.1995.121>

- Díaz, M. A., Navarrete, J. D., & Suárez, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles. *Revista de Ingeniería*, 22, 64–75. <https://doi.org/10.16924/REVINGE.22.8>
- Fernández, D. (2015). Importancia de los Herbarios Ecuatorianos en la Conservación de Plantas Amenazadas. *ResearchGate*.  
<https://www.researchgate.net/publication/304215210>
- Godínez, H., & Flores, A. (2000). Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica*, (11), 1–29. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62101101>
- González, L., & Orozco, A. (2017). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Botanical Sciences*, 58, 15.  
<https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1484>
- Hofstede, R., Coppus, R., Mena Vásconez, P., Segarra, P., Wolf, J., & Sevink, J. (2002). THE CONSERVATION STATUS OF TUSsock GRASS PARAMO IN ECUADOR. *ECOTROPICOS*, 15(1), 3–18.
- Honek, A., Martinkova, Z., & Saska, P. (2005). Post-dispersal predation of *Taraxacum officinale* (dandelion) seed. *Journal of Ecology*, 93(2), 345–352.  
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2745.2005.00987.X>
- Internacional Seed Testing Association. (2016). *International Rules for Seed Testing* (Vol. 8, Issue i).

- Laguna, Y., Cueva, J., Tamariz, C., & Olivera, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Senecio calvus* (Asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(2), 111–121.  
<https://doi.org/10.18271/RIA.2019.455>
- León, S., Valencia, R., Pitmam, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Herbario QCA.  
[http://gesneriads.ua.edu/pdf/Gesneriaceae\\_Libro\\_Rojo\\_Ecuador\\_2011.pdf](http://gesneriads.ua.edu/pdf/Gesneriaceae_Libro_Rojo_Ecuador_2011.pdf)
- MAE. (2020). *Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe Coca*. Quito, Ecuador
- Magnitskiy, S. V., & Plaza, G. A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales Physiology of recalcitrant seeds of tropical trees. *Agronomía Colombiana*, 25(1).
- Masini, C., Rovere, A., & Pirk, G. (2015). Germinación de *Gutierrezia solbrigii* y *Senecio subulatus*, asteráceas endémicas de Argentina. *Revista Internacional de Botánica Experimental*.
- Mena, P. (2011). Páramo : paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado. *Abya-Yala: EcoCiencia: ECOBONA*, 386.
- Mena, P., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). Los Páramos del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas. *Abya Yala/Proyecto Páramo*.
- Mora, A. (2008). Acciones para la conservación de plantas: amenazas, retos y perspectivas. *La Granja*, 7(1), 21–24. <https://doi.org/10.17163/LGR.N7.2008.04>

- Negrin, V. L., & Zalba, S. M. (2008). Germinación de *Grindelia ventanensis* (Asteraceae), una especie endémica del sistema de Ventania (Buenos Aires). *Grupo de Estudios En Conservación y Manejo - Universidad Nacional Del Sur*.
- Ochoa, B. F., Buytaert, W., De Bièvre, B., Célleri, R., Crespo, P., Villacís, M., Llerena, C. A., Acosta, L., Villazón, M., Gualpa, M., Gil-Ríos, J., Fuentes, P., Olaya, D., Viñas, P., Rojas, G., & Arias, S. (2016). Impacts of land use on the hydrological response of tropical Andean catchments. *Hydrological Processes*, 30(22), 4074–4089. <https://doi.org/10.1002/HYP.10980>
- Orquera, G. (2013). Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de chuquiragua (*chuquiraga jussieu*) a partir de yemas apicales y axilares. *Universidad de La Fuerzas Armadas-ESPE*. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/7167>
- Pedraza, P., Betancur, J., & Franco, P. (2004). CHISACÁ, UN RECORRIDO POR LOS PÁRAMOS ANDINOS. *Instituto de Ciencias Naturales e Instituto de Recursos Biológico Alexander von Humboldt*. [www.unal.edu.co/icn/](http://www.unal.edu.co/icn/)
- Pegoraro, L., Baker, E. C., Aeschmann, D., Balant, M., Douzet, R., Garnatje, T., Guignard, M. S., Leitch, I. J., Leitch, A. R., Palazzesi, L., Theurillat, J.-P., Hidalgo, O., & Pellicer, J. (2020). The correlation of phylogenetics, elevation and ploidy on the incidence of apomixis in Asteraceae in the European Alps. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 194(4), 410–422. <https://doi.org/10.1093/BOTLINNEAN/BOAA058>

- Pérez, A., & Castañeda, L. (2017). Establecimiento in vitro de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana*, 19(2).  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49753656008>
- Pezoa, A. (2001). Estrategias de Conservación de la Diversidad Biológica. *Libro Rojo de La Flora Nativa y de Los Sitios Prioritarios Para Su Conservación*, 18, 273–280.
- Posada, J. (2014). El papel de la dispersión de las semillas en la regeneración de la vegetación del páramo en un paisaje fragmentado. *Universidad de Los Andes*.
- Rivero, A. O. (2020). Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador. *Collectanea Botanica*, 39, e001–e001.  
<https://doi.org/10.3989/COLLECTBOT.2020.V39.001>
- Romero, A., Baquero, N., & Beltrán, H. (2016). Banco de semillas en áreas disturbadas de bosque subandino en San Bernardo (Cundinamarca, Colombia). *Colombia Forestal*, 19(2), 181–194.  
<https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.2.a04>
- Romero, J., & Pérez, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación *ex situ* de especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*, 25(2), 59–65. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2016.25-2.07>
- Romoleroux, K., Cárate, D., Navarrete, H., & Erlen, R. (2016). Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi. In *Pontificia Universidad Católica del Ecuador* (1st ed.).

Valencia, J. B., Mesa, J., León, J. G., Madriñán, S., & Cortés, A. J. (2020). Climate Vulnerability Assessment of the Espeletia Complex on Páramo Sky Islands in the Northern Andes. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8.

<https://doi.org/10.3389/FEVO.2020.565708/FULL>

Vargas, O., Pérez, L. V., Insuasty, J., Melgarejo, L. M., & Rodríguez, N. (2014). Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. *Universidad Nacional de Colombia*, 174.

## Anexos