



Evaluación del fotoperíodo y de la temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae)

Villacrés Pillajo, Tamia Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Segovia Salcedo, María Claudia, Ph. D.

25 de enero de 2022



A_Vilacres Tesis COPYLEAKS (1).docx

Scanned on: 22:0 January 25, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	85
Words with Minor Changes	9
Paraphrased Words	116
Excluded Words	0



Website | Education | Businesses



Private document
**MARIA CLAUDIA
SEGOVIA
SALCEDO**

Maria Claudia Segovia, Ph. D.

C.C.: 1709055998



Departamento de Ciencias de La Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, "**Evaluación del fotoperiodo y de la temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe – Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae)**" fue realizado por la señorita **Villacrés Pillajo, Tamia Alexandra**, 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, 25 de enero de 2022



Maria Claudia Segovia Salcedo Ph. D.

C. C.: 1709055998



Departamento de Ciencias de La Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Villacrés Pillajo Tamia Alexandra**, con cédula de ciudadanía N° 1714507108, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación, "**Evaluación del fotoperíodo y de la temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae)**" 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, 25 de enero de 2022



Villacrés Pillajo, Tamia Alexandra

C. C.: 1714507108



Departamento de Ciencias de La Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Villacrés Pillajo Tamia Alexandra**, con cédula de ciudadanía N° 1714507108, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación, "**Evaluación del fotoperíodo y de la temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de enero de 2022

Villacrés Pillajo, Tamia Alexandra

C. C.: 1714507108

Dedicatória

A Jague, Angie, Noni, Cris, Ben.

Agradecimientos

A la familia.

Al equipo BIO-GEEC, HANS-BANK por su conocimiento, tiempo y vehemencia por la ciencia:

a las chicas, a Nela y a la Doc. Segovia.

Al equipo de Innovación del Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) por darnos una mano en época de pandemia, en especial a la Mgtr. Ana Del Hierro.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales:

Doc. Mónica Jadán Ph. D. y a Mgtr. Andrea Ortega por su apoyo.

Un saludo especial al Doc. Rodrigo Ávalos.

A las instituciones colaboradoras que permitieron que esto sea posible:

Parque Nacional Cayambe-Coca, GIZ, DAAD e INNOVATIVA-ESPE.

Índice de Contenido

Reporte de Copyleaks	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del Problema.....	17
Justificación del Problema.....	18
Objetivos de la Investigación.....	20
Objetivo General.....	20

Objetivos Específicos.....	20
Capítulo II: Marco Teórico.....	22
Los Páramos Andinos	22
Características Generales	22
El Páramo como Ecosistema	22
Área de Estudio: El Parque Nacional Cayambe-Coca	24
La Familia Asteraceae.....	25
Generalidades, usos y aplicaciones.....	25
El Género <i>Werneria</i> Kunth.....	27
El Género <i>Senecio</i>	29
Conservación <i>ex situ</i> de flora	30
Bancos de Semillas	31
Hipótesis	34
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	35
Recolección y Transporte del Material Vegetal.....	35
Secado y Almacenamiento del Material Vegetal.....	35
Determinación de Rasgos Físicos	35
Prueba de Coloración con Tetrazolio (TTZ).....	36
Preparación de la Muestra.....	36
Tinción y Evaluación de Embriones Viables.....	36
Desinfección de Semillas	37

	10
Ensayo 1.....	37
Ensayo 2.....	38
Ensayos de Germinación	39
Análisis de Datos	40
Rasgos Funcionales y Viabilidad	40
Ensayo de Desinfección y Germinación.....	40
Capítulo IV: Resultados	42
Hallazgos Ecológicos	42
Recolección y Estado de Madurez	44
Rasgos Físicos de las Semillas	45
Prueba de Viabilidad con Tetrazolio	46
Desinfección de Semillas	48
Ensayo 1.....	48
Ensayo 2.....	49
Ensayos de Germinación	52
Germinación in vitro de <i>Werneria pygmaea</i>	52
Germinación in vitro de <i>Werneria nubigena</i>	54
Germinación in vitro de semillas de <i>Senecio chionogeton</i>	56
Capítulo V: Discusión.....	60
Rasgos Físicos de las Semillas	60
Viabilidad de Semillas	63

Ensayos de Desinfección	68
Ensayos de Germinación	70
Capítulo VI: Conclusiones.....	74
Capítulo VII: Recomendaciones.....	75
Referencias	76

Índice de Tablas

Tabla 1 Diseño experimental del Ensayo 1 para desinfección	38
Tabla 2 Diseño experimental del Ensayo 2 para desinfección	39
Tabla 3 Diseño experimental para ensayo de germinación.....	40
Tabla 4 Parámetros de germinación.....	41
Tabla 5 Porcentajes promedio de contaminación a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio por 7 minutos para <i>S. chionogeton</i> y <i>W. pygmaea</i>	49
Tabla 6 Porcentajes promedio de contaminación en distintos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio a distintas concentraciones para <i>W. pygmaea</i>	50
Tabla 7 Porcentajes promedio de contaminación en distintos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio a distintas concentraciones para <i>W. nubigena</i>	51
Tabla 8 Porcentajes promedio de contaminación bacteriana en distintos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % para <i>S. chionogeton</i>	52
Tabla 9 Variables de germinación de <i>Werneria nubigena</i>	55
Tabla 10 Variables de germinación de <i>Senecio chionogeton</i>	58

Índice de Figuras

Figura 1 Ubicación geográfica del área de estudio.....	25
Figura 2 Inflorescencia y fruto de una planta de la familia Asteraceae	26
Figura 3 Especies de estudio pertenecientes a la familia Asteraceae	27
Figura 4 Semilla de una planta dicotiledónea	32
Figura 5 Dimensionamiento del aquenio	36
Figura 6 Patrones de tinción de embriones no viables en <i>Lactuca sativa</i>	37
Figura 7 Distribución de <i>Werneria pygmaea</i>	42
Figura 8 Observaciones ecológicas de <i>Werneria nubigena</i>	43
Figura 9 Observaciones ecológicas de <i>Senecio chionogeton</i>	43
Figura 10 Recolección de inflorescencias con frutos o cipselas maduras	44
Figura 11 Clasificación de semillas de acuerdo al estado de madurez.....	45
Figura 12 Peso y dimensiones de las semillas	46
Figura 13 Viabilidad absoluta de las semillas de acuerdo a la prueba de tetrazolio	46
Figura 14 Viabilidad relativa con respecto a las semillas con embrión	47
Figura 15 Análisis gráfico del comportamiento germinativo de <i>Werneria pygmaea</i>	53
Figura 16 Proceso germinativo de <i>Werneria pygmaea</i>	53

Figura 17 Análisis gráfico del comportamiento germinativo de <i>Werneria nubigena</i>	54
Figura 18 Proceso germinativo de <i>Werneria nubigena</i>	55
Figura 19 Pigmentación de estructuras aéreas de <i>Werneria nubigena</i>	56
Figura 21 Proceso germinativo de <i>Senecio chionogeton</i>	58

Resumen

La familia de plantas, Asteraceae, es una de las más extensas en el Ecuador. Esta familia es de gran importancia en el contexto de la conservación *ex situ* y el cambio climático debido a los diversos roles que estas plantas pueden desempeñar como arbustos, colchones de agua o hierbas pioneras. En este trabajo se probó diferentes condiciones de luz y temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies del Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. Se determinó: peso, dimensiones de las semillas y viabilidad según el ensayo de tetrazolio al 1,0 % (*Werneria*) y 1,5 % (*Senecio*). Para la desinfección se usaron concentraciones de hipoclorito de sodio al 2.0, 3.5, 5.0 % y tiempos de 7, 10 y 15 min después del lavado con detergente y etanol al 70%. Las pruebas de germinación se realizaron en agar al 0.75 % en condiciones de 0, 12 y 24 h de luz; y a 5, 20/10 y 30 °C. Los pesos oscilaron entre 93 y 260 mg en 100 semillas. La viabilidad estuvo entre el 48 y 81 %, de acuerdo a la especie. Para la desinfección se sugiere usar concentraciones de cloro entre el 2 y 5.0 % durante 10 y 15 minutos, dependiendo de la especie. Los mayores porcentajes de germinación fueron entre 27 y 72 % según la especie, en condiciones de 12 h de luz y 20/10 °C. Estas especies presentaron fotoblastia positiva y sus rasgos físicos sugieren que pueden ser ortodoxas.

Palabras clave:

- **PÁRAMO**
- **SEMILLAS**
- **GERMINACIÓN ASTERACEAE**
- **CONSERVACIÓN**

Abstract

The plant family, Asteraceae, is one of the most extensive in Ecuador. Due to the various roles that these plants can play as shrubs, waterbeds, or pioneer herbs, this family is of great importance in the context of *ex situ* conservation and climate change. This work tested different light and temperature conditions on the *in vitro* germination of three species from National Park Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. and *Senecio chionogeton* Wedd. It was determined: weight, dimensions of the seeds, and viability according to the tetrazolium assay at 1.0 % (*Werneria*) and 1.5 % (*Senecio*). For disinfection, it tested concentrations of sodium hypochlorite at 2.0, 3.5, 5.0 %, and times of 7, 10, and 15 min after washing with detergent and 70 % ethanol. Germination tests were carried out in 0.75 % agar under conditions of 0, 12, and 24 h of light; and at 5, 20/10, and 30 °C. Weights ranged between 93 and 260 mg in 100 seeds. Viability was between 48 and 81 %, according to the species. For disinfection, it is suggested to use chlorine concentrations between 2.0 and 5.0 % for 10 and 15 min depending on the specie; the highest germination percentages were between 27 and 72 % depending on the species, under conditions of 12 h of light and 20/10 °C. These species presented positive photoblasty, and their physical treats suggest that they may be orthodox.

Key words:

- **PARAMO**
- **SEEDS**
- **ASTERACEAE GERMINATION**
- **CONSERVATION**

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

Los programas de conservación pueden constituirse de forma integral a partir de estrategias *in situ* y/o *ex situ*; la elección de una o su combinación depende del estado de conocimiento de una población o especie en particular y sus posibles amenazas. Así, los parques nacionales y áreas protegidas cumplen la función de preservación de ecosistemas y hábitats de forma *in situ* (Dudley, 2008). Mientras que, la gestión *ex situ* de individuos en ambientes controlados puede tener diversos fines: aseguramiento de una población, fuente de restauración de poblaciones, sustitución ecológica, colonización asistida, programas de investigación y educación, entre otros. Cualquiera de las estrategias entonces, debe seguir una secuencia lógica que parte del diseño, planificación, evaluación de riesgos, toma de decisiones, ejecución, ajuste y evaluación. En consecuencia, para que se cumplan de forma exitosa los objetivos de tal programa o estrategia, es primordial que se base en datos científicos previos sobre taxonomía, demografía, genética, ciclo biológico, roles ecológicos y posibles escenarios ante el cambio climático (IUCN/SSC, 2014).

Ahora bien, ante la creciente amenaza y alteración de hábitats y ecosistemas es ineludible el desarrollo de planes de conservación y restauración apropiados, que deben partir del conocimiento de las especies existentes en sitios claves como el Parque Nacional Cayambe-Coca. Por consiguiente, la conservación de especies vegetales como un recurso genético, a través de una estrategia *ex situ* como los bancos de semillas exige establecer una línea base de conocimiento sobre las semillas de las especies que conforman este ecosistema (Organización de las Naciones Unidas, 1993; Secretaría del Convenio de Diversidad Biológica, 2011). Países latinoamericanos como Colombia, Brasil, Argentina, Chile y México ya han desarrollado una amplia investigación en el campo de las semillas con aplicaciones en el campo de la conservación *ex situ* y

producción agrícola (Vargas et al., 2014; Masini et al., 2016; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017; Mancipe-Murillo et al., 2018). En Ecuador, hay una limitada cantidad de investigaciones enfocadas en el estudio semillas alto-andinas, los cuales se concentran en la morfología y germinación de semillas de varias familias, algunas de ellas endémicas: Myrtales, Orchidaceae, Podocarpaceae, Ericaceae, Valerianaceae entre otras (Pazmiño-Celi, 2011; Carrera-Navarrete, 2014; Palomeque et al., 2020; Romero-Saritama & Cueva-Ojeda, 2020). Sin embargo, pese a que, Asteraceae es una de las familias más extendidas en el país, ha sido poco estudiada, dejando un área que puede ser extensamente explorada, pues comprende un gran número de géneros y especies, varios, endémicos (Rivera-Guerra, 2020).

Justificación del Problema

Ecuador es uno de los 17 países con mayor diversidad en el mundo, ostentando dos puntos calientes de biodiversidad: los Andes tropicales y el Chocó Darién ecuatorianos (Aguirre et al., 2015). Los Andes tropicales en general, están constituidos por al menos ocho tipos de ecosistemas, como por ejemplo los bosques inundables de la llanura amazónica, el pajonal de puna húmeda, los bosques altoandinos, los páramos, y otros. Estos ecosistemas se encuentran asociados a sistemas de agua dulce como humedales, lagunas de origen glaciar, bofedales y cabeceras de ríos, que proveen de agua a aproximadamente a 60 millones de personas que habitan las grandes ciudades de la región Andina; además de posibilitar actividades agropecuarias y producción de energía (Tognelli et al., 2016).

Entonces, los páramos son eco-regiones reguladoras del ciclo hidrológico; de relevancia ecológica, económica y social (Hofstede et al., 2014). Los cuales han sido catalogados como ecosistemas frágiles debido a la influencia de las actividades antropogénicas agrícolas (quemadas y deforestación), ganaderas, mineras, y expansión urbana (carreteras) (Díaz et al., 2005). Además, se ha estimado que para el año 2050

podría perderse entre el 31 y el 46 % de este ecosistema a causa de los eventos vinculados al cambio climático como las elevadas temperaturas, la variación de precipitaciones, sequías inusuales, insuficiente humedad en el suelo, nubosidad y condiciones climáticas extremas (Hofstede et al., 2014). En tal sentido, Naciones Unidas ha señalado que es un momento decisivo para afrontar el cambio climático, pues este fenómeno podría provocar de forma generalizada efectos irreversibles sobre los ecosistemas con tan solo el aumento en la temperatura de 1.5 °C (Organización de las Naciones Unidas, 2021). De no existir acciones de mitigación se ha considerado incluso que entre 1990 hasta el 2100 la temperatura podría llegar a variar entre 1.7 a 4.9 °C (Karl & Trenberth, 2003). Las implicaciones de tales incrementos de temperatura son incendios forestales, propagación de especies invasoras, alteraciones en la composición de las comunidades vegetales, alteraciones en los patrones de distribución de especies, cambios fisiológicos, fenológicos y en las interacciones ecológicas (predador-presa), y en casos extremos la pérdida de algunos ecosistemas de forma definitiva (Richter et al., 2009; Isaac & Williams, 2013; IPCC, 2019).

Todos esos eventos son posibles ya que los biomas de montaña demandan velocidades de cambio de temperatura lentos para que las especies puedan acoplarse a nuevas condiciones climáticas (Loarie et al., 2009) y son más sensibles a alteraciones ambientales debido a su restringido espacio geográfico (Pauli et al., 2012). Los márgenes adaptativos de algunas son estrechos y las áreas protegidas no siempre aseguran la supervivencia de las especies. Se conoce también, que las regiones tropicales serán las primeras en experimentar las disrupciones del cambio climático, porque el clima ha permanecido estable desde 1860 (Huntingford et al., 2013, Mora et al., 2013).

En el Ecuador se han realizado avances en la última década en cuanto a conservación, principalmente en el área de plantas y anfibios; sin embargo, estos esfuerzos incipientes requieren ser fortalecidos con estudios, modelos y bases de datos de libre acceso sobre el biodiversidad, ecología y evolución que permitan identificar

aquellas poblaciones con cierto grado de vulnerabilidad o aquellas que puedan adaptarse fácilmente a variaciones climáticas abruptas (Sierra & Cavieres, 2010; Cuesta et al., 2012; Bendix, 2012). De allí, que las especies a estudiar en este trabajo juegan un papel de importancia ecológica como hierbas de páramo que constituyen una cobertura vegetal que desacelera procesos como la erosión del suelo, desecación de los humedales al conformar las hierbas cojín y plantas pioneras (Fernández et al., 2015; Wijayabandara et al., 2021). En particular, las plantas cojín pueden resistir incendios y ser nodrizas de otros individuos vegetales (Acuña, 2006; Harding & Kirkpatrick, 2018).

Finalmente, en el contexto ecuatoriano este trabajo se alinea con las directrices nacionales sobre biodiversidad, puesto que esta área alcanzó un rol estratégico el año 2008. Bajo lo cual, el Estado ecuatoriano propuso algunos instrumentos como la Agenda Nacional de Investigación sobre la Biodiversidad y el Plan Nacional de Restauración Forestal 2019-2030 (INABIO, 2017) para definir metas, objetivos y líneas de acción prioritarias en la investigación científica sobre biodiversidad y directrices para la restauración de ecosistemas, la seguridad hídrica, alimentaria; la conservación de la biodiversidad, el combate a la desertificación y la promoción de la disminución de la vulnerabilidad de los ecosistemas a efectos del cambio climático (MAE, 2019).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar el fotoperíodo y la temperatura en la germinación *in vitro* de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae).

Objetivos Específicos

- Caracterizar los rasgos físicos de las semillas de las tres especies a través de su peso y tamaño.

- Determinar la capacidad germinativa de las semillas mediante la prueba de tetrazolio.
- Establecer un protocolo de desinfección para obtener el menor porcentaje de contaminación en la germinación *in vitro* de las semillas.
- Probar distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura en la germinación *in vitro* de las especies de estudio.

Capítulo II: Marco Teórico

Los Páramos Andinos

Características Generales

El páramo andino es un ecosistema alpino neo-tropical, constituido por humedales, lagos y lagunas de altura, que se localiza en la región alto andina de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y una pequeña región de Costa Rica y Panamá. En Ecuador, la superficie de páramo representa aproximadamente el 33.6 % de los páramos de los Andes (Llambi & Cuesta, 2014). En territorio esta superficie compone cerca del 7 % del país (Beltrán et al., 2009). Su altura puede oscilar entre los 3 000 a 4 000 m, alcanzando su límite superior en el desierto peri-glacial y las nieves perpetuas (Hofstede et al., 2003). En cuanto a humedad, los páramos presentan un amplio gradiente relacionado con precipitaciones anuales de entre 650 a 2 000 mm. En tanto que, su temperatura puede variar entre los 22 °C en el día a -8 °C por la noche (Posada, 2014). A nivel de vegetación, existe un alto nivel de endemismo, como consecuencia de su aislamiento geográfico y de las condiciones únicas de la alta montaña tropical: bajas temperaturas por las noches, gran amplitud térmica diaria, radiación elevada y suelos habitualmente escasos en nutrientes (Hofstede et al., 2003; Llambi & Cuesta, 2014).

El Páramo como Ecosistema

El páramo cumple la función de regular los ciclos hídricos y ser reservorios de agua por las características del suelo (Chuncho-Morocho & Chuncho, 2019), ya que lo conforman una vasta red de humedales y sistemas lacustres que proveen servicios ecosistémicos de agua a importantes cuencas hidroeléctricas, embalses y ciudades para uso urbano, agrícola e industrial (Tognelli, et al., 2016; Cresso et al., 2020). Conjuntamente, protege los suelos de la erosión, gracias a la gran acumulación de biomasa que se produce por la lenta descomposición de la materia orgánica a bajas

temperaturas. De esta forma, el páramo es un importante sumidero de carbono que alcanza los niveles más altos por hectárea reportados en ecosistemas tropicales (Hofstede et al., 2003).

Como ecosistema, asimismo, hospeda una gran cantidad de especies endémicas, que alcanzan aproximadamente el 60 % de la flora que lo cubre; tomando en cuenta que alrededor de entre el 10 y 20 % de la flora descrita en los Andes pertenece al páramo (Hofstede et al., 2003). Este ecosistema es muy apreciado e interesante desde la perspectiva evolutiva y de radiación de especies, pues su endemismo es alto, pero su riqueza en especies es limitada en comparación con otros ecosistemas (Llambi & Cuesta, 2014). Por ello, es uno de los biomas estratégicos (hotspot) del norte de Sudamérica y el Neotrópico, aunque a su vez, uno de los más vulnerables (Morales-Betancourt & Estévez-Varón, 2006). En Ecuador un área menor al 40 % del páramo está protegida (Chuncho-Morocho & Chuncho, 2019).

Los páramos ecuatorianos acogen a más de 250 especies endémicas que corresponden a 108 géneros agrupados dentro de 40 familias. Asteraceae, Orchidaceae, Gentinacea y Poaceae son las familias con mayor número de taxones endémicos. De acuerdo a los esfuerzos de investigación realizados en cada provincia, se registra mayor cantidad de especies endémicas en Pichincha, Azuay, Loja, Chimborazo, Napo y Cotopaxi; en un rango altitudinal entre los 3 000 y 4 000 m, abarcando dos tipos de vegetación: páramo de pajonal y parte del páramo de almohadillas y arbustos. El 80 % de las plantas endémicas del páramo ecuatoriano ha sido catalogado con cierto nivel de amenaza por la IUCN (León- Yáñez, 2018).

Ahora bien, recordemos además que las especies vegetales en conjunto con los sistemas hídricos (lacustres o ríos) conforman el hábitat de la fauna circundante (Tognelli et al., 2016). En este ecosistema aves y mamíferos principalmente, utilizan el páramo como un corredor geográfico para transitar entre distintitas zonas de vida. Los

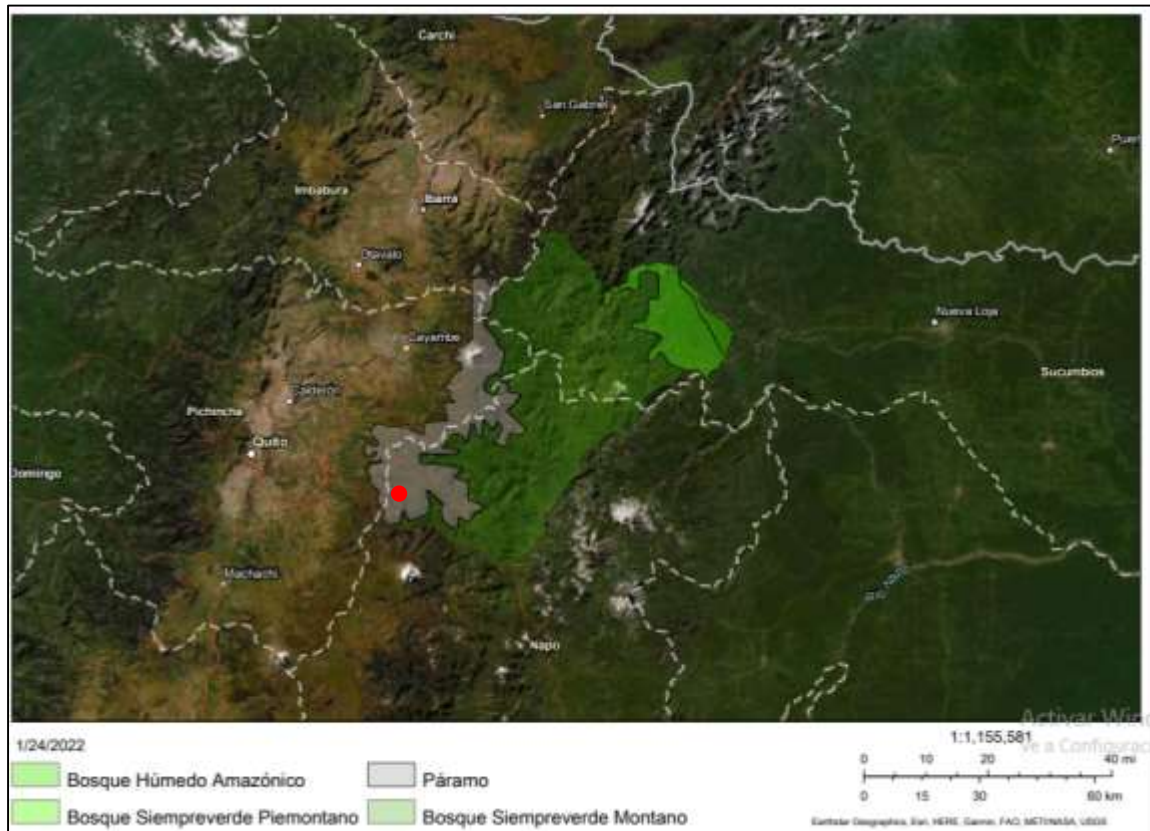
representantes más característicos del último grupo son: el oso de anteojos, puma, tapir, venado y conejo, aunque se ha señalado que tanto en aves como en mamíferos se han registrado 70 especies. Es así que se reporta también variedad de insectos, anfibios y reptiles (Chuncho-Morocho & Chuncho, 2019).

Área de Estudio: El Parque Nacional Cayambe-Coca

El lugar de estudio se encuentra aproximadamente a 25 km de la ciudad de Quito, dentro del Parque Nacional Cayambe-Coca (PNCC), al lado de complejo turístico Termas de Papallacta. Esta área protegida fue creada en 1970 para cumplir tres objetivos: proteger el páramo, conservar los sistemas lacustres, recursos hídricos y la biodiversidad. El parque está ubicado al nororiente del Ecuador, en la Cordillera de los Andes, formando parte de cuatro provincias: Imbabura y Pichincha en la Sierra, Sucumbíos y Napo en la Amazonía (Figura 1). Su rango altitudinal se extiende desde los 600 a 5 790 msnm, y la temperatura varía desde los -8 a 30 °C dependiendo de la gradiente geográfica. En la zona de páramo la temperatura puede variar entre los -8 a 14°C (Ministerio de Ambiente y Agua, 2020). Esta área protegida salvaguarda importantes cuencas hidrográficas que se originan allí, como la de Esmeraldas, Chota, Mira, Papallacta, Cosanga, Quijos, Oyacachi, Salado, Coca, Aguarico, Napo y Pastaza; así como especies faunísticas y florísticas propias de esta geografía (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2021). En el PNCC, 7.3 % de su superficie ha sufrido de intervención humana; no obstante, el ecosistema de páramo ocupa entre el 19 al 26 % de su superficie, siendo altamente húmedo por encontrarse en el lado oriental de la Cordillera de los Andes y con un sistema hídrico que posee 80 lagunas (Ministerio de Ambiente y Agua, 2020).

Figura 1

Ubicación geográfica del área de estudio



Nota. El área marcada delimitada es el Parque Nacional Cayambe–Coca. En la leyenda se esquematiza de forma general los ecosistemas presentes en el parque. La marcación en rojo representa el área de estudio. Adaptado de ESRI, ArcGis, 2018.

La Familia Asteraceae

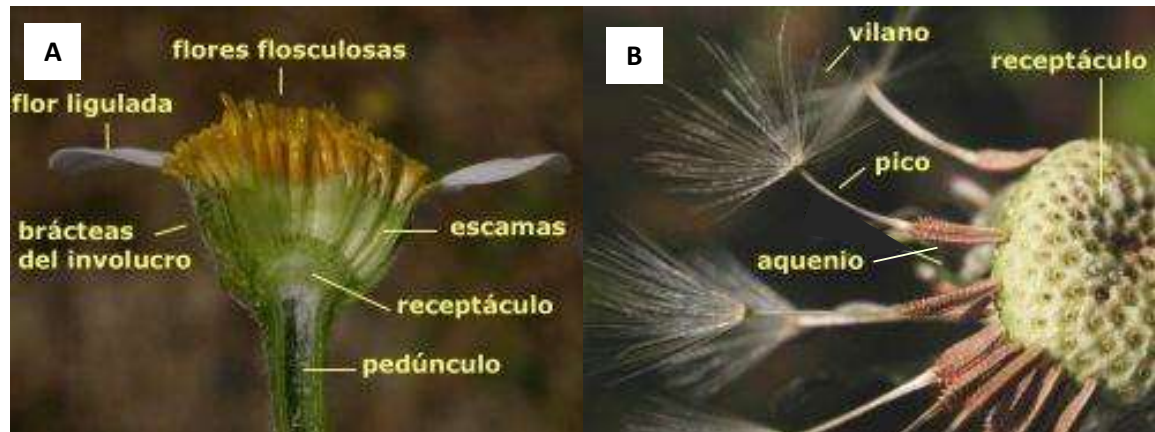
Generalidades, usos y aplicaciones

La familia Asteraceae es conocida comúnmente como la familia de girasol, anteriormente se la llamaba Compositae. El término “áster” hace alusión a la forma de estrella de su inflorescencia. La principal característica de esta familia es la disposición de varias flores en una inflorescencia compuesta llamada capítulo, rodeada de brácteas,

que parecería una única flor como se observa en la Figura 2 (Simpson, 2010; Zhang & Elomaa, 2021).

Figura 2

Inflorescencia y fruto de una planta de la familia Asteraceae



Nota. (A) Partes de la inflorescencia. (B) Partes del fruto (cipsela). Tomado de *Compositae*, por J. Peralta, 2019, Universidad Pública de Navarra

Esta familia se distribuye en todas las regiones del mundo, y alberga aproximadamente 1 700 géneros y 25 000 especies aceptadas, siendo la más grande de plantas vasculares con flores. El número de especies podría ser mayor ya que algunos nombres todavía se encuentran en discusión (The Plant List., 2013). La mayoría de las especies de Asteraceae son herbáceas, sin embargo, un componente importante de la familia está constituido por arbustos o incluso árboles (Simpson, 2010). Los miembros de varios géneros de la familia Asteraceae son bien conocidos por su valor hortícola (Mitra & Kumar, 2018); aunque, la mayoría tienen aplicaciones terapéuticas. Muestran una amplia gama de actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, diuréticas y hepatoprotectoras entre otras (Bessada et al., 2015; Del Vitto & Petenatti, 2015; Rolnik & Olas, 2021). En la Figura 3, se presentan las especies a estudiar de acuerdo al género.

Figura 3

Especies de estudio pertenecientes a la familia Asteraceae



Nota. A) *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn. Tomado de *Werneria pygmaea*, por O. Montes, 2021, iNaturalist. CC BY-NC. B) *Werneria nubigena* Kunth. Tomado de *Chicoria Blanca*, por R. Ripley, 2016, iNaturalist (CC BY-NC). C) *Senecio chionogeton* Wedd. Tomado de *Senecio chionogeton* Wedd, por C. Ivovic, 2013, Flickr.

El Género *Werneria* Kunth

Este género se caracteriza por conformar grupos en rosetas, raramente solitarios, con involucro integrado por filarias soldadas y flores de margen blancas. Actualmente, este género comprende aproximadamente 25 especies. Se distribuye principalmente en los Andes sobre los 2 800 m desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Argentina y Chile (Asturnatura, 2004; Beltrán, 2017). A continuación, se indican las especies a estudiar correspondientes a este género.

***Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn.** Taxonómicamente esta especie pertenece al reino Plantae, división Trachophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia Asteraceae y al género *Werneria* Kunth. Los sinónimos con los que se la conoce son: *Werneria graminifolia* Benth., *Werneria minima* var. *Minima*, *Werneria cherlerioides* Sch.Bip., *Werneria brachypappa* Sch.Bip., *Werneria rhizoma* J. Rémy (*GBIF Secretariat, 2021*). Comúnmente se la llama “chioria de agua” (Calisto-Díaz, 2019).

Como se aprecia en Figura 3A, de acuerdo a la descripción botánica las plantas que pertenecen a esta especie son hierbas bajas o rastreas que pueden llegar a medir 5 cm de diámetro. Tienen rizomas horizontales u oblicuos; hojas alargadas de hasta 3 cm de largo, dispuestas en roseta. Inflorescencia blanca en cabezuela sola a nivel del suelo de aproximadamente 2.5 cm de diámetro. Presenta flores marginales blancas (± 14) y flores internas (± 25) son cortas, tubulares y con 5 dientes, de color amarillo. Frutos en cipsela con vilano de hasta 10 mm de *largo* (Missouri Botanical Garden, 2021).

En Ecuador, la “chicoria de agua” se encuentra distribuida a alturas de entre los 2 500 y 4 500 msnm (Minga et al., 2016). En provincias como Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha, Tungurahua (Calisto-Díaz, 2019).

En cuanto a ecología, esta especie se desarrolla en lugares permanentemente húmedos como ciénegas y bordes de lagunas (Minga et al., 2016), formando parte del páramo de almohadillas (Missouri Botanical Garden, 2021).

***Werneria nubigena* Kunth.** Taxonómicamente esta especie pertenece al reino Plantae, división Trachophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia Asteraceae y al género *Werneria* Kunth. Sus nombres sinónimos son: *Werneria nubigena* var. *vulgaris* Wedd., *Oresigonia latifolia* Willd., *Werneria steubelii* Hieron., *Werneria mocinniana* DC., *Oresigonia grandiflora* Willd. (GBIF Secretariat, 2021). Sus denominaciones comunes: “chicoria blanca”, “achicoria”, “cóndor cebolla”, “cebolla de gallinazo” (iNaturalist, 2021).

Tal como se muestra en la Figura 3B, botánicamente las plantas de esta especie corresponden a hierbas bajas de hasta 15 cm de diámetro. Tiene hojas alargadas con forma de lengüeta de hasta 10 cm de largo, que forman rosetas basales. Exhiben inflorescencias en cabezuelas solitarias a ras del suelo, que alcanzan los 7 cm de diámetro. Posee flores marginales (± 25), irregulares de 2.5 cm de color blanco y las

flores del disco (+100) que miden alrededor de 10 mm, tubulares y con 5 dientes, color amarillo o algunas rojizas. Frutos con vilano de cerca de 10 mm, sedosos, blancos (Minga et al., 2016).

La “chicoria blanca” se encuentra en las provincias atravesadas por la Cordillera de los Andes, desde Carchi hasta Loja (Minga et al., 2016), en un rango altitudinal desde 2 000 hasta 5 000 msnm (Calisto-Díaz, 2019).

En términos ecológicos, esta especie conforma grupos pequeños en pajonales bajos, sitios abiertos y bordes de humedales. De forma medicinal se usa para “purificar la sangre”, a través de infusiones. Además, sus hojas se usan para cicatrizar heridas (Calisto-Díaz, 2019). Registros etnobotánicos informan que en una localidad de Perú la utilizan para el tratamiento de la diarrea, para el frío, y como tratamiento para el cáncer de útero (Hammond et al., 1998; Gonzáles de la Cruz et al., 2014).

El Género Senecio

Las especies de este género son morfológicamente variables, especialmente en las hojas, así como en las formas de crecimiento, que van desde hierbas anuales y perennes, hasta arbustos. Es un género con distribución cosmopolita, muy diverso, con más de 1 250 especies, exhibiendo mayor concentración y riqueza en los Andes sudamericanos y al sur de África (Beltrán, 2015). A continuación, se presenta la especie de interés.

Senecio chionogeton Wedd. Taxonómicamente esta especie pertenece al reino Plantae, división Trachophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia Asteraceae y al género *Senecio* L. Comúnmente se la conoce como “sacha conda” (Calisto-Díaz, 2019).

La descripción botánica se refiere a esta especie como una hierba terrestre, que puede crecer hasta de 60 cm de alto, como se observa en la Figura 3C. Dispone de tallos acanalados con hojas de 15 cm en una roseta basal y otras distribuidas a lo largo del mismo. Las inflorescencias son grupos de cabezuelas amarillas y colgantes en el extremo del tallo, hasta 15 por planta; de hasta de 2.5 cm de diámetro, con brácteas grandes. Sus flores miden 15 mm de largo, amarillas y tubulares, con 5 dientes cortos. Los frutos tienen vilano de color blanco de hasta de 12 mm de largo (Minga et al., 2016).

En Ecuador, *S. chionogeton* Wedd. se desarrolla en un rango altitudinal de entre los 3 000 hasta los 4 500 msnm (Calisto-Díaz, 2019). Y se extiende entre pajonales de gramíneas y matorrales arbustivos de *Gynoxys* y chuquiraguas (Minga et al., 2016).

Conservación *ex situ* de flora

La conservación *ex situ* consiste en proteger el material genético de una especie, fuera del lugar distribución de la población original. El material que se puede usar con distintos fis es: material reproductivo como semillas (bancos de semillas) y polen, árboles vivos (colecciones vivas de genes en campo), o partes vegetativas (bancos de germoplasma *in vitro*). A través de esta forma de conservación se evita la pérdida de la diversidad de los recursos genéticos al realizar la selección de individuos y las procedencias de los mismos. Las técnicas usadas para el almacenamiento y reproducción dependen mucho de la especie o géneros en estudio (Patiño, 1997).

Actualmente, esta estrategia de conservación se usa como complemento a la estrategia de conservación *in situ*, por lo que es necesario que ambas se integren en programas de desarrollo y aprovechamiento de recursos forestales. Especialmente, en localidades donde la capacidad de administración y control forestal es pobre, permitiendo de esta manera la preservación de genotipos, antes de que se pierdan a efectos de la sobreexplotación y desaparición de su hábitat (León et al., 2008).

Bancos de Semillas

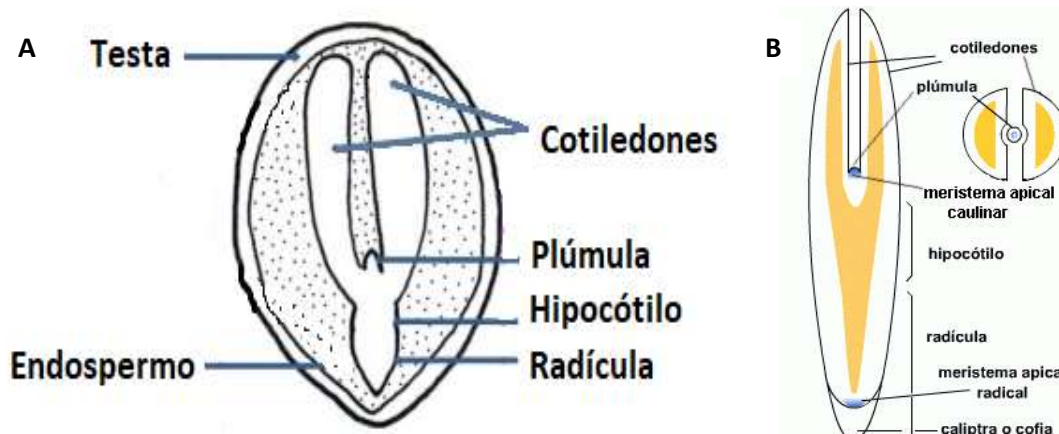
Este tipo de bancos de germoplasma están compuestos por una mezcla de semillas con una alta variabilidad en la longevidad según la especie. Pueden ser transitorios o persistentes. En los primeros todas las semillas son capaces de germinar durante los meses siguientes a su dispersión. En los bancos transitorios algunas semillas pueden permanecer viables durante varios años en el suelo. Los bancos deben reponerse periódicamente durante la dispersión de semillas de plantas locales o del campo (Vandvik et al., 2015; Mahé et al., 2020).

Para llevar a cabo el almacenamiento de semillas en un banco, es necesario conocer tres factores que determinarán el éxito de dicho almacenamiento: viabilidad inicial de la semilla, el contenido de humedad inicial de la semilla y la temperatura de almacenamiento en combinación con la humedad relativa. También se sabe que el almacenamiento *ex situ* está asociado además con rasgos funcionales de las semillas, ya sean estas características morfológicas, fisiológicas o fenológicas (FAO, 2019).

Morfología. El tamaño y el número de semillas, son características muy variables y particulares de cada especie o familia ya que están relacionadas con el modo de dispersión, fenología y la adaptación a su hábitat (De Jager et al., 2018). Estas características son significativas ya que permiten programar y optimizar esfuerzos a la hora de realizar la recolección; y, a la hora de determinar cómo serán almacenadas. Por otro lado, características como el tipo de embrión, testa y endospermo, Figura 4, están relacionadas con el comportamiento germinativo y dormancia, por lo tanto, darán cabida a la correcta interpretación de los datos de germinación (Romero-Saritama, 2016).

Figura 4

Semilla de una planta dicotiledónea.



Nota. A) Partes de una semilla dicotiledónea. B) Embrión de una especie dicotiledónea.

Tomado de *Morfología de Plantas Vasculares*, por A. Gonzalez y M. Arbo, 2016, Universidad Nacional del Nordeste de Argentina

Contenido de Humedad y Tipos de Semillas para Bancos. El contenido de humedad es un parámetro fisiológico determinante para el almacenamiento de semillas. Basados en ello se han establecido tipos de semillas de acuerdo a esta característica. Se habla de **semillas ortodoxas**, cuando estas pueden soportar un bajo contenido de humedad y por lo tanto pueden desecarse hasta alcanzar alrededor del 5 % de su peso húmedo y ser almacenadas a bajas temperatura o inferiores a los 0 °C durante tiempo prolongado. En tanto que, se hace referencia a **semillas recalcitrantes**, cuando estas no soportan una alta desecación, ni toleran almacenamiento por períodos de tiempo extensos, por ello, soportan contenidos de humedad de entre el 20 y 50 % (William, 1991).

De hecho, la viabilidad de las semillas disminuye a la mitad por cada aumento del 1% en el contenido de humedad de la semilla o de 10 ° F (~ 5 ° C) de aumento de temperatura, de allí que se utilizan contenedores sellados y ambientes controlados para

mantener la viabilidad de la semilla durante períodos más largos (Universidad de California, 2019).

Técnicas para Evaluación de Viabilidad de Semillas. La viabilidad de una semilla se define como la capacidad para crecer y producir una planta normal y puede ser determinada mediante ensayos de germinación o por el ensayo de tetrazolio (William, 1991).

Germinación. La germinación es una prueba directa de la capacidad germinativa de la semilla en condiciones óptimas. De acuerdo a normas internacionales se considera que la germinación es el surgimiento y desarrollo de la plántula en la que el aspecto de sus estructuras esenciales (sistemas de raíces primarias, eje del brote, cotiledones, y coleóptilo, Figura 4B, indica si es o no es capaz de desarrollarse en condiciones favorables en el campo. Para evaluar aquello se usa la Regla del 50 % en la que se establece que una plántula es normal siempre y cuando el 50 % o más del tejido del cotiledón y hojas primarias son funcionales (ISTA, 2016). Aunque, existen también muchos estudios que definen la germinación como la emergencia de más 1 mm de la radícula (Galíndez et al., 2009; Masini et al., 2016; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017).

Ensayo de tetrazolio (TTZ). Esta prueba determina indirectamente la viabilidad de las semillas al detectar la actividad respiratoria a nivel celular. El principio de este ensayo se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas que catalizan reacciones respiratorias en las mitocondrias, durante la glicólisis. Estas enzimas, particularmente la malato deshidrogenasa, llevan a cabo la reducción de la sal de tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro) en tejidos vivos, aceptando un ion hidrógeno. En forma reducida, el TTZ es una sustancia estable, de color rojo llamado trifenilformazán o formazán. Por lo tanto, el color rojo resultante en los tejidos de la semilla es una indicar positivo de la

viabilidad de la semilla, en tanto que el tejido no viable, no reacciona con TTZ, y no muestran coloración o muy poca (Franca-Neto & Krzyzanowsky, 2019).

Hipótesis

Existen condiciones de fotoperíodo y temperatura adecuadas para la germinación *in vitro* de *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae), especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Recolección y Transporte del Material Vegetal

Las especies de estudio fueron: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth y *Senecio chionogeton* Wedd. Se recolectaron de forma aleatoria frutos maduros disponibles, de al menos 30 plantas distribuidas en tres puntos del Parque Nacional Cayambe Coca: S 0°18.019' W 78°08.033', S 0°16.939' W 78°08.207', y S 0°17.750' W 78°07.337'. El período de colecta fue entre julio y diciembre de 2021. Las muestras se depositaron y transportaron en fundas de papel o tubos plásticos de 50 mL, etiquetados con el nombre de la especie y fecha de muestreo.

Secado y Almacenamiento del Material Vegetal

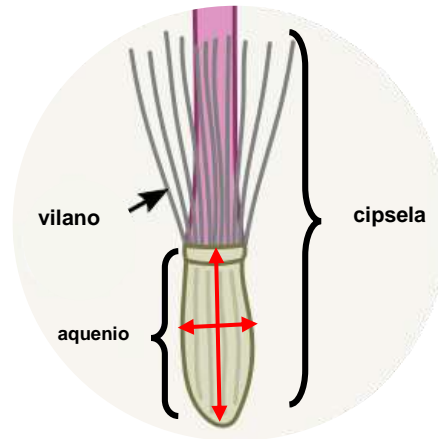
Después de la expedición se retiraron los residuos de materia orgánica o suciedad del lote de semillas y/o frutos. Se secaron los frutos distribuyéndolos en bolsas de papel por un tiempo de entre 3 a 8 días, a temperatura ambiente. Se almacenaron las semillas en bolsas de papel dentro de fundas herméticas en la refrigeradora 10 °C.

Determinación de Rasgos Físicos

Se digitalizó imágenes de un lote de 100 semillas elegidas al azar mediante un estereomicroscopio Trinocular Nikon SMZ1270 y el programa M-Shot. Se midió el ancho y largo de los aquenios con el programa ImageJ/Fiji versión 1.46 (Figura 5). Para el pesaje, se usaron 10 lotes de 100 semillas frescas y una balanza digital BOECO Germany Modelo BXX-22, precisión ± 0.00001 g.

Figura 5

Dimensionamiento del aquenio



Nota. Adaptado de *Asteraceae*, por T. Kebert.

Prueba de Coloración con Tetrazolio (TTZ)

Preparación de la Muestra

Se utilizaron 100 semillas por especie. Se realizó un pre-remojado en agua destilada durante 18 horas a 20 °C. En el estereomicroscopio se identificaron las semillas vacías y las semillas con embrión a través de inspección con bisturí. Se extrajo el embrión y se los dejó en tampón fosfato hasta realizar la tinción (ISTA, 2016).

Tinción y Evaluación de Embriones Viables

Los embriones de las especies del género *Werneria* se sumergieron en una solución de TTZ al 1 %; los de *S. chionogeton* en una solución al 1.5 %. La solución fue realizada con tampón de fosfato, pH=6.5-7.5. Se incubaron por 3 h a 30 °C en oscuridad y se enjuagaron con agua destilada. Luego, se identificó el número de embriones viables, de acuerdo a los siguientes criterios (ISTA, 2016).

Embriones Viables. Embrión totalmente teñido de roja/rosa (ISTA, 2016). Zona radicular y cotiledones rosas homogénea o heterogénea (indica menor vigor, pero no menor viabilidad) (Mancipe-Murillo et al., 2018).

Embriones No Viables. Aquellos que no se haya teñido completamente el embrión (Figura 6); más del 1/3 de la radícula; más de 1/2 de los cotiledones (extremos distal- desteñido leve); más de 1/3 de los cotiledones (desteñido profundo-extremo distal) (ISTA, 2016). Color rosa claro, no homogéneo en la radícula (Mancipe-Murillo et al., 2018).

Figura 6

Patrones de tinción de embriones no viables en Lactuca sativa



Nota. Tomado de *Working Sheets for Tetrazolium Testing*, por ISTA, 2003

Desinfección de Semillas

Ensayo 1

Se lavaron las semillas en una solución de detergente al 2 % p/v durante 15 minutos, en una solución de etanol al 70 % por 1 min y, se probaron concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.00, 3.50 y 5.00 % v/v con 2 gotas de Tween 20 durante 7 min. Después del uso de cada desinfectante las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. En cada paso se agitó de forma vigorosa y constante.

En la cámara de flujo laminar (CFL) se sembrarán 30 semillas por caja Petri con medio Agar al 1 %, con 5 réplicas por tratamiento solo las especies de *W. pygmaea* y *S. chionogeton*, debido a la escasa disponibilidad de *W. nubigena*, como se presenta en la Tabla 1 (Vandvik et al., 2015; Masini et al., 2016; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017). Las cajas fueron monitoreadas una vez por semana durante 30 días.

Tabla 1

Diseño experimental del Ensayo 1 para desinfección

Tratamiento	Tiempo (min)	NaClO (% v/v)
Control	0	0
T1		2.00
T2	7	3.50
T3		5.00

Ensayo 2

Con las tres especies se realizaron los mismos pasos de desinfección que en el ensayo previo, pero, se probaron tiempos de exposición a NaClO de 7, 10 y 15 min (Tabla 2). Además, se disminuyó el tamaño de muestra. Se usaron 15 semillas por caja Petri con cuatro repeticiones por tratamiento.

Tabla 2*Diseño experimental del Ensayo 2 para desinfección*

Tratamiento	Tiempo (min)	NaClO (% v/v)
Control	0	0
D1	7	2.00
D2	7	3.50
D3	7	5.00
D4	10	2.00
D5	10	3.50
D6	10	5.00
D7	15	2.00
D8	15	3.50
D9	15	5.00

Ensayos de Germinación

Antes de cada prueba de germinación se usará el mejor tratamiento de desinfección, obtenido en el experimento anterior. Para cada especie se sembraron 15 semillas en agar al 0.75 % p/v en cada caja Petri, con cuatro réplicas por tratamiento. Se probaron luz y oscuridad completa y tres temperaturas: alta, media (temperatura ambiental de Quito) y baja con fotoperiodo 12 h / 12 h de luz/oscuridad (Tabla 3).

Durante un mes se registró la cantidad de semillas que germinaron dos veces a la semana. Se consideró que una semilla ha germinado cuando se observa a simple vista la emergencia de la radícula o una estructura aérea (hojas cotiledonales).

Tabla 3*Diseño experimental para ensayo de germinación*

Tratamiento	Fotoperíodo (h de luz)	Temperatura (°C)
G1	12	30
G2	12	5
G3	12	15
G4	24	15
G5	0	15

Nota. La temperatura media de la ciudad de Quito es aproximadamente 15 +-2 °C, y de forma alterna tiende 20/10°C día/ noche. Humedad relativa entre el 55-75 % (Serrano et al., 2017; NOAA, 2020).

Análisis de Datos

Rasgos Funcionales y Viabilidad

Las variables de respuesta descriptivas que se obtuvieron son promedios del peso, largo y ancho. Y el porcentaje de semillas vacías, con embrión y viables, por especie.

Ensayo de Desinfección y Germinación

El diseño estadístico fue completamente aleatorizado. La existencia de diferencia entre medias se evaluó usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, dada la ausencia de normalidad en los datos. Para determinar la diferencia entre medias se usó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia del 0.05.

Se graficaron los promedios de los porcentajes de germinación acumulados y la velocidad de germinación (González-Zertuche & Orozco-Segovia, 1996; González et al. , 2018). Las variables de germinación obtenidas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Parámetros de germinación

Parámetro	Fórmula	Unidad	Descripción
Índice de Latencia	t_0	días	t₀ : número de días necesarios para que inicie la germinación
Porcentaje de Germinación	$G = \frac{N}{A} \cdot 100$	%	N : número de semillas germinadas al final. A : número de semillas iniciales.
Velocidad de Germinación	$V = \sum \left(\frac{ni}{t} \right)$	Semillas germinadas/día	t = tiempo desde la siembra hasta la germinación de la última semillas

Para los gráficos y análisis estadísticos respectivos se empleó el programa R, versión 4.1.1 (2021-08-10).

Capítulo IV: Resultados

Hallazgos Ecológicos

W. pygmaea se halló ampliamente distribuida, tanto en zonas lacustres como en zonas montañosas donde no había pajonal (Figura 7).

Figura 7

Distribución de Werneria pygmaea



Nota. (A) Alrededor de laguna. (B) Ladera con almohadillas.

W. nubigena se localizó distribuida en sitios con alta presencia de heces de osos, conejos y donde crecen “achupallas”. Se observó que era alimento de algún animal, porque habían varias plantas y flores comidas. En esta especie se evidenció la presencia de gusano de algún insecto indeterminado e invertebrados del agua (Figura 8).

Figura 8

Observaciones ecológicas de Werneria nubigena

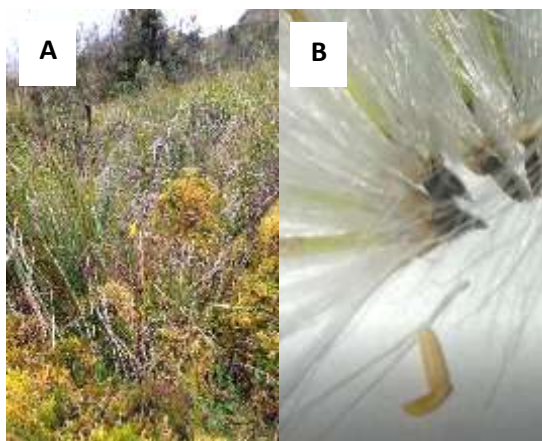


Nota. (A) Presencia de heces y ejemplares de achupallas en la distribución de *W. nubigena*. (B) Plantas comidas. (C) Plaga de gusano anaranjado.

Las plantas de *S. chionogeton* se encontraron dispersas a lo largo de los pajonales, separadas por una distancia de 3 a 5 m entre planta aproximadamente a simple vista. Las inflorescencias con semillas maduras presentaban una plaga de gusano anaranjado (Figura 9).

Figura 9

Observaciones ecológicas de Senecio chionogeton



Nota. (A) Distribución de la especie. (B) Plaga encontrada en las semillas de *S. chionogeton*.

Recolección y Estado de Madurez

En las tres especies de estudio las semillas inmaduras no pudieron acabar de desarrollarse una vez colectadas. Para obtener semillas en el mayor estado de madurez se debe tener en cuenta ciertas características de la inflorescencia. La recolección de semillas de la especie *S. chionogeton* se realizó cuando las inflorescencias estaban completamente blancas y abiertas con sépalos marrón. *W. pygmaea* se podía colectar cuando las inflorescencias eran blancuzcas-marrón claro y abiertas, o cuando las cipselas se encontraban dispersas en el suelo. En la especie *W. nubigena*, se podían colectar semillas cuando las cipselas o toda la inflorescencia se hallaba en el suelo o en el agua, separadas de la planta (Figura 10).

Figura 10

Recolección de inflorescencias con frutos o cipselas maduras



Nota. (A) *Werneria pygmaea*. (B) *Werneria nubigena*. (W) *Senecio chionogeton*.

La recolección muy temprana mostró semillas inmaduras y una recolección tardía resultó en obtención de frutos y semillas podridas.

Las semillas inmaduras de las especies *S. chionogeton* y *W. pygmaea* mostraron coloración verdosa y poco engrosamiento; las semillas maduras fueron de color marrón y turgentes. Las semillas inmaduras de *W. nubigena* exhibieron coloración blanca o verdosa tanto en la testa como en las vellosidades de la misma y poco engrosamiento; las semillas maduras presentaron generalmente coloración marrón en la testa, y color marrón o blanco en las vellosidades del aquenio, además de evidente turgencia (Figura 11).

Figura 11

Clasificación de semillas de acuerdo al estado de madurez

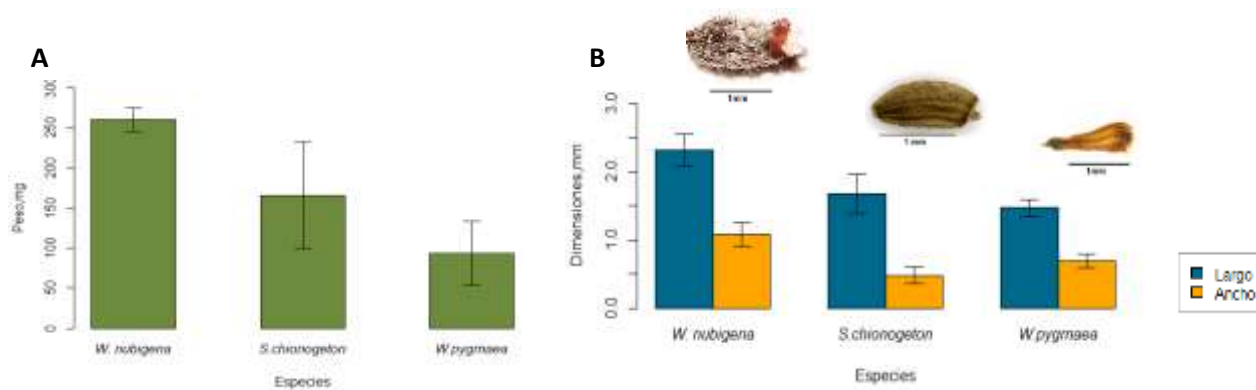


Nota. Vista en estereomicroscopio. Superior: Semillas maduras. Inferior: Semillas Inmaduras (A) *Werneria pygmaea*. (B) *Werneria nubigena*. (C) *Senecio chionogeton*.

Rasgos Físicos de las Semillas

Se encontró que la semillas más grande y pesada es la de *W. nubigena*, con $2.32 \pm 0.24 \times 1.08 \pm 0.18$ mm y 260 ± 15 mg correspondientemente. En dimensiones *W. pygmaea* y *S. chionogeton* muestran ser similares, $1.68 \pm 0.29 \times 0.48 \pm 0.13$ mm y $1.47 \pm 0.12 \times 0.69 \pm 0.10$ mm, no obstante, la última es más pesada, 93 ± 41 mg y 166 ± 68 mg respectivamente (Figura 12).

Figura 12

Peso y dimensiones de las semillas

Nota. (A) Peso promedio de un lote de 100 semillas/fruto (aquenio y vilano) en miligramos. (B) Largo y ancho promedio de una semilla (aquenio).

Prueba de Viabilidad con Tetrazolio

Se usó la prueba de tetrazolio como método indirecto de determinación de la viabilidad de 100 semillas obtenidas al azar. Las especies del género *Werneria* revelaron un porcentaje de semillas vacías de entre el 57 al 77 %, semillas con embrión del 23 al 43 %; y semillas viables de entre el 11 al 34 % (Figura 13).

Figura 13

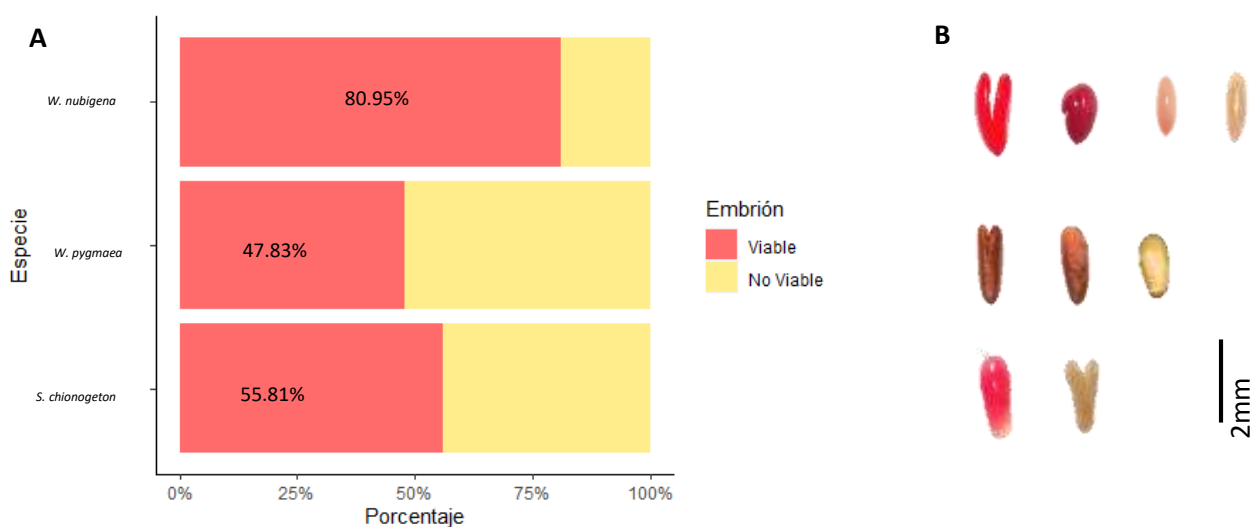
Viabilidad absoluta de las semillas de acuerdo a la prueba de tetrazolio

Nota. (A) *Senecio chionogeton*. (B) *Werneria nubigena*. (C) *Werneria pygmaea*.

Del porcentaje total de semillas con embrión, la especie que presentó mayor cantidad de semillas teñidas o viables fue *W. nubigena*, 80.95 %; seguida de *W. pygmaea* con un porcentaje de 47.83 %. Las semillas de *S. chionogeton* tuvieron un porcentaje de viabilidad del 58.81 % (Figura 14).

Figura 14

Viabilidad relativa con respecto a las semillas con embrión



Nota. (A) Porcentaje de embriones viables. (B) Patrones colorimétricos de los embriones. La interpretación de lo que representa la coloración en la viabilidad del embrión depende de las proporciones teñidas o no, de sus áreas funcionales de acuerdo al ISTA. Un embrión 100 % teñido es un viable. Un embrión 100 % no teñido es inviable.

Las especies correspondientes al género *Werneria* se tiñeron con el protocolo tradicional indicado por el ISTA para *Lactuca sativa*, TTZ al 1 % por 3 h a 30 °C. Los embriones de la especie *S. chionogeton* se tiñeron al aumentar la concentración de TTZ a 1.5 % por 3 h a 30 °C.

Desinfección de Semillas

Se analizaron los porcentajes promedio de contaminación bacteriana y fúngica a través de las pruebas de Kruskal–Wallis para determinación de diferencia significativa de medias y Duncan para la comparación de medias.

El nivel de significancia para la prueba de Kruskal-Wallis es $\alpha=0.05$ y para la prueba de comparación de medias de Duncan es $\beta=0.05$. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Ensayo 1

Este experimento se desarrolló con las especies *S. chionogeton* y *W. pygmaea* debido a la disponibilidad de muestra. Se sembró un Control y tres tratamientos con inmersión de las semillas en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.0, 3.5 y 5.0 %, por 7 min. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento con 30 semillas por réplica.

Para ambas especies no se encontró diferencia significativa en el porcentaje promedio de contaminación fúngica entre los tratamientos y el control. La Tabla 5 indica que el valor-p es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

En cuanto a contaminación bacteriana, para las dos especies hay diferencias significativas entre los tratamientos y el control, con un valor-p inferior que $\alpha =0.05$. De acuerdo a la prueba Duncan todos los tratamientos ejercen un efecto desinfectante en la especie de *S. chionogeton*. Y solo los tratamientos T2 y T3 tienen efecto desinfectante en *W. pygmaea*.

Tabla 5

Porcentajes promedio de contaminación a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio por 7 minutos para *S. chionogeton* y *W. pygmaea*

Especie	Contaminación	Valor-p Kruskal - Wallis	Control	[NaClO]		
				T1 2 %	T2 3.5 %	T3 5 %
<i>S. chionogeton</i>	Bacteriana	0.00777	66.02 b	12.66 a	6.64 a	8.68 a
	Fúngica	0.05480	90.00 a	36.00 b	63.34 ab	84.66 a
<i>W. pygmaea</i>	Bacteriana	0.00417	42.66 a	32.68 a	3.34 b	10.00 b
	Fúngica	0.09673	56.00 b	66.66 ab	88.00 ab	94.66 a

Ensayo 2

Este experimento se llevó a cabo con las tres especies de estudio. Se sembró un control y nueve tratamientos para probar la inmersión de las semillas en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.0, 3.5 y 5.0 %, en tiempos de 7,10 y 15 min. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento con 15 semillas por réplica.

***Werneria pygmaea*.** Para el control, los promedios del porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana fueron 15.00 % y 36.70 %. Para todas las concentraciones de hipoclorito de sodio en un tiempo de inmersión de 15 minutos no se presentó contaminación bacteriana o fúngica. Los tratamientos D4 y D6 con tiempo de inmersión de 10 minutos son significativamente diferentes en comparación con el control de acuerdo a la prueba de Duncan observada en la Tabla 6, tanto para contaminación fúngica como bacteriana.

Tabla 7

Porcentajes promedio de contaminación en distintos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio a distintas concentraciones para W. nubigena

Tiempo	Control	[NaClO]			Valor-p Kruskal- Wallis
		2 %	3.5 %	5 %	
7 min	61.65 a	1.68 b	0.00 b	0.00 b	0.00477
10 min	61.65 a	3.33 a	1.68 a	0.00 a	0.01088
15 min	61.65 a	0.00 b	0.00 b	1.68 b	0.00477

Senecio chionogeton. Para el control, los promedios del porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana fueron 58.33 y 20.00 %, respectivamente. Para todos los tiempos (7,10 y 15 min) y concentraciones de NaClO (2, 3.5 y 5 %) se produjo 0 % de contaminación fúngica. La contaminación bacteriana fue nula en los tres tiempos probados para las concentraciones de 3.5 y 5 % de NaClO. Sin embargo, se evidenció contaminación bacteriana con 2 % de NaClO.

La Tabla 8 muestra que el valor-p es superior a $\alpha = 0.05$. No existe diferencia significativa entre el control y los tratamientos de desinfección al 2 % en los tres tiempos.

Tabla 8

Porcentajes promedio de contaminación bacteriana en distintos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % para S. chionogeton

Valor-p Kruskal- Wallis	Control	[2% NaClO] Tiempo		
		7min	10min	15min
0.2906	20.00 a	16.68 a	1.68 a	1.68 a

Se descartó la concentración de NaClO al 2 % en cualquiera de los tiempos probados, como tratamiento de desinfección para esta especie.

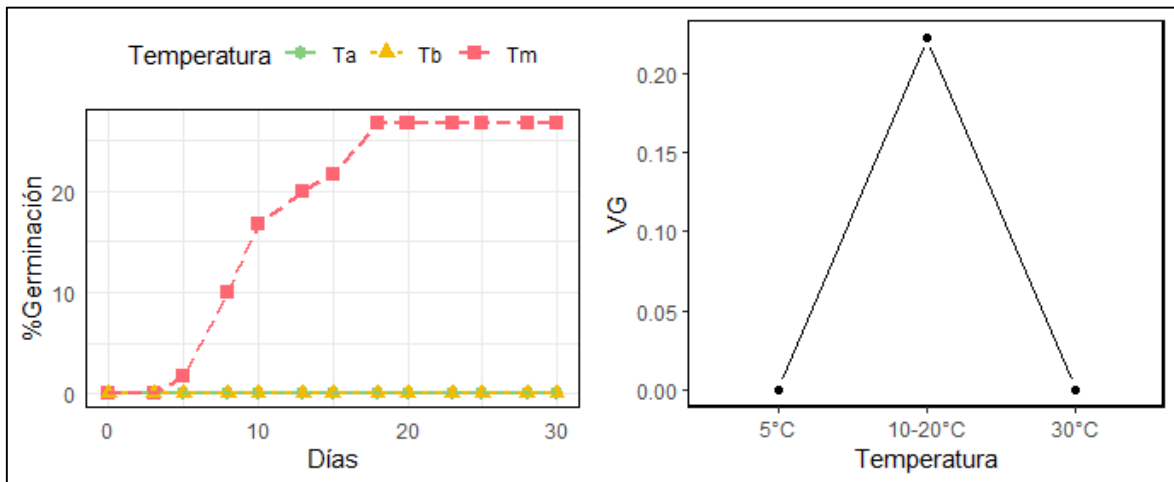
Ensayos de Germinación

Germinación *in vitro* de *Werneria pygmaea*

La gráfica de porcentaje acumulado indica que se llegó al pico de germinación a los 18 días en temperatura media y 12 h luz y 12 h de oscuridad. En condiciones extremas de temperatura y luz no hubo respuesta. El índice de latencia fue en el día 5. Se obtuvo una capacidad germinativa del 26.7 % (Figura 15A) a una velocidad de germinación de 0.22 semillas/ d en un período de observación de 30 días (Figura 15B).

Figura 15

Análisis gráfico del comportamiento germinativo de *Werneria pygmaea*

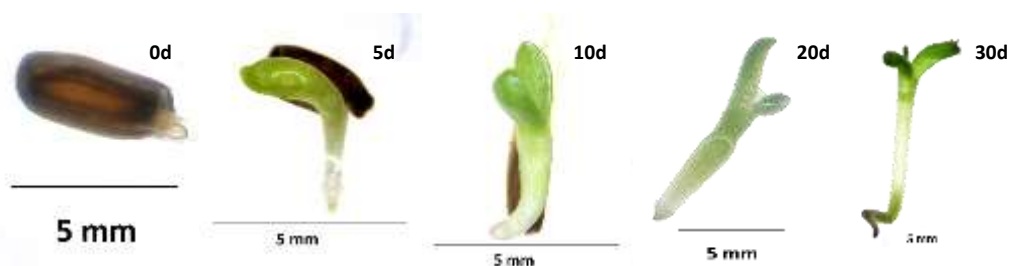


Nota. A la izquierda, la germinación acumulativa en porcentaje. A la derecha, la velocidad de germinación en semillas por día.

La Figura 16 presenta el desarrollo de un brote esta especie. Este exhibe todas las estructuras normales como radícula, hipocótilo, hojas cotiledonares, y primarias.

Figura 16

Proceso germinativo de *Werneria pygmaea*



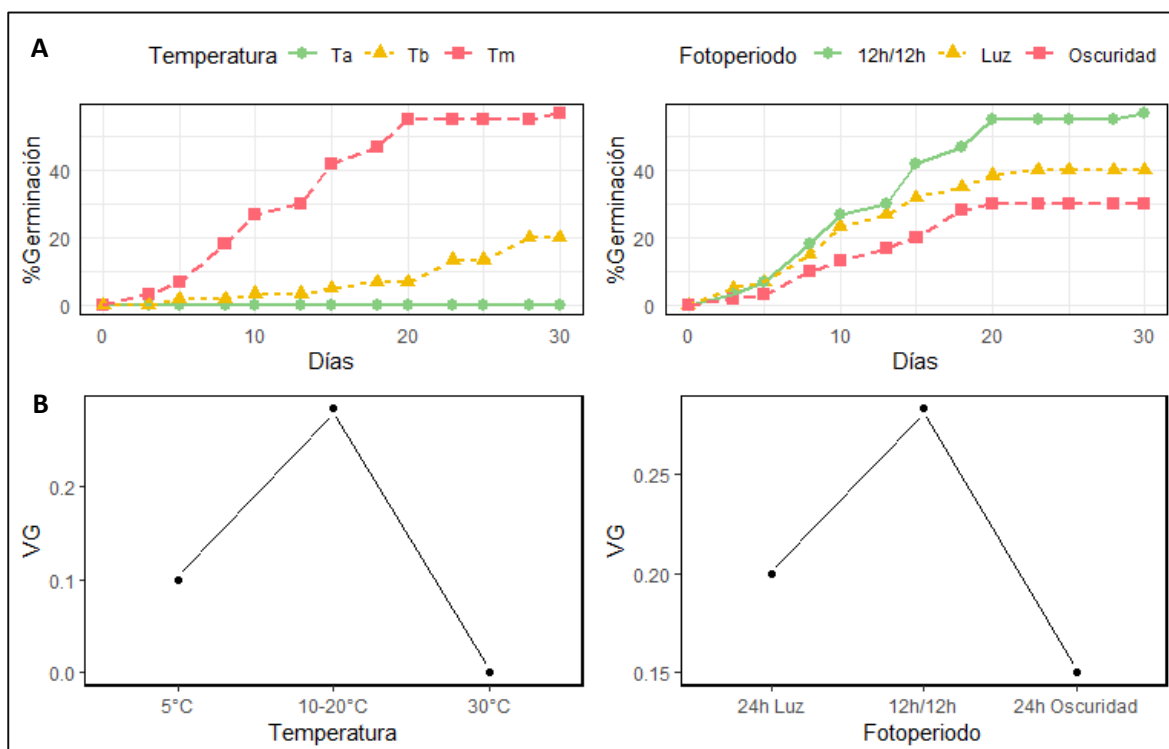
Nota. Observación durante 30 días. La notación en la parte superior derecha indica el número de días transcurridos.

Germinación *in vitro* de *Werneria nubigena*

En la gráfica de porcentaje acumulado se aprecia que los picos de germinación fueron a los 30 y 28 días en Tm y Tb correspondientemente. En presencia de luz el pico se alcanzó a los 23 días, en oscuridad a los 20 días y en luz alternada a los 30 días (Figura 17A). Acorde a la temperatura, la velocidad de germinación mayor se dio en Tm, seguida de bajas velocidades a Tb y Ta. Para el fotoperíodo, la velocidad de germinación más alta es la obtenida en 12 h/12 h luz/oscuridad, luego está la de luz continua y al final la de oscuridad (Figura 17B).

Figura 17

Análisis gráfico del comportamiento germinativo de *Werneria nubigena*



Nota. (A) Germinación acumulativa en porcentaje. (B) Velocidad de germinación en semillas por día.

De la gráfica de porcentaje acumulado de germinación se derivaron algunas variables de germinación como índice de latencia, G y VG (Tabla 9).

Tabla 9

Variables de germinación de Werneria nubigena

Condición	Índice de Latencia (días)	Capacidad Germinativa (G, %)	Velocidad de Germinación (VG, semillas/d)
30 °C	0	0.00	0.00
*20/10 °C	3	56.70	0.28
5 °C	5	20.00	0.10
24 h luz	3	40.00	0.20
0 h luz	3	30.00	0.15

Nota. * Es igual al tratamiento con 12 h luz/12 h oscuridad.

Las semillas que desarrollaron en plántulas presentaron estructuras vegetales normales como radícula, hipocótilo, hojas cotiledonares, y primarias (Figura18).

Figura 18

Proceso germinativo de Werneria nubigena

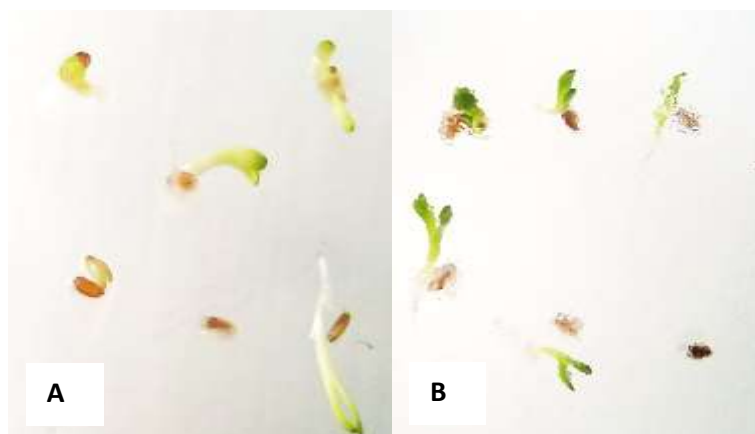


Nota. Medio agar 0.75 %. Observación durante 30 días. La notación en la parte superior derecha indica el número de días transcurridos.

Las estructuras aéreas de los brotes de las semillas de esta especie muestran menor pigmentación en condiciones de oscuridad que en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Figura 19).

Figura 19

Pigmentación de estructuras aéreas de Werneria nubigena



Nota. Brotes en el día 13. (A) Oscuridad. (B) 12 h de luz/12 h de oscuridad.

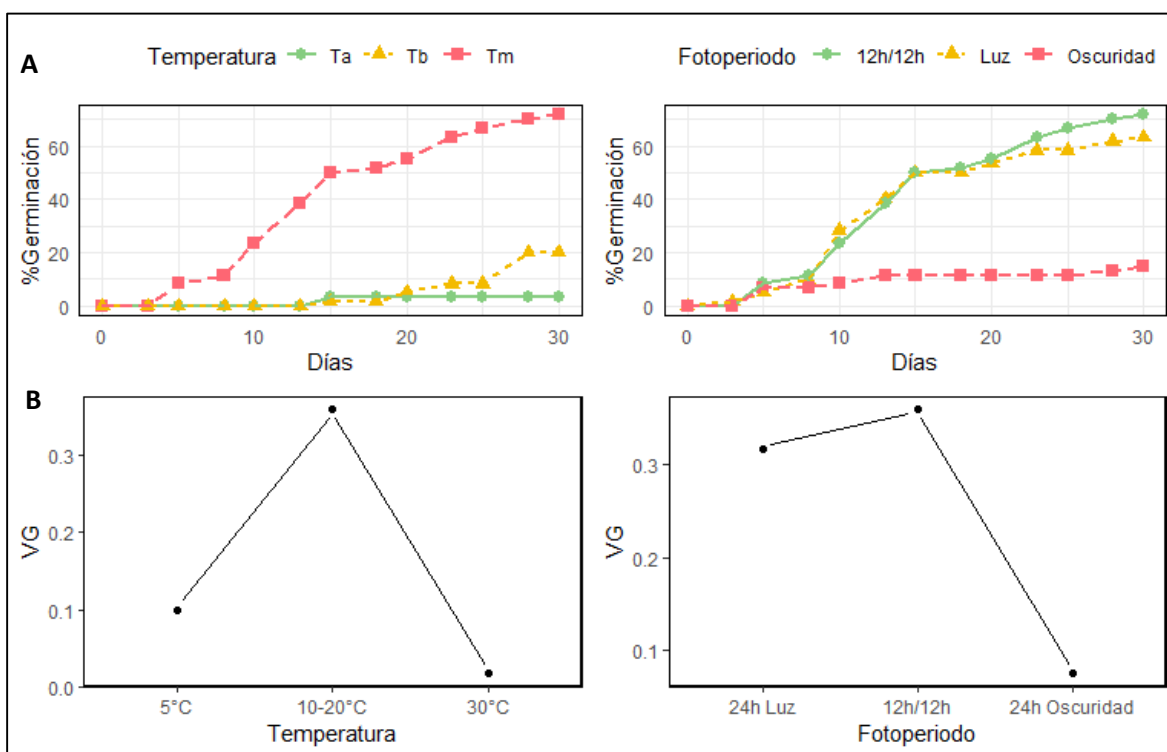
Germinación in vitro de semillas de Senecio chionogeton

La gráfica de porcentaje acumulado indica que se llegó al pico de germinación a los 30 días en T_m y a los 28 días en T_b . La ruptura de la latencia en cambio sucede a los 15 días en la temperatura alta y baja. Los picos de germinación se producen a los 30 días en los tres tratamientos de luz, pero la capacidad germinativa es distinta (Figura 20A). En relación a la temperatura, la mayor velocidad de germinación se produjo a temperatura media, luego a velocidades más bajas están la temperatura alta y baja. Con respecto a fotoperíodo, luz continua y 12 h/12 h luz/oscuridad alcanzaron la misma

velocidad de germinación, pero muy por debajo se encuentra la velocidad germinativa en condiciones de oscuridad de oscuridad (Figura 20B).

Figura 20

Análisis gráfico del comportamiento germinativo de Senecio chionogeton



Nota. (A) Porcentaje acumulado de germinación. (B) Velocidad de germinación en semillas por día.

En la Tabla 10 se resumen las variables de germinación encontradas a partir de la gráfica de porcentaje acumulado. Se pudo deducir el índice de latencia, la capacidad de germinación en 1 mes de estudio y la velocidad media de germinación (VG).

Tabla 10

Variables de germinación de *Senecio chionogeton*

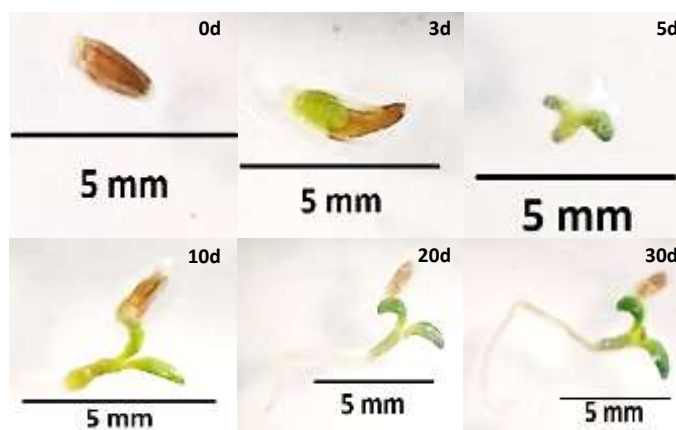
Condición	Índice de Latencia (días)	Capacidad Germinativa (G,%)	Velocidad de Germinación (VG, semillas/d)
30 °C	15	3.30	0.02
*20/10 °C	5	71.70	0.36
5 °C	15	20.00	0.10
24 h luz	3	63.30	0.32
0 h luz	5	15.00	0.08

Nota. * Es igual al tratamiento con 12 h luz/12 h oscuridad.

Las semillas germinadas desarrollaron estructuras vegetales esenciales como radícula, hipocótilo, hojas cotiledonales, y primarias (Figura 21).

Figura 21

Proceso germinativo de *Senecio chionogeton*



Nota. Observación durante 30 días. La notación en la parte superior derecha indica el número de días transcurridos.

Capítulo V: Discusión

Rasgos Físicos de las Semillas

Los rasgos funcionales de las semillas pueden ser morfológicos, fisiológicos o fenológicos. Se definen como tal ya que cumplen funciones en el individuo mismo (desarrollo) o en sus interacciones ecológicas (adaptación y evolución). Dichos rasgos intervienen en procesos reproductivos como la dispersión, rendimiento reproductivo, supervivencia y colonización. Su importancia reside en que son indicadores de estrategias ecológicas y que responden a estímulos ambientales o antropogénicos. Así, el estudio de estas características sirve como una potente herramienta en la optimización de los pasos para la conservación *ex situ* (Romero-Saritama & Pérez-Ruiz, 2016).

Un ejemplo de la funcionalidad de los rasgos físicos en general, con respecto a la adaptación, es el reciente reporte en el área animal que sugiere que los ectotermos están disminuyendo su tamaño corporal como respuesta al calentamiento global (Peralta-Maraver & Rezende, 2021). Análogamente, de vuelta al área vegetal, se ha estado trabajando en modelos que permitan explorar la dirección evolutiva de rasgos que responden a las presiones ambientales de forma correlacional; por ejemplo, el tiempo de latencia y el tamaño de las semillas en un contexto de variaciones de temperatura ambiental (Liu et al., 2016).

Así mismo, la literatura indica que hay correlación entre: el tamaño de la semilla y la masa seca total de la plántula; la masa de la semilla y la velocidad de crecimiento de la plántula. Se menciona incluso una relación lineal entre el tamaño de la semilla y la supervivencia de la plántula. Y la relación negativa entre el tamaño y la plasticidad fenotípica de la plántula. Elementos significativos que permitirían conocer los requerimientos germinativos y de establecimiento; además, de la respuesta de las especies a distintos contextos ambientales (Sánchez-Rendón et al., 2011).

En el presente trabajo se encontró que las dimensiones de las especies estudiadas eran de 2.32, 1.68 y 1.47 mm de largo; para el ancho se presentaron valores como 1.08, 0.48 y 0.69 mm. En la lechuga (*Lactuca sativa*), un cultivar de la familia Asteraceae, la longitud está en un rango de 2.73 a 3.61 mm, el ancho entre los 0.84 a 1.29 mm dependiendo del tipo de variedad estudiada (Peñaloza et al., 2005). En especies silvestres de Egipto como *Senecio aegyptus*, *Senecio glaucus* y *Senecio vulgaris*, se obtuvieron dimensiones de 1.86 a 2.38 mm de largo y de 0.26 a 0.48 mm de ancho del aquenio (Shamsou et al., 2021).

Las dimensiones de este grupo de semillas analizadas son bastantes cercanos, aunque, hay cierta diferencia entre las semillas silvestres y de los cultivares, debido a que estas últimas son seleccionadas para obtener una mayor calidad en la semilla y por tanto, una mayor capacidad germinativa a nivel comercial (Peñaloza et al., 2005; Valencia-Díaz et al., 2007).

Los pesos de las tres especies de estudio fueron 260, 93 y 166 mg en promedio en un lote de 100 semillas. En comparación, el peso de 100 semillas de lechuga varía de 80 a 130 mg (Contreras et al., 2008; Contreras et al., 2009; Kangsopa et al., 2018). El alto peso de una de las especies que corresponde a *Werneria nubigena*, se debe a que esta cuenta con vellosidades que recubren la testa, ocasionando que retenga mayor cantidad de humedad.

Ahora bien, las semillas de mayor tamaño suelen tener embriones grandes y pesados, pero adicionalmente, tejido especializado de reserva, el endospermo; en algunos casos las reservas se acumulan en los cotiledones. Esto permite una pronta brotación, un tamaño más robusto en la plántula naciente y menor intrusión fúngica; pero en contraste las semillas pequeñas tienen mayor capacidad de dispersión dependiendo de sus adaptaciones morfológicas (Peñaloza et al., 2005; Galíndez et al., 2009).

Desde otro enfoque, el tamaño y la masa de la semilla puede asociarse con la tolerancia a la desecación. Donde surgen los conceptos de semilla recalcitrante u ortodoxa dependiendo del contenido de humedad que puedan requerir para conservar su viabilidad durante el almacenamiento (Daws et al., 2005). Se ha reportado que las semillas recalcitrantes son más grandes y pesadas que las semillas ortodoxas. A través de la revisión de nueve especies de diferentes familias, se encontró que siete de ellas eran recalcitrantes, con dimensiones que se encontraban entre los 17x13 a 42x25 mm de largo y ancho. Mientras que las semillas de las especies restantes medían entre 6x4 a 12x5 mm, siendo ortodoxas (Chin et al., 1989).

En cuanto al peso, los mismos autores indicaron que las semillas recalcitrantes podían alcanzar valores de entre los 233.5 a los 1 478.3 g en un lote de 100 semillas; pero, las ortodoxas variaban entre 14.6 a 19.2 g (Chin et al, 1989). Por consiguiente, las dimensiones y peso de las semillas de *S. Chionogeton*, *W. pygmaea* y *W. nubigena* sugieren que podrían tener un comportamiento ortodoxo. Pues recaen en un rango de los 1.5 a 2.5 mm de longitud y pesos muy inferiores en un lote de 100 semillas.

Aún así, por sí solo el tamaño no determina el comportamiento de almacenamiento de la semilla. Para probar corroborar tal característica es esencial evaluar el origen de la semilla (ambiente seco o húmedo), taxonomía, el contenido de humedad en las diferentes etapas de madurez y la tolerancia a la desecación (Hong et al., 1996; Tchokponhoué et al., 2019; Dalziell et al., 2019). En términos de taxonomía se ha observado que las especies de la familia Asteracea tienen alta probabilidad de tener un comportamiento ortodoxo. El tamaño y peso ya han dado indicios de ello. Aunque, incluso puede haber variaciones entre géneros (Hong et al., 1996).

Otro de los rasgos relacionados con el tamaño, es el número de semillas de acuerdo al factor altitudinal. Se ha observado que en tres especies de la familia Asteraceae, entre ellas *Senecio subalpinus*, el número de semillas fue independiente de

la elevación, pero, el tamaño de las semillas podía tener una correlación positiva o negativa con la altura. Dos de las especies, incluida la de Senecio, aumentaron el tamaño de la semilla en un rango altitudinal de 1 000 y 1 300 m; la tercera especie en cambio mostró una disminución en el tamaño de semillas en un rango altitudinal de 1 500 m (Olejniczak et al., 2018).

En general, se espera que las plantas en elevaciones altas se vean limitadas por la disponibilidad de nutrientes y por la duración de la temporada de crecimiento. Lo cual ocasionaría que los recursos de la planta destinados a reproducción, disminuyan. Esto se resuelve con una variabilidad en el tamaño de las semillas como una estrategia de cobertura en un juego de probabilidades de supervivencia (Geritz, 1995).

Ahora, como ya se mostró en el párrafo anterior, esta variación en el tamaño y masa no solo se produce de manera intra-específica, sino de forma inter-específica. Se lo puede explicar considerando que otros factores pueden afectar al tamaño de las semillas, además de la altura. Habría que analizar el sistema de forma más compleja. Los otros componentes que podrían intervenir son por ejemplo el pH del suelo, la cantidad de materia orgánica, la concentración de minerales, la presencia de predadores, etc. De allí que, la selección de la estrategia es particular de cada especie y del sistema montañoso en el que se encuentre (Olejniczak et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Viabilidad de Semillas

En esta investigación se encontraron altos porcentajes de semillas vacías que variaron entre el 57 al 85 % dependiendo de la especie. Al respecto, se ha señalado que existen varios taxones que producen naturalmente proporciones altas de semillas no viables. Se sabe que las familias Asteraceae, Cyperaceae, Poaceae y Apiaceae producen muchas semillas vacías; alcanzando porcentajes de al menos 20 % o más (Liu et al., 2020). Para Asteraceae se halló que este valor podía llegar aproximadamente al 50 % (Dayrell et al., 2017).

La producción de semillas vacías se explica a través de eventos de apomixis o partenocarpia en especies subtropicales. La apomixis consiste en la producción de semillas sin fertilización del óvulo y no está asociada con la partenocarpia, que es la producción de frutos sin semilla. De hecho, el 75 % de los registros de apomixis en todas las angiospermas pertenecen a las familias Asteraceae, Poaceae y Rosaceae, relacionados con especies herbáceas pioneras que tienden a tener mayor plasticidad (Sánchez-Rendón et al., 2011), perennes, de clima templado y de amplia distribución (Werpachowski et al., 2004).

Las semillas de origen apomítico replican el genoma exacto de la planta madre, o cuando la polinización y la fertilización desencadenan el desarrollo del ovario, pero el óvulo/embrión aborta sin producir semilla madura (estenospermocarpia). En plantas monospermas, se ha visto que se producen frutos partenocárpicos como un mecanismo adaptativo ante la depredación de las semillas (Picarella & Mazzucato, 2019). Es decir que, las plantas alteran sus patrones reproductivos y fenológicos para enfrentar a los depredadores (West, 2012; Pickering, 2009). Eventos de este tipo fueron evidenciados en las tres especies de estudio. *S. chionogeton* y *W. nubigena* presentaron larvas en las inflorescencias maduras, y la última sufrió acción de la herbivoría en inflorescencias inmaduras.

Las semillas vacías de origen partenocárpico suelen permanecer durante un período muy largo en la planta, lo que entorpece la localización de las semillas llenas para los depredadores antes de la dispersión; en cambio, las semillas vacías resultantes de aborto, caen prematuramente (Perea et al., 2013). De cualquier modo, la familia Asteraceae es muy flexible en cuanto a estrategias reproductivas, lo cual ha sido crucial para su éxito en la colonización de variadas biogeografías (Hiscock, 2000). De allí, que otro factor que puede influir en la presencia de semillas vacías es la autoincompatibilidad total o parcial cuando se produce autopolinización; que en la lechuga es la forma de reproducción predominante (Křístková et al., 2008). Pero, a nivel de especies silvestres

se pueden dar escenarios de depresión endogámica o competencia por el polen (Nielsen et al., 2003).

Las poblaciones pequeñas pueden experimentar una disminución en la riqueza de alelos debido a la deriva genética. Así, por ejemplo, un número reducido de alelos S (especificidad o esterilidad) puede dar como resultado una mayor probabilidad de que los individuos compartan un alelo S y, por lo tanto, reducir el número de apareamientos compatibles (Nielsen et al., 2007). Es posible observar efectos demográficos importantes en dependencia de la cantidad de estos alelos. Esto puede modificarse de acuerdo al nivel de aislamiento de la población y esperarse que el número de individuos autocompatibles aumente en relación con los individuos incompatibles, si el cruzamiento por polinizadores es limitado (Silva et al., 2016). En ambientes de alta montaña se ha visto que la visita de polinizadores es muy variable debido a factores microclimáticos (Torres et al., 2007).

Lo cual es muy importante para las especies de estudio puesto que los páramos son considerados islas geográficas donde la distribución de las especies de interés estaba restringida a ciertas zonas de muestreo y características del suelo. Por ejemplo, *S. chionogeton* solo fue hallado entre los pajonales, en las pendientes de la montaña, mientras que a *W. pygmaea* se la encontraba predominantemente alrededor de la laguna, y en suelos muy pantanosos, por otra parte *W. nubigena* habitaba sitios bastante abonados en tierras llanas. Es decir, nunca hubo una distribución uniforme, ni una cobertura total de las especies de estudio en las distintas zonas de muestreo, generando pequeñas poblaciones de cada especie.

Finalmente, un alto número de semillas vacías indica que sería difícil obtener una cantidad adecuada para el uso efectivo de especies nativas en la restauración a escala de paisaje. Las áreas a ser restauradas pueden alcanzar magnitudes de decenas de miles de hectáreas que requerirían entre 5 a 7 kg/ha/especie (Meritt & Dixon, 2011). No

obstante, el cultivo *in vitro* puede ayudar a acelerar estos procesos de propagación, a través de la multiplicación de explantes combinada con fertilización cruzada en invernadero para obtener nuevos frutos y semillas con cierta variabilidad genética (Delgado, 2021).

En términos de conservación de germoplasma, las colecciones de semillas deben ser de alta calidad y viabilidad, con el objetivo de que las semillas sean capaces de germinar y establecer plántulas (Liu et al., 2020). La prueba de tetrazolio permite determinar la calidad y viabilidad de la semilla de forma indirecta y sin influencia de la dormancia, a través de la detección de la actividad respiratoria de los tejidos de la semilla (França & Krzyzanowski, 2019). Si los tejidos están muertos, no habrá actividad respiratoria, por lo tanto, las enzimas deshidrogenasas están inactivas; lo que provoca que las semillas no se colorean. Por el contrario, si la semilla es viable se produce formazán dándole la coloración rosa/rojiza (Gonzáles et al., 2019).

El protocolo guía elaborado por el ISTA (2016) para *Lactuca sativa* fue apropiado para las especies del género *Werneria*. Para *Senecio* se modificó el protocolo, aumentando la concentración de tetrazolio a 1.5 %, pero se mantuvo el tiempo y temperatura de incubación a 30 °C por 3 h. La literatura indica que se deben adecuar los procedimientos para especies silvestres pues lo determinado para semillas de cultivares no siempre es lo óptimo, aunque se puede usar como referencia (Mancipe-Murillo et al., 2018; Gonzáles et al., 2019; Siqueira et al., 2020).

Se encontró que la viabilidad relativa con respecto al número de semillas con embrión varió entre 48 al 81 %, en las especies concernientes a este trabajo. Para cultivares, el valor admitido para bancos es del 85 %, sin embargo, debe considerarse que este parámetro debe ser menor en especies silvestres (Liu et al., 2020). Si bien, se ha usado esta prueba post-germinación, hasta la fecha no hay registros sobre ensayos

paralelos de viabilidad realizados con tetrazolio para ninguna de las tres especies de estudio: tinción con tetrazolio vs. germinación (Siqueira et al., 2020).

Para hierbas de la familia Asteraceae se aprecian porcentajes de viabilidad que son inferiores al 50 % y otros que superan este porcentaje, llegando incluso cerca del 90 %. Para cuatro especies de hierbas ruderales pertenecientes a Asteraceae, se halló viabilidad entre 38.29 al 59.54 % de las semillas (Jiménez et al, 2020). Para la hierba de pajonal andino *Oritrophium peruvianum*, la viabilidad variaba entre el 76 a 89 % acorde a la época de recolección (lluviosa o seca) (Uliana et al., 2013). En especies con otro tipo de hábito se observó también variación en la viabilidad. En el género *Espeletia*, dependiendo de la especie, la viabilidad fue del 29 al 100 % (Mancipe-Murillo, 2020).

Estas variaciones en la calidad de las semillas dependen de varios factores. La etapa de desarrollo óptimo para la recolección de la semilla es sustancial, si las semillas se cosechan demasiado pronto, las semillas inmaduras pueden perder rápidamente viabilidad si aún no han adquirido tolerancia a la desecación, tienen menor longevidad (Liu et al., 2020). Otros determinantes de la viabilidad de las semillas son la temperatura de almacenamiento, el tiempo de almacenamiento, la humedad y la cantidad de oxígeno (Jiménez et al., 2020).

La baja viabilidad de *S. chionogeton* parece estar relacionada con el nivel de madurez en el que se recolectó la semilla, pues exhibió una gran cantidad de semillas vacías, y del bajo número que presentaron embriones, muy pocas fueron viables. Esto se explica porque en la formación de la semilla se producen dos pasos: el desarrollo del embrión y la maduración. En el paso de maduración se acumulan compuestos de almacenamiento (proteínas, grasa y carbohidratos) y protección que le permiten a la semilla activar el mecanismo de tolerancia a la desecación (proteínas embriogénicas, proteínas de choque térmico, oligosacáridos y antioxidantes) (Smolikova et al., 2021).

En el género *Werneria* la viabilidad fue del 50 al 80 % aproximadamente. *W. pygmaea* expresó la viabilidad más baja en contraste con *W. nubigena*. Las razones de esta diferencia son que *W. pygmaea* es abundante en los sitios de muestreo, no obstante, el tamaño de la semilla de esta especie es menor que su contraparte, y además la morfología de la testa es distinta. Las semillas de *W. nubigena* posee vellosidades que permiten la mayor conservación de la humedad, lo que permitió impedir una rápida desecación (Garibotti et al., 2015; Wang et al., 2021).

El daño de las semillas durante el manejo o almacenamiento puede ser otra causa de la pérdida de viabilidad. La combinación de una mayor humedad y temperatura ambiente (mayor a la óptima de almacenamiento), pueden promover alteraciones en el metabolismo de las semillas y causar cambios estructurales en las proteínas. A nivel molecular, la acumulación de ROS efectúa modificaciones e interacciones con lípidos, el ADN y las proteínas (Smolikova et al., 2021).

Ensayos de Desinfección

Los medios sólidos en placas Petri se usan comúnmente en varias aplicaciones con semillas, como la evaluación de germinación, identificación de mutantes, observación de fenotipos de brotes y raíces, etc. Por lo tanto, es fundamental un régimen eficaz de desinfección superficial de semillas para retirar contaminación de distinto tipo que pueda interferir en la germinación y crecimiento de las plántulas (Lindsey et al., 2017). Lavados con jabón, alcohol y cloro comercial son muy utilizados en protocolos de desinfección a nivel *in vitro*. Este último es el desinfectante más empleado por sus características como fungicida, bactericida, esporicida, de fácil manejo, bajo costo y acción escarificante en ciertas especies (Khasa, 1992; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017).

Las plantas están asociadas a distintos organismos con los que pueden tener interacciones comensales o enemigos naturales especializados como los hongos patógenos. Mientras que, los hongos endófitos pueden convivir en su huésped sin causar

enfermedad fácilmente visible. Este tipo de hongos pueden afectar el desempeño de la planta, especialmente bajo estrés al promover el desarrollo de las plántulas o disminuir el desempeño de las especies competidoras (Geisen et al., 2017). En el primer ensayo de desinfección, esto viene a ser de interés puesto que se produjo un mayor surgimiento de contaminación en los cultivos con tratamientos de desinfección en comparación con los controles. Ninguna de las concentraciones de cloro (2-5 %) tuvo un efecto significativo para la eliminación de la contaminación cuando la cantidad de muestra abarcó 150 semillas sin vilano, por tratamiento.

En un segundo ensayo, al disminuir la cantidad de muestra a menos de la mitad de semillas sin vilano, se observó la acción desinfectante de las concentraciones de cloro más altas 3.5 y 5%, en tiempos más prolongados, 10 y 15 minutos. En otro estudio realizado con especies de tipo arbustivo, se usaron concentraciones más altas de cloro (6 a 7 %), pero en tiempos medios de 5 y 10 min en semillas con vilano. Es importante decir, que los sustratos fueron diferentes, el usado en este trabajo fue agar al 0.75 %, mientras que en otro se usó $\frac{1}{2}$ MS, que es más propenso a contaminación por la disponibilidad de nutrientes (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017). En contraposición en una investigación con semillas de herbáceas la concentración de cloro usada fue de tan solo el 2 %, en un sustrato de papel filtro (Masini et al., 2016).

La reducción de la cantidad de muestra tuvo gran impacto, porque la destrucción de las esporas obedece a las distintas variables como el tipo y condición de la semilla (origen, clima, pH del suelo), cantidad de contaminación superficial, concentración del desinfectante y tiempo de exposición. De esta forma burbujas de aire, grietas, pelos superficiales y desechos influyen en el nivel de contacto del contaminante (principalmente esporas) con el desinfectante, provocando que ciertos tratamientos sean menos efectivos que otros (Sauer & Burroughs, 1986; Cárdenas et al., 2019).

Ensayos de Germinación

En condiciones extremas de temperatura y luz, la especie *W. pygmaea*, no mostró respuesta germinativa. En tanto que, a temperatura media de 20/10 °C y 12 h luz/12 h oscuridad, la latencia se rompió en el día 5 alcanzando una capacidad germinativa de 26.7 %, a pesar de que la viabilidad determinada con el ensayo de TTZ fue aproximadamente 50 %. Otras investigaciones sostienen que esto puede deberse a la latencia fisiológica que caracteriza a la familia Asteraceae (Wu et al., 2013). Así, en *Helichrysum aureonitells*, una hierba de esta familia, mostró una viabilidad del 82 %; mientras que, el porcentaje de germinación fue solo del 34 %. Este parámetro fue significativamente mejorado con la aplicación de ácido giberélico (GA₃) (Afolayan & Meyer, 1997).

El ácido giberélico es una fitohormona muy eficiente para el rompimiento la latencia fisiológica en especies con fotoblastia positiva y fotodormancia, de tal manera que puede estimular la germinación en condiciones de oscuridad completa (Monemizadeh et al, 2021). A nivel fisiológico, la modulación de las señales ambientales afecta el control hormonal de la latencia de las semillas, equilibrio dinámico entre el ácido giberélico (GA) y el ácido abscísico (ABA), por ello las semillas pueden ser sensibles ante estímulos hormonales externos (Klupczyńska & Pawłowski, 2021).

En cuanto a *W. nubigena*, la ruptura de la latencia se produjo a los 3 días en todas las condiciones de luz y a temperatura media (20/10°C); pero, a temperatura baja (5°C) la brotación comenzó en el día 5. No hubo respuesta germinativa a 30 °C, a temperatura baja la germinación fue 20 %, y la máxima cantidad de semillas germinadas se obtuvo a temperatura media. Puede germinar en oscuridad y luz, con G entre 30 a 57 %. Las velocidades más bajas de germinación se dieron a temperatura baja y en oscuridad. La viabilidad encontrada en esta especie con el ensayo de tetrazolio fue de

aproximadamente el 81 %, que es mucho mayor a lo producido en la germinación, lo que se traduce latencia fisiológica al igual que la otra especie de este género.

Ahora bien, otros autores sugieren que la inhibición térmica a 30 °C se produjo por el aumento en los niveles de ABA, impidiendo la protrusión de la radícula (Guo et al., 2020). Con respecto a las respuestas ante el fotoperíodo, se conoce que la luz es un determinante ambiental crítico para la germinación en algunas plantas con semillas pequeñas, como *Lactuca sativa* (lechuga), *Lycopersicon esculentum* (tomate) y *Arabidopsis thaliana*. Hay evidencia de que la biosíntesis de GA está regulada por el fitocromo en la germinación de semillas de *L. sativa* y *A. thaliana*, regulado y dependiente de la luz (Yamauchi et al., 2004). Consecuentemente, la germinación de *W. nubigena* bajo diferentes condiciones de luz, significa que la semilla estuvo en un punto de madurez en el que ya había suficiente producción AG que permita la protrusión, a pesar de la ausencia de luz.

Adicionalmente, y aunque esta especie fue capaz de germinar en oscuridad, se observan efectos negativos en las plántulas, exhibiendo menor pigmentación en las hojas. Este fenómeno puede relacionarse con la senescencia inminente de la plántula si no llega a recibir luz, por disminución de la función fotosintética y la pérdida de estructuras de cloroplastos (Mishev et al., 2008).

En *S. chionogeton* la ruptura de la latencia ocurrió entre los 3 y 15 días según las condiciones de luz y temperatura. La germinación fue temprana en presencia de luz total y se demoró más en temperaturas extremas. La capacidad germinativa fue inferior del 3.3 y 20 % en las temperaturas de 5 y 30 °C, pero en condiciones de 12 h de luz a temperatura intercala 20/10 °C se obtuvo 71.70 % de germinación. La velocidad más baja de germinación se produjo a 30°C, seguida de 5 °C. En presencia de luz total y 12 h/12 h luz la capacidad germinativa superó el 50 %, con similares velocidades de germinación en comparación con la velocidad en condiciones de oscuridad. En oscuridad la capacidad germinativa alcanzó el 15 %.

Estudios realizados en *Senecio vulgaris* registran que la dormancia de las semillas varía de acuerdo a las fechas de recolección, se reportó rompimiento de la latencia a los 3 y 5 días cuando la recolección fue en otoño y verano, respectivamente (Ndiokubwayo et al., 2016). Bajo condiciones de oscuridad total esta especie exhibió una capacidad germinativa (G) inferior al 5 % y la máxima se produjo en luz total a 20 °C. La temperatura óptima de crecimiento es de 22 °C, pero puede crecer normalmente en temperaturas más bajas, hasta los 8 °C; dependiendo del ecotipo pueden germinar mejor a temperaturas continuas de 10 o 20 °C. En cambio, a 5 °C puede alcanzarse el 17 % de germinación en 6 semanas y si después de ello se eleva la temperatura a 25 °C fácilmente se incrementa G al 70 % (Robinson et al., 2003). La germinación acumulada (83 % o >90 %) fue óptima bajo temperaturas alternadas 20/10 °C o 15 °C, 12 h luz / 12 h oscuridad. Hasta aquí, se comprueba el comportamiento germinativo de este género descrito en este trabajo, aunque con una capacidad germinativa reducida (Robinson et al., 2003; Masini et al., 2016; Ndiokubwayo et al., 2016). La germinación alta y rápida en luz es característico en especies que favorecen los parches abiertos y la perturbación (Suter & Lüscher, 2012).

En condiciones de altas temperaturas el comportamiento es diferente, ya que el mismo estudio señala que a temperaturas alternas de 29 /22 °C las plantas florecen y no fructifican. Más, en ensayos de germinación *S. vulgaris* pudo resistir hasta 31 y 42 °C, con un detrimento en su capacidad de germinar, llegando al 58 y 47 % (Robinson et al., 2003). Para este estudio el incremento de la temperatura a 30 °C tuvo un impacto negativo en la germinación, lo que pudo haber implicado la pérdida de viabilidad de las semillas o dormición secundaria, ya que está asociada a altas temperaturas, poca lluvia y mucha luz solar. Por último, también es importante notar que las poblaciones invasoras revelan altas tasas de germinación que las poblaciones nativas (Ndiokubwayo et al., 2016).

La variación de latencia en las especies seleccionadas tiene mucho que ver con las condiciones de germinación a las que fueron expuestas las semillas, pues los cambios ambientales o estacionales inducen la existencia o ausencia de latencia y las transiciones

evolutivas entre estos estados. Por esta causa, es necesario entender la sensibilidad de una especie a las variaciones climáticas. Acorde a modelos estudiados se sabe que las crecientes temperaturas no limitarán la germinación directamente, pero disminuirá el número de eventos de germinación porque se reducen las ventanas de tiempo de agua disponible en el suelo (Shaban, 2013). Por consiguiente, se encontró una clara correlación entre la latencia de las semillas con el ambiente de maduración, es decir que, las temperaturas más altas en el verano y las precipitaciones invernales desencadenan una pérdida de latencia escasa y rápida, correspondientemente. También, es probable que se produzcan semillas no viables hasta el final de las temporadas desfavorables (Shaban, 2013).

En el marco del cambio climático, las alteraciones de la temperatura pueden resultar beneficioso para algunas especies con gran plasticidad, permitiéndoles encontrar nuevos nichos ecológicos. No obstante, se ha demostrado que la latencia tiene un componente genético ligado a las temperaturas actuales y pasadas experimentadas por la planta madre, que controla la germinación de las semillas de la progenie a través de la activación de ciertos genes (Klupczyńska & Pawłowski, 2021).

Capítulo VI: Conclusiones

El estudio de especies vegetales de ecosistemas amenazados como el páramo es esencial no solo para el diseño de estrategias de conservación *ex situ*, sino para la determinación y manejo de potenciales especies invasoras o pioneras en el contexto de cambio climático.

Las interacciones bióticas y abióticas pueden influir en las estrategias reproductivas (asignación de recursos), el tiempo de latencia, capacidad y velocidad de germinación de una determinada especie.

El largo de las semillas varió en un rango de los 1.5 a 2.3 cm y el ancho entre 0.7 a 1.0 cm, mientras que su peso estuvo en un rango entre los 96 y 260 mg dependiendo la especie.

Concentraciones de 2.0 a 5.0 % de hipoclorito de sodio son efectivas a tiempos de 10 y 15 minutos para la desinfección dependiendo de la especie.

Senecio chionogeton exhibió el mayor porcentaje de germinación (71.7 %) y la especie con mayor porcentaje de viabilidad (80.9 %) fue *Werneria nubigena*.

Las especies *W. pygmaea*, *W. nubigena* y *S. chionogeton* tienen fotoblastia positiva y germinan de forma óptima a temperaturas alternas de 20 /10 °C.

Capítulo VII: Recomendaciones

Es importante siempre recoger datos de ecología que pueden estar asociados con la respuesta germinativa.

El estudio de la geminación desde un enfoque filogenético podría ser de gran valor para predecir de forma rápida los patrones de germinación acorde a los distintos taxones.

Es necesario implementar metodologías que permitan evaluar rápida y masivamente la presencia de embriones en semillas pequeñas como las de la familia Asteraceae.

Los ensayos de desinfección pueden optimizarse enfocándose en las épocas de recolección (verano-invierno) y tipo de semilla.

Para la conservación *ex situ* es necesario el manejo de una gran cantidad de semillas que produzcan plántulas, por lo tanto, es importante optimizar ensayos de desinfección para cultivo *in vitro* con cantidades de semillas superiores a 15 por caja Petri.

Se sugiere estudiar la influencia del contenido de humedad y humedad relativa en la capacidad germinativa y almacenamiento de semillas.

Otra posible interacción a ser analizada es la del microbioma de las semillas y su influencia en la capacidad germinativa.

Referencias

- Acuña, I. (2006). Tolerancia a la herbivoría y compensación fotosintética en los Andes de Chile central: El efecto nodriza de *Laretia acaulis*. Concepción, Chile: Universidad de Concepción.
- Aguirre, N., Aguirre-Mendoza, J., Aguirre-Mendoza, L., Aguirre-Mendoza, Z., Alulima, A., Cajamarca, P., Cevallos, P., Eguiguren, P., Maita, J., Merino, B., Ochoa, I., Ojeda-Luna, T., Rengel, E., Salinas, L., Salinas, K., Samaniego, N. & Santin, J. (2015). Cambio Climático y Biodiversidad: Estudio de caso de los páramos del Parque Nacional Podocarpus, Ecuador. Loja, Ecuador: Programa de biodiversidad y Servicios Ecosistémicos. Universidad Nacional de Loja.
- Afolayan, A. & Meyer, J. (1997). Germination in *Helichrysum aureonitells* (Asteraceae): Effects of temperature, light,. *South African Journal of Botany*, 22-24. Obtenido de <https://pdf.sciencedirectassets.com>
- Al-Ansari, F. & Ksiksi, T. (2016). A Quantitative Assessment of Germination Parameters: the Case of *Crotalaria persica* and *Tephrosia apollinea*. *The Open Ecology Journal*, 13-21.
- Asturnatura. (2004). *Senecio* L. Obtenido de <https://www.asturnatura.com/genero/senecio.html>
- Beltrán, H. (2015). El género *Senecio* L. (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima - Perú. *Arnaldoa*, 9-24.
- Beltrán, H. (2017). Sinópsis del género *Werneria*. *Arnaldoa*, 45-62.
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., Cárdenas, A. & Velástegui, A. (2009). Distribución espacial, sistemas ecológicos, y caracterización florística de los páramos de Ecuador. EcoCiencia, Proyecto Páramo Andino y Herbario, QCA.

- Bendix, J., Nieschulze, J. & Michener, W. (2012). Data platforms in integrative biodiversity research. *Ecological Informatics*, 1-4. doi:10.1016/j.ecoinf.2012.04.001
- Bessada, S., Barreria, J. & Olivera, B. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their prominent bioactivity . *Industrial crops and products*, 604-615.
- Botanic Gardens Conservation International. (2021). *Seeds Conservation*. Obtenido de Why do we have seed banks?. <https://www.bgci.org/our-work/plant-conservation/seed-conservation/>
- Cárdenas, C., Araque, J., Bohórquez, M., Hernández, Y. & Pacheco, J. (2019). Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Paramos colombianos. *Rodriguésia*. doi:10.1590/2175-7860201970057
- Carrera-Navarrete, E. (2014). Estudio del efecto de AG₃ en semillas de *Valeriana pyramidalis*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Calisto-Díaz, L. (2019). *Guía de plantas del alto Pita*. FONAG.
- Chin, H., Krishnapillay, B. & Stanwood, P. (1989). Seed moisture: Recalcitrant vs. Orthodox Seeds. Obtenido de https://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/chin1996.pdf
- Chuncho-Morocho, C. & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 71-83.
- Contreras, S., Bennet, M. & Tay, D. (2009). Temperature during seed development affects weight, germinability and storability of lettuce seeds. *Seed Science and Technology*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/233609168_Temperature_during_seed_development_affects_weight_germinability_and_storability_of_lettuce_seeds
- Contreras, S., Rabara, R., Bennett, M., Tay, D. & McDonald, M. (2008). Acquisition of germination capacity, photosensitivity, and desiccation tolerance in lettuce seeds.

- Seed Science and Technology*, 667-678.
doi:https://www.researchgate.net/publication/233621982_Acquisition_of_germination_capacity_photosensitivity_and_desiccation_tolerance_in_lettuce_seeds
- Cresso, M., Clerici, N., Sánchez, A. & Jaramillo, F. (2020). Future Climate Change Renders Unsuitable Conditions for Paramo Ecosystems in Colombia. *Sustainability*. doi:10.3390/su12208373
- Cuesta, F., Báez, S., Tovar, C., Devenish, C., Buytaert, W. & Jarvis, A. (2012). Síntesis de los impactos y estado del conocimiento de los efectos del cambio climático en la biodiversidad de los Andes Tropicales. Lima: CONDENSAN, SGCAN.
- Dalziel, E., Funnekotter, B., Mancera, R. & Merritt, D. (2019). Seed storage behaviour of tropical members of the aquatic basal angiosperm genus *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae). *Conservation Physiology*. doi:doi.org/10.1093/conphys/coz021
- Daws, M., Garwood, N. & Pritchard, H. (2005). Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panamá: some ecological implications. *Functional Ecology*, 874-855. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01034.x
- Dayrell, R., García, Q., Negreiros, D., Baskin, C., Baskin, J. & Silveira, F. (2017). Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. *Annals of Botany*, 267-277. doi:10.1093/aob/mcw163
- De Jager, M., Kaphingst, B., Janse, E., Buisman, R., Rinzema, S. & Soons, M. (2018). Seed size regulates plant dispersal distances in flowing water. *Journal of Ecology*, 307-317.
- Delgado, G. (2021). *In vitro* tissue culture in plants propagation and germplasm conservation of economically important species in Peru. *Scientia Agropecuaria*, 337-349. doi:10.17268/sci.agropecu.2021.037

- Del Vitto, L. & Petenatti, L. (2015). Asteráceas de importancia económica y ambiental
Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. *Multequina*, 47-74.
- Díaz, M., Navarrete, J. & Suárez, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles.
Universidad de Los Andes, 64-69.
- Dudley, N. (2008). Directrices para la aplicación de las categorías de gestión de áreas protegidas. Gland, Suiza: IUCN. Obtenido de
<https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/paps-016-es.pdf>
- FAO. (2019). Materiales para capacitación en semillas. Módulo 6:Almacenamiento de semillas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura .
- Fernández, D., Cuamacás, B., Freire, E., Haro, M., Herrera, V., Obando, B., Palacios, W., Peñafiel, M., Rea, E., Ulloa, C., Unda, M. & Yáñez, A. (2015). Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador. Quito: Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad .
- Franca-Neto, J. & Krzyzanowsky, F. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 359-366.
- Galíndez, G., Ortega-Baes, P., Daws, M., Suhring, S., Scopel, A. & Pritchard, H. (2009). Seed mass and germination in Asteraceae species of Argentina . *Seed Science and Technology*, 786-790.
- Garibotti, M., Cardoso, E., Rodrigues, S. & Appezzato, B. (2015). Trichomes related to an unusual method of water retention and protection of the stem apex in an arid zone perennial species. *AoB PLANTS*. doi:10.1093/aobpla/plu088
- Geisen, S., Kostenko, O., Crossen, M., Ten Hooven, F., Vres, B. & Van Der Putten, W. (2017). Seed and Root Endophytic Fungi in a Range Expanding and a Related Plant Species. *Frontiers in Microbiology*.

- Geritz, S. (1995). Evolutionarily stable seed polymorphism and small-scale spatial variation in seedling density. *The American Naturalist*. Obtenido de <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/285820>
- González-Zertuche, L. & Orozco-Segovia, A. (1996). Métodos de Análisis de datos de germinación, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 15-30.
- GBIF Secretariat. (2021). *GBIF Backbone Taxonomy*. Obtenido de Checklist dataset: <https://www.gbif.org/species/6291134>
- González de la Cruz, M., Baldeón, S., Beltrán, H., Jullian, V. & Bpurdy, G. (2014). Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). *Journal of Ethnopharmacology*, 1093-1117. doi:10.1016/j.jep.2014.06.042
- González, L., Pita, B., Pinzón, E., Cely, G. & Serrano, P. (2018). Efecto de tratamientos pregermiantivos en semillas de *Dianthus barbatus* L. cv. "Purple" bajo condiciones controladas. *Revista de Ciencias Agrícolas*.
- González, M., Zanatta, T. & Meneghello, G. (2019). Chia seed viability analysis protocol by tetrazolium test. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. doi:10.29312/remexca.v10i7.1095
- Guo, C., Shen, Y. & Shi, F. (2020). Effect of Temperature, Light, and Storage Time on the Seed Germination of *Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.: The Role of Seed-Covering Layers and Abscisic Acid Changes. *Forests*. doi:10.3390/f11030300
- Hammond, G., Fernández, I., Villegas, L. & Vasiberg, A. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, 17-30. doi:10.1016/S0378-8741(98)00009-9

- Harding, M. & Kirkpatrick, J. (2018). Short-term recovery of cushion plant communities after fire on the central plateau, Tasmania. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, 9-15. Obtenido de <https://eprints.utas.edu.au/28926/1/02%20HardingKirkp.pdf>
- Hiscock, S. (2000). Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Annals of Botany*, 171-190. doi:10.1006/anbo.1999.1058
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A. & Cerra, M. (2014). Los páramos andinos: ¿Qué sabemos?. Estado de conocimiento sobre el Impacto del Cambio Climático en el ecosistema de páramo. Quito: UICN.
- Hofstede, R., Segarra, P. & Mena, P. (2003). Los páramos del mundo. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. IUCN-Global Peatland Initiative-Ecociencia.
- Hong, T., Linington, S. & Ellis, R. (1996). *Seed Storage Behaviour: a Compendium . Handbooks for Genebanks No. 4*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. Obtenido de https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Seed_storage_behavior__a_compendium_1576.pdf
- Huntingford, C., Mercado, L. & Post, E. (2013). Earth science: The timing of climate change. *Nature*, 174-175. doi:10.1038/502174a
- INABIO. (2017). Agenda Nacional sobre Investigación de Biodiversidad. MAE-SENESCYT-INABIO.
- INABIO. (29 de enero de 2019). *Agenda Nacional de Investigación sobre la Biodiversidad*. Obtenido de VI Informe: Medidas o Acciones. <http://inabio.biodiversidad.gob.ec/2019/01/29/red-nacional-sobre-la-diversidad-biologica-del-ecuador-redbio/>

- iNaturalist. (2021). Chicoria Blanca. *Werneria nubigena*. Obtenido de <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/316886-Werneria-nubigena>
- IPCC. (2019). Calentamiento global de 1,5°C. OMM/PNUMA.
- Isaac, J. & Williams, S. (2013). *Climate change and extinctions*. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press.
- ISTA. (2016). *Rules for Seed Testing*. Bassersdorf, Suiza: The International Seed Testing Association.
- IUCN/SSC. (2014). *Guidelines on the Use of Ex Situ Management for Species Conservation. Version 2.0*. Switzerland: IUCN Species Survival Commission. Obtenido de <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-064-Es.pdf>
- Jiménez, A., Flores-Palacios, A., Flores-Morales, A., Perea, I., Gutiérrez, M., Arellano, J. & Valencia, S. (2020). Seed longevity, viability and germination of four weed-ruderal Asteraceae species of ethnobotanic value. *Botanical Sciences*, 279-290. doi:<https://doi.org/10.17129/botsci.2743>
- Kangsopa, J., Hynes, R. & Siri, B. (2018). Lettuce seeds pelleting: A new bilayer matrix for lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Seed Science and Technology*, 521-531. doi:[10.15258/sst.2018.46.3.09](https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.3.09)
- Karl, T. & Trenberth, K. (2003). Modern Global Climate Change. *Science*, 1719-1723. doi:[10.1126/science.1090228](https://doi.org/10.1126/science.1090228)
- Khasa, P. (1992). Scarification of Limba Seeds With Hot Water, Bleach, and Acid. *Tree Planter 's Notes*.
- Klupczyńska, E. & Pawłowski, T. (2021). Regulation of Seed Dormancy and Germination Mechanisms in a Changing Environment. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:[10.3390/ijms22031357](https://doi.org/10.3390/ijms22031357)

- Křístková, E., Doležalová, I., Lebeda, A., Vinter, V. & Novotná, A. (2008). Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*, 113-129. Obtenido de https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/4_2008-HORTSCI.pdf
- León, P., Rosas, M., Guerrero, P., Sandoval, A. & Way, M. (2008). Conservación ex situ de la flora de la región de Atacama: métodos, experiencias y desafíos futuros. Ediciones Universidad de La Serena.
- León- Yáñez, S. (2018). *Bioweb*. Obtenido de Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/paramos/>
- Lindsey, B., Rivero, L., Calhoun, C., Grotewold, E. & Brkljacic, E. (2017). Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. *Journal of Vizualized Experiments*. doi: 10.3791/56587
- Liu, Y., Barot, S., El-Kassaby, Y. & Loeuille, N. (2016). Impact of temperature shifts on the joint evolution of seed dormancy and size. *Ecology and Evolution*, 26-37. doi:10.1002/ece3.2611
- Liu, U., Cossu, T., Davies, R., Forest, F., Dickie, J. & Breman, E. (2020). Conserving orthodox seeds of globally threatened plants ex situ in the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: the status of seed collections. *Biodiversity and Conservation*, 2901-2949. doi:10.1007/s10531-020-02005-6
- Llambi, L. & Cuesta, A. (2014). La diversidad de los páramos andinos en el espacio y en el tiempo. Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas –ICAE, Universidad de los Andes. Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN).
- Loarie, S., Duffy, P., Hamilton, H. & Asner G.P., F. C. (2009). The velocity of climate change. *Nature*, 1052-1055. doi:10.1038/nature08649

- MAE. (2019). Plan Nacional de Restauración Forestal. *Ministerio de Ambiente*. Obtenido de https://lexis.ueb.edu.ec/Webtools/LexisFinder/DocumentVisualizer/DocumentVisualizer.aspx?id=AMBIENTE-MINISTERIO_DEL_AMBIENTE_PLAN_NACIONAL_DE_RESTAURACION_FORESTAL&query=
- Mahé, I., Cordeau, S., Bohan, D., Derrouch, D., Dessaint, F., Millot, D. & Chauvel, B. (2020). Soil seedbank: Old methods for new challenges in agroecology? *Annals of Applied Biology*, 23-38.
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M. & Pérez-Martínez, L. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia*, 366-382.
- Mancipe-Murillo, C. (2020). Propagación de *Espeletiaopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis* y *Espeletia killipii* en condiciones de invernadero. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 780-793. doi:10.18257/raccefyn.1105
- Masini, C., Rovere, A. & Pirk, G. (2016). Germinación de *Gutierrezia solbrigii* y *Senecio subulatus*, asteráceas endémicas de Argentina. *International Journal of Experimental Botany*, 314-323.
- Merrit, D. & Dixon, K. (2011). Restoration Seed Banks -A Matter of Scale. *Science*, 424-425. doi:10.1126/science.1203083
- Minga, D., Ansalloni, R., Verdugo, A. & Ulloa, C. (2016). *Flora del Páramo del Cajas*. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay.

- Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (01 de 06 de 2021). *Programas y Servicios*. Obtenido de Parque Nacional Cayambe-Coca.
<https://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-cayambe-coca/>
- Ministerio de Ambiente y Agua. (2020). *Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe-Coca: 2020-2030*. MAAE-CEPP.
- Mishev, K., Stefanov, D., Ananieva, K., Slavov, C. & Ananiev, E. (2008). Different effects of dark treatment on pigment composition and photosystem I and II activities in intact cotyledons and primary leaves of *Cucurbita pepo* (zucchini). *Plant Growth Regulation*, 61-71. doi: 10.1007/s10725-008-9352-x
- Missouri Botanical Garden. (2021). *Flora Illustrada*. Obtenido de *Werneria pygmaea*:
<http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Werneria%20pygmaea>
- Mitra, S. & Kumar, S. (2018). Studies on the Ethnobotanically, Economically and Commercially Important Species of Asteraceae from West Bengal. *Journal of Economy, Environment and Society*, 53-62.
- Monemizadeh, Z., Ghaderi-Far, F., Sadeghipour, H., Siahmarguee, A., Soltani, E., Torabi, B. & Baskin, C. (2021). Variation in seed dormancy and germination among populations of *Silybum marianum* (Asteraceae). *Plant Species Biology*, 1-13.
doi:10.1111/1442-1984.12326
- Mora, C., Frazier, A., Longman, R., Dacks, R., Walton, M. & Tong, E. (2013). The projected timing of climate departure from recent variability. *Nature*, 183-187. doi: 10.1038/nature12540
- Morales-Betancourt, J. & Estévez-Varón, J. (2006). El páramo: ¿Ecosistema en vía de extinción? *Luna Azul*, 39-51.

- Ndihokubwayo, N., Nguyen, V. & Cheng, D. (2016). Effects of origin, seasons and storage under different temperatures on germination of *Senecio vulgaris* (Asteraceae) seeds. *PeerJ*. doi:10.7717/peerj.2346
- Nielsen, L., Siegismund, H. & Philipp, M. (2003). Partial self-incompatibility in the polyploid endemic species *Scalesia affinis* (Asteraceae) from the Galápagos: remnants of a self-incompatibility system? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 93-101. doi:10.1046/j.1095-8339.2003.00168.x
- Nielsen, L., Siegismund, H. & Hansen, T. (2007). Inbreeding depression in the partially self-incompatible endemic plant species *Scalesia affinis* (Asteraceae) from Galápagos islands. *Evolutionary Ecology*, 1-12. doi:10.1007/s10682-006-9128-6
- NOAA. (2020). *National Oceanographic and Atmospheric Administration*. Obtenido de Temperatura media en Quito: <https://www.google.com/search?q=tmperatura+media+en+Quito>
- Olejniczak, P., Czarnoleski, M., Delimat, A., Marek, B. & Szczepka, K. (2018). Seed size in mountain herbaceous plants changes with elevation in a species-specific manner. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0199224
- Organización de las Naciones Unidas. (1993). *Convenio de Diversidad Biológica*. Obtenido de <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/12/CONVENIO-SOBRE-DIVERSIDAD-BIOLOGICA.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas. (22 de 01 de 2021). Asuntos que nos importan. Obtenido de Cambio climático. <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/climate-change/index.html#:~:text=Las%20emisiones%20netas%20mundiales%20de,cero%20neto%22%20aproximadamente%20en%202050.>

- Palomeque, X., Patiño, C., Marín, F., Palacios, M. & Stimm, B. (2020). Effects of storage on seed germination and viability for three native tree species of Ecuador. *Springer*.
- Patiño, F. (1997). *Recursos genéticos de Swietenia y Cedrela en los neotropicos*. Obtenido de Conservación de recursos genéticos. <http://www.fao.org/3/ad111s/AD111S05.htm>
- Pauli, H., Gottfried, M., Dullinger, S., Abdaladze, O., Akhalkatsi, M. & Benito, J. (2012). Recent plant diversity changes on Europe's mountain summits. *Science*, 353-355. doi:10.1126/science.1219033
- Pazmiño-Celi, R. (2011). Caracterización morfológica de semillas y proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Peñaloza, P., Ramirez, G., McDonal, M. & Bennet, M. (2005). Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi:10.2225/vol8-issue3-fulltext-11
- Peralta-Maraver, I. & Rezende, E. (2021). Heat tolerance in ectotherms scales predictably with body size. *Nature Climate Change*, 58-63. doi:10.1038/s41558-020-00938-y
- Perea, R., Venturas, M. & Gil, L. (2013). Empty Seeds Are Not Always Bad: Simultaneous Effect of Seed Emptiness and Masting on Animal Seed Predation. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0065573

- Pérez-Martínez, B. & Castañeda-Garzón, S. (2017). Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Recursos Genéticos Forestales*, 1-11.
- Picarella, M. & Mazzucato, A. (2019). The Occurrence of Seedlessness in Higher Plants; Insights on Roles and Mechanisms of Parthenocarpy. *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2018.01997
- Pickering, C. (2009). Pre-dispersal Seed Predation by Tephritidae Is Common among Species of Australian Alpine Asteraceae. *Artic, Antartic, and Alpine Research*. doi:doi.org/10.1657/1938-4246-41.3.339
- Plisko, A. & Kostrakiewicz-Gieralt, K. (2017). Seed germination in *Solidagoxniederederi* (Asteraceae) and its parental species after two different fruit storage periods. *Biodiversity:Research and Conservation*, 19-24.
- Posada, J. (2014). El papel de la dispersión de semillas en la regeneración de la vegetación de páramo en un paisaje fragmentado. *Universidad de Los Andes*, 7-24.
- Rivera-Guerra, A. (2020). Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador. *Collectanea Botanica*.
- Richter, M., Diertl, K., Emck, P., Peters, T. & Beck, E. (2009). Reasons for an outstanding plant diversity in the tropical Andes of Southern Ecuador. *Landscape Online*, 1-35. doi:10.3097/LO.200912
- Robinson, D., O'Donovan, J., Sharma, M., Doohan, D. & Figueroa, R. (2003). The Biology of Canadian Weeds. 123. *Senecio vulgaris* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 629-644. doi:10.4141/P01-124

- Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health . *International Journal of Molecular Sciences*, 1-17.
- Romero-Saritama, J. (2016). Caracterización morfofisiológica de semillas de especies leñosas distribuidas en dos zonas secas presentes en el Sur de Ecuador. Universidad Politécnica de Madrid.
- Romero-Saritama, J. & Pérez-Ruiz, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de especies leñosas en los bosques secos Tumbesinos. *Ecosistemas*, 59-65. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/540/54046745007.pdf>
- Romero-Saritama, J. & Cueva-Ojeda, D. (2020). Seeds size and germination of *Pernettya prostrata* (Ericaceae): a specie from the Andean paramo. *Caldasia*, 326-329.
- Sánchez-Rendón, J., Suárez-Rodríguez, A., Montejo-Valdés, L. & Muñoz-García, B. (2011). Climate change and the seeds from the cuban native plants. *Acta Botánica Cubana*, 38-50. Obtenido de <http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/2416/1/El%20cambio%20clim%C3%A1tico%20y%20las%20semillas%20de%20las%20plantas%20nativas%20cubanas.pdf>
- Sauer, D. & Burroughs, R. (1986). Disinfection of Seed Surfaces with Sodium Hypochlorite. *Techniques*, 745-749. Obtenido de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n07_745.PDF
- Secretaría del Convenio de Diversidad Biológica. (2011). *Convenio de la Diversidad Biológica: ABS*. Obtenido de Uso de los Recursos Genéticos: <https://www.cbd.int/abs/infokit/revised/web/factsheet-uses-es.pdf>

- Serrano, S., Ruiz, C. & Bersosa, F. (2017). Heavy rainfall and temperature projections in a climate change scenario over Quito, Ecuador. *La Granja*.
- Shaban, M. (2013). Effect of water and temperature on seed germination and emergence as a seed. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1686-1691. Obtenido de http://www.ijabbr.com/article_7963_4f37c8e5e1bfa0fe7c5b27342c7144ed.pdf
- Shamso, E., Hosni, H., Ahmed, D. & Shalout, K. (2021). Achene Characteristics of Some Taxa of Asteraceae from the. *Egyptian Journal of Botany*, 1-31. doi:10.21608/ejbo.2021.50068.1583
- Sierra-Almeida, A. & Cavieres, L. (2010). Summer freezing resistance decreased in high-elevation plants exposed to experimental warming in the central Chilean Andes. *Oecología*, 237-276. doi:10.1007/s00442-010-1592-6
- Silva, J., Brennan, A. & Mejías, J. (2016). Population genetics of self-incompatibility in a clade of relict cliff-dwelling plant species. *AoB PLANTS*. doi: 10.1093/aobpla/plw029
- Simpson, M. (2010). Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. En M. Simpson, *Plant Systematics* (págs. 275-448). Academic Press.
- Siqueira, L., Moreno, M., Alemida, M., Nogueira, A. & Kratz, D. (2020). Adjustments in the tetrazolium test methodology for assessing the physiological quality of *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae). *Bosque (Valdivia)*. doi:10.4067/S0717-92002020000100077
- Smolikova, G., Leonova, T., Vashurina, N., Frolov, A. & Medvedev, S. (2021). Desiccation Tolerance as the Basis of Long-Term Seed Viability. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms22010101

- Suter, M. & Lüscher, A. (2012). Rapid and High Seed Germination and Large Soil Seed Bank of *Senecio aquaticus* in Managed Grassland. *Scientific World*. doi:10.1100/2012/723808
- Tchokponhoué, D. & Achigan-Dako, E. (2019). A combination of approaches evidenced seed storage behaviour in the miracle berry *Synsepalum dulcificum* (Schumacher et Thonn.) Daniell. *BMC Plant Biology*. doi:doi.org/10.1186/s12870-019-1714-1
- The Plant List. (2013). *The Plant List*. Obtenido de Versión 1.1.: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Compositae/>
- Tognelli, M., Lasso, C., Bota-Sierra, C., Jiménez-Segura, L. & Cox, N. (2016). Estado de Conservación y Distribución de la Biodiversidad de Agua Dulce en los Andes Tropicales. Gland, Suiza, Cambridge, UK y Arlington, USA: IUCN.
- Torres, C., Cavieres, L., Muñoz, C. & Arroyo, M. (2007). Consecuencias de las variaciones microclimáticas sobre la visita de insectos polinizadores en dos especies de *Chaetanthera* (Asteraceae) en los Andes de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural*, 455-468. Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2007000400007
- Uliana, T., Mattana, E., Pritchard, H. & Skwierinski, R. (2013). Seasonality effects on plant phenology and seed ecology in *Oritrophium peruvianum* (Asteraceae), a threatened tropical alpine specie. *South African Journal of Botany*, 278-285. doi:10.1016/j.sajb.2013.08.006
- Universidad de California. (2019). *Centro de Biotecnología de Semillas*. Obtenido de Almacenamiento. Conservación de semillas. http://sbc.ucdavis.edu/About_US/Seed_Biotechnologies/Seed_Storage_Consevation/

- Valencia-Díaz, S., Flores-Morales, A., Flores-Palacios, A. & Perea-Arango, I. (2007). How does the presence of endosperm affect seed size and germination? *Botanical Sciences*. doi:10.17129/botsci.251
- Vandvik, V., Klanderud, K., Meineri, E., Marec, I. & Topper, J. (2015). Seed banks are biodiversity reservoirs: Species-area relationships above versus below ground. *Researchgate*.
- Vargas, O., Melgarejo, L., Pérez, L., Rodríguez, N. & Insuasty, J. (2014). Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Wang, X., Shen, C., Meng, P., Tan, G. & Lv, L. (2021). Analysis and review of trichomes in plants. *Plant Biology*. doi:10.1186/s12870-021-02840-x
- Werpachowski, J., Varassin, I. & Goldenberg, R. (2004). Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. *Brazilian Journal of Botany*, 607-613. doi: 10.1590/S0100-84042004000300020
- West, N. (2012). Herbivory affects patterns of plant reproductive effort and seed. University of Nebraska - Lincoln.
- Wijayabandara, K., Campbell, S., Vitelli, J., Shabbir, A. & Adkins, S. (2021). Review of the Biology, Distribution, and Management of the Invasive Fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir). *Plants*. doi:10.3390/plants11010107
- William, R. (1991). *Guía para la manipulación de semillas forestales*. Obtenido de Capítulo 7. Almacenamiento de la semilla. <http://www.fao.org/3/AD232S/ad232s00.htm#TOC>
- Wu, G., Du, G. & Shi, Z. (2013). Germination strategies of 20 alpine species with varying seed mass and light availability. *Australian Journal of Botany*. doi:10.1071/BT12119

Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. & Yamaguchi, S.

(2004). Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds. *The Plant Cell*, 367-378. doi:10.1105%2Ftpc.018143

Zhang, C., Ma, A., Zhou, H. & Zhao, X. (2019). Long-term warming results in species-specific shifts in seed mass in alpine communities. *PeerJ*. doi:10.7717/peerj.7416

Zhang, T. & Elomaa, P. (2021). Don't be fooled: false flowers in Asteraceae. *Current Opinion in Plant Biology*.