



**Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Grossulariaceae en
Bosques Andinos del Ecuador.**

Ribadeneira Freire, Paola Lissete

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Proaño Tuma, Karina Isabel, Ph. D.

31 de agosto del 2022



Tesis Ribadeneira copleaks.docx

Scanned on: 14:13 August 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	61
Words with Minor Changes	3
Paraphrased Words	113
Omitted Words	0



KARINA
ISABEL
PROANO TUMA



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador”** fue realizado por la señorita **Paola Lissete Ribadeneira Freire**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE , además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de agosto del 2022



Escanea el código QR para verificar:
**KARINA
ISABEL**

.....
Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.
C.I.: 1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Ribadeneira Freire Paola Lissete**, con cédula de ciudadanía n° 1804209300, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 29 de agosto de 2022

Ribadeneira Freire Paola Lissete

C.C.: 1804209300



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Ribadeneira Freire Paola Lissete**, con cédula de ciudadanía n° 1804209300, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de agosto de 2022

Ribadeneira Freire Paola Lissete

C.C.: 1804209300

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado a mi familia y amigos que han estado junto a mí en todo momento sin desampararme, en especial:

A mis padres, Carlos y Guadalupe quienes me han apoyado y alentado con mucho amor en cada paso que he dado para lograr culminar este trabajo.

A mi hermano, Santiago quien me ha brindado risas y palabras de aliento llenas de cariño incondicional.

A mis tíos, tías y abuelos, quienes confían en mí y con un abrazo me han llenado de esperanza y motivación.

A todos quienes anhelamos emplear la ciencia para construir un mejor mañana.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios porque mi fe hacia él me ha permitido avanzar y a mi familia por su amor y apoyo desmedido en todo momento.

En especial, quiero agradecer a mi directora Karina Isabel Proaño, Ph. D. por el tiempo y la atención que me ha brindado para el desarrollo de este trabajo como una guía y una inspiración tanto a nivel profesional como personal, al ser una gran científica y excelente persona.

Infinitas gracias a Claudia Segovia, Ph. D. y Mónica Jadán, Ph. D., cotutoras de este trabajo de integración curricular quienes me han brindado sus conocimientos, apoyo e inspiración.

Gracias a la Ing. Gabriela Pazmiño, a la Ing. Gabriela Miño y a la M. Sc. Andrea Ortega por su guía técnica en el laboratorio.

A mis colegas y amigos, Andrea, Mateo, Carlos, Sebastián y Marcelo, gracias por su apoyo y por compartir experiencias en cada paso que nos guía a hacer ciencia.

Gracias a los proyectos BIO-GEEC y HANS-BANK por el apoyo financiero, a la Universidad de las Fuerzas Armadas, a la Carrera de Biotecnología y al INABIO por permitirme la entrada a sus instalaciones para que este trabajo pudiera llevarse a cabo de la mejor manera.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Informe de autenticidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Planteamiento del problema	15
Justificación del problema.....	16
Objetivos.....	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
Hipótesis.....	18

Capítulo II: Marco teórico.....	19
Páramos andinos	19
Distribución geográfica en el Ecuador	19
Condiciones ambientales del páramo ecuatoriano.....	20
Amenazas y riesgos en los páramos	21
Importancia de la vegetación en el ecosistema de páramo	22
Grossulariaceae: Descripción de la familia	23
Características generales.....	23
Taxonomía y Distribución.....	24
Descriptores morfológicos	26
Viabilidad de semillas.....	28
Pruebas colorimétricas	28
Pruebas de rayos X.....	30
Germinación de semillas	30
Estrategias de conservación.....	32
Herbarios	33
Germinación in vitro.....	33
Banco de germoplasma	33
Capítulo III: Metodología.....	35
Fase de campo.....	35
Fase de laboratorio	35

	10
Análisis morfológico.....	35
Análisis de germinación	36
Diseño experimental	37
Análisis estadístico	37
Capítulo IV: Resultados	40
Fase de campo.....	40
Fase de laboratorio	44
Análisis morfológico de semillas	44
Análisis de germinación de las semillas	46
Capítulo V: Discusión	57
Capítulo VI: Conclusiones	66
Capítulo VII: Recomendaciones	68
Capítulo VIII: Bibliografía	69
Apéndices	81

Índice de tablas

Tabla 1 Diseño experimental para la desinfección de las semillas	38
Tabla 2 Diseño experimental para la viabilidad de las semillas	39
Tabla 3 Diseño experimental para la germinación de las semillas	39
Tabla 4 Parámetros morfológicos de las semillas <i>Ribes andicola</i> y <i>Ribes ecuadoreense</i>	45
Tabla 5 Prueba de Shapiro-Wilks para el análisis de desinfección de <i>Ribes</i> sp.....	47
Tabla 6 Prueba de Kruskal Wallis para el análisis de desinfección de <i>Ribes</i> sp.....	47
Tabla 7 Prueba de Shapiro-Wilks para el análisis de viabilidad de <i>Ribes</i> sp.	51
Tabla 8 Análisis de la varianza de <i>Ribes</i> sp.	52
Tabla 9 Cuadro de Análisis de la varianza de <i>Ribes</i> sp.....	52
Tabla 10 Prueba de Duncan para el tratamiento de viabilidad de <i>Ribes</i> sp.....	53

Índice de figuras

Figura 1 Ejemplar de <i>Ribes andicola</i> en campo	25
Figura 2 Ejemplar de <i>Ribes ecuadorensis</i> en campo	26
Figura 3 Descripción general y morfológica de la especie <i>Ribes andicola</i>	40
Figura 4 Descripción general y morfológica de la especie <i>Ribes ecuadorensis</i>	41
Figura 5 Estado de maduración de <i>Ribes</i> sp.	43
Figura 6 Fruto de <i>Ribes</i> sp. con presencia de tricomas	44
Figura 7 Estado de maduración de las semillas de <i>Ribes</i> sp.	45
Figura 8 Porcentaje de contaminación con diferentes tratamientos de desinfección en <i>Ribes</i> sp.	46
Figura 9 Efectos del tratamiento de desinfección en <i>Ribes</i> sp.	48
Figura 10 Efecto escarificador del hipoclorito de sodio 1% en semillas de <i>Ribes</i> sp.	49
Figura 11 Patrones de tinción observados en la prueba de tetrazolio en semillas de <i>Ribes</i> sp.	50
Figura 12 Patrones de tinción observados en la prueba de índigo carmín en semillas de <i>Ribes</i> sp.....	50
Figura 13 Porcentaje de viabilidad de <i>Ribes</i> sp. mediante pruebas de tetrazolio e índigo carmín	51
Figura 14 Desarrollo del embrión de <i>Ribes</i> sp.	53
Figura 15 Desarrollo de radícula en semillas de <i>Ribes</i> sp.....	54
Figura 16 Número de semillas germinadas en relación a la temperatura y giberelinas en la de <i>Ribes</i> sp.	55
Figura 17 Plántulas de <i>Ribes andicola</i>	56

Resumen

Las actividades antropogénicas practicadas de manera no sustentable amenazan el equilibrio del ecosistema de bosques y páramos de la región Andina. Estas zonas naturales proveen servicios ecosistémicos como la conservación de agua dulce y la regulación del clima. Por ello, es necesario preservar la diversidad de especies mediante estrategias de conservación como los bancos de germoplasma de semillas. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar la morfología y germinar semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador. Para ello, se recolectaron muestras de semillas de *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadorensis* Jancz. Se identificó la morfología de las especies con énfasis en sus frutos y semillas. Luego se comparó el porcentaje de viabilidad mediante pruebas colorimétricas con tetrazolio al 1% e índigo carmín al 0,15% por 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluó el efecto de la temperatura y las giberelinas en la germinación de las semillas de *Ribes* sp. Se encontró que la morfología de *Ribes andicola* y *Ribes ecuadorensis* difiere en cuanto al tamaño, posiblemente por estrategias de dispersión. Por otro lado, la viabilidad de las semillas de es alta, por lo que es posible su conservación en un banco de semillas. Adicionalmente, el 17% de semillas de *R. andicola* germinaron en un régimen de temperatura combinada 20/10 °C y ausencia de giberelinas, hasta formar plántulas.

Palabras clave: *Ribes andicola* Jancz., *Ribes ecuadorensis* Jancz., tetrazolio, índigo carmín, giberelinas.

Abstract

Anthropogenic activities practiced in an unsustainable manner threaten the balance of the ecosystem of forests and paramos of the Andean region. These natural areas provide ecosystem services such as freshwater conservation and climate regulation. Therefore, it is necessary to preserve the diversity of species through conservation strategies such as seed germplasm banks. The objective of this study is to characterize the morphology and germinate seeds of the Grossulariaceae family in Andean Forests of Ecuador. For this, samples of seeds of *Ribes andicola* Jancz. and *Ribes ecuadorensis* Jancz. were collected. The morphology of the species was identified with emphasis on their fruits and seeds. Viability percentage was then compared by colorimetric tests with 1% tetrazolium and 0.15% indigo carmine for 24 hours at room temperature. Finally, the effect of temperature and gibberellins on seed germination of *Ribes* sp. was evaluated. It was found that the morphology of *Ribes andicola* and *Ribes ecuadorensis* differ in terms of size, possibly due to dispersal strategies. On the other hand, the viability of the seeds is high, so their conservation in a seed bank is possible. Additionally, 17% of *R. andicola* seeds germinated under a combined temperature regime of 20/10 °C and absence of gibberellins, until they formed seedlings.

Key words: *Ribes andicola* Jancz., *Ribes ecuadorensis* Jancz., tetrazolium, indigo carmine, gibberellins.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El Ecuador es un país privilegiado en cuanto a recursos naturales, debido a su ubicación geográfica en la zona ecuatorial, los fenómenos naturales y geográficos que allí coinciden, como la corriente del Niño, la corriente de Humboldt y la Cordillera de los Andes. Estas condiciones han dado lugar al punto caliente (*hotspot*) de los Andes Tropicales que se extiende desde Venezuela hasta Chile, pasando por Ecuador. Esta región alberga gran diversidad de especies endémicas en un pequeño territorio en comparación con el resto del mundo (Peyre *et al.*, 2018).

Los Andes Tropicales están conformados por bosques andinos y páramos, los cuales son ecosistemas montañosos cuya complejidad topográfica es notoria por su ubicación en la Cordillera de los Andes. Además, características ambientales como la altitud entre el rango de 3000 y 5000 m.s.n.m. y la variedad de temperaturas debido a la radiación intensa durante el día y su descenso abrupto por la noche, han favorecido el desarrollo de especies endémicas con alto grado de adaptación a condiciones extremas. En el Ecuador, este ecosistema cubre cerca de 12818,5 km² del territorio nacional actuando como reservorios de agua, reguladores de clima, sitios de alta diversidad y almacenamiento de carbono, por lo que es de vital importancia conservarlos (García *et al.*, 2019; Brück *et al.*, 2022).

No obstante, las principales actividades antropogénicas como agricultura intensiva, la ganadería y minería, así como también la tala comercial y la construcción de carreteras, generan situaciones catastróficas para el frágil equilibrio de los ecosistemas de montaña, ya que ocasionan deforestación y fragmentación de bosques (Pennington *et al.*, 2010).

La deforestación presenta efectos negativos y atenta peligrosamente contra las especies nativas de los ecosistemas andinos, dado que tanto plantas como animales se

encuentran en estrecha relación de dependencia de árboles que brindan hogar a osos, tapires, conejos y aves, e incluso plantas de tipo arbustivo que crecen asociadas para aprovechar la sombra y protección del viento que pueden ofrecer los árboles de mayor altura.

La fragmentación de bosques en cambio, implica la creación de parches, es decir, áreas aisladas y de menor tamaño, con distintas condiciones ambientales que afectan la dinámica entre flora y fauna. Esta desconexión entre parches supone que las especies pierden acceso a los recursos que tenían antes, dado que no pueden cruzar las barreras impuestas por el hombre (Tapia-Armijos *et al.*, 2015)

En consecuencia, estos problemas suponen un riesgo para la población, dado que los bosques andinos proveen de agua dulce a la ciudadanía. Por lo que este trabajo pretende recolectar información que permita preservar la diversidad del páramo y así poder restaurar la vegetación en un futuro.

Justificación del problema

El ecosistema de páramo está conformado por vegetación tipo arbustiva o matorral con capacidad de adaptación a climas extremos que se desarrolla en zonas montañosas a gran altitud. Por lo que, su importancia radica en sus recursos bióticos y abióticos. En el ecosistema de alta montaña, el suelo es rico en carbono orgánico y tiene potencial de retención de CO₂ atmosférico y agua. Por otro lado, la vegetación de humedales y pajonales también retiene agua y actúa en la dinámica del ciclo del agua proveniente de precipitaciones, niebla y nubes. Por lo tanto, el páramo se considera un ecosistema centinela de alta relevancia para actuar frente al cambio climático y que permite la conservación de agua (Dangles *et al.*, 2017; Ayala Izurieta *et al.*, 2021)

Actualmente, los páramos se encuentran amenazados por el avance de las actividades productivas del hombre que ocupan cada vez más territorios y acaban con la vegetación nativa. A pesar de tener tal trascendencia para el futuro de la humanidad, este ecosistema carece de registros que documenten su evolución detallada. Por lo que, los bancos de semillas representan una estrategia de solución para salvaguardar la diversidad, dado que suponen un refugio de recursos genéticos valiosos para la restauración de poblaciones y la incorporación de genes de adaptación a condiciones climáticas desfavorables. De esta manera, las especies de la familia Grossulariaceae, al ser arbustos que crecen en estrecha relación con otras especies ubicadas en líneas de bosque que delimitan zonas de alta diversidad, su rol en restauración es importante y está asociado a la dinámica de crecimiento de múltiples formas de vida (Young & León, 2007).

Por todo lo antes mencionado, este trabajo pretende recolectar datos de morfología de plantas y semillas de la familia Grossulariaceae, así como de sus condiciones de germinación, para preservar su contenido genético en un banco de semillas como el del Proyecto HANS-BANK en colaboración entre la Corporación Alemana y la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, para así poder emplearlo en planes de restauración.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la morfología y germinar semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Objetivos específicos

Recolectar muestras de semillas de la familia Grossulariaceae.

Identificar la morfología de las especies de la familia Grossulariaceae con énfasis en sus frutos y semillas.

Analizar la viabilidad de las semillas de la familia Grossulariaceae mediante la pigmentación del embrión con pruebas colorimétricas.

Determinar los parámetros de germinación de las semillas de la familia Grossulariaceae.

Hipótesis

Los tratamientos aplicados permiten la germinación de semillas de la familia Grossulariaceae.

Capítulo II: Marco teórico

Páramos andinos

Los páramos son ecosistemas formados sobre terrenos montañosos de la Cordillera de los Andes, en los países de Venezuela, Colombia y Ecuador. Esto convierte al páramo en una provincia biogeográfica, dado que los patrones geográficos y ambientales que presenta influyen en las relaciones evolutivas de los seres vivos que allí habitan, lo que genera un alto grado de endemismo. Los bosques andinos son considerados uno de los puntos calientes de biodiversidad del planeta que alberga cerca del 60% de las especies (Peyre *et al.*, 2018).

El páramo en general, comprende matorrales, pastizales y humedales, los cuales se subdividen en: (i) *Subpáramo* que comprende la transición entre laderas de bosques y pastos de páramo entre 3200 – 3500 m.s.n.m., con especies de los géneros *Befaria*, *Brachyotum*, *Diplostephium*, *Gaultheria*, *Gynoxys*, *Hypericum*, *Maclenia*, *Miconia*, *Pentacalia*, *Hesperomeles* y *Vaccinium*; (ii) *Páramo de pastos* a 3500 – 4100 m.s.n.m., con pequeña vegetación adaptada a la sequía, compuesta por arbustos (*Hypericum*, *Diplostephium*, *Pentacalia*, *Pernettya* y *Valeriana*), plantas en roseta acaulescentes (*Acaena*) y en cojín (*Werneria*) y (iii) *Superpáramo* con especies de los géneros *Draba*, *Efedra*, *Lupinus* y *Senecio* que crecen dispersas sobre suelo arenoso a más de 4100 m.s.n.m., sobreviviendo a nevadas debido a su cercanía a la línea de nieve (Morrone, 2018).

Distribución geográfica en el Ecuador

En el Ecuador, los páramos se dividen en distritos por su ubicación geográfica en el norte, centro y sur de la cordillera de los Andes, estando delimitado al este por la costa del Pacífico y al oeste por la región amazónica. El páramo Norte abarca las áreas más significativas en cuanto a endemismo: Galeras – Chiles, el norte de la Cordillera Occidental, la Cordillera Central Occidental y el norte de la Cordillera Real Oriental. Al norte, su límite es el

distrito de Páramos Quindío. Mientras que al sur se encuentra el distrito Centro formado por los Páramos Macizo del Cajas y Azuay – Morona Santiago – Zamora. El páramo Centro está delimitado por los ríos Cañar y Paute al norte y los ríos Jubones y Zamora al sur. El páramo Sur corresponde al sur de la Cordillera Real y la Cordillera Occidental. Contiene los Páramos Lagunillas – Piura – Podocarpus y Páramos del Sur de la Cordillera Occidental (Jiménez-Rivillas *et al.*, 2018)

Condiciones ambientales del páramo ecuatoriano

El páramo andino está ubicado en la zona ecuatorial y se caracteriza por su altura entre 3000 y 4800 m.s.n.m. Este amplio rango de altura es posible debido a la irregularidad del paisaje, los picos elevados, las planicies extensas, cuencas y valles. La altura implica un estrés ambiental para las especies, debido a la reducción de oxígeno a mayor altitud, lo que incrementa la especiación (Yasin & Andreasen, 2016; Abbas *et al.*, 2022)

Por otro lado, los suelos de los páramos son ricos en materia orgánica, los cuales tienen una capa de hasta un metro de profundidad. Estas regiones hiperdiversas se presentan en rocas máficas y ultramáficas con baja disponibilidad de fósforo y altas cantidades de magnesio, lo que incrementa la especialización de plantas con altos niveles de lignina y fenoles en hojas (Rahbek *et al.*, 2019).

La intensa radiación solar seguida de noches muy frías y húmedas junto con la heterogeneidad de la altitud genera microclimas de montaña. La temperatura media anual del páramo oscila entre 4°C y 10°C. El Subpáramo se mantiene entre 8 y 10°C. Sin embargo, en el Superpáramo la temperatura desciende a 0°C por su proximidad a la línea de nieve. Se estima que cada 100 m de altura la temperatura media decae 0,6 °C. En los meses de temperatura más extrema, ocurren ciclos de congelación y descongelación que presionan la selección de especies. Los páramos son zonas generalmente húmedas, excepto por uno o dos meses secos

en los que la frecuencia de precipitaciones disminuye (Vargas-Ríos, 2022). Estas variaciones generan un incremento en la especiación y el endemismo de las plantas en estos ecosistemas.

Las condiciones ambientales como altitud, clima, suelo y precipitaciones propician la especiación por mecanismos ecológicos como selección, deriva génica, hibridación, poliploidización, interacciones con polinizadores y aislamiento geográfico. Las montañas tienen un área relativamente pequeña que representa el 25% de la superficie terrestre mundial, excluyendo la Antártida, pero poseen una de las zonas con mayor diversidad en el planeta (Perrigo *et al.*, 2020).

Amenazas y riesgos en los páramos

Las actividades antropogénicas como agricultura, pesca, ganadería y minería, se han practicado de manera no sustentable por siglos en la historia de la humanidad dejando una huella ecológica. En los últimos años, estas consecuencias se han incrementado debido al avance de las civilizaciones y la globalización, las cuales orillan a los granjeros a explotar cada vez más terreno a mayor altura, expandiendo la frontera agrícola. A pesar de que las comunidades realizan estas actividades con la finalidad de obtener recursos de valor que les brinden sustento económico, deterioran poco a poco la calidad del suelo (Calbi *et al.*, 2021).

La persistencia de estos actos, sumado a la tala indiscriminada e incendios forestales impacta fuertemente los ecosistemas nativos, lo que genera deforestación y fragmentación de bosques, erosión de suelos y contaminación. En el caso de Ecuador, los bosques caducifolios y semicaducifolios que cubren un sexto del territorio nacional, se han visto amenazados por la deforestación en una tasa alarmante de 30 km² por año entre 2008 y 2014 (Tapia-Armijos *et al.*, 2015). La perturbación constante en los ciclos de agua y energía, provoca deterioro de hábitats, aislamiento de especies en parcelas carentes de los recursos necesarios y limitación en la interacción entre poblaciones. Estos daños desembocan en extinción de especies nativas y

pérdida de servicios ecológicos. De esta manera, los bosques degradados son proclives a sufrir incendios forestales con más frecuencia en la época seca, debido a la elevación de su temperatura ambiental (Longo *et al.*, 2020).

Importancia de la vegetación en el ecosistema de páramo

Los páramos son ecosistemas con múltiples cualidades para responder a la crisis climática, ya que actúan como: reservorios de agua dulce, sumideros de carbono y refugio de diversidad de especies con genes de adaptación a condiciones extremas. Es por esto que su conservación significa asegurar la calidad de vida de millones de personas asentadas en la serranía. La crisis por agua dulce es inminente, debido a la contaminación a nivel mundial. Uno de los servicios ecosistémicos que brinda el páramo es el almacenamiento y la liberación de agua. El almacenamiento hídrico de montaña tiene un componente dinámico influenciado por la intensidad de precipitaciones y un componente pasivo que incluye las propiedades de suelos con alta capacidad de retención de agua, como son los histosoles. Las cuencas de las montañas son fuentes de agua para ciudades, sin las cuales el abastecimiento sería imposible. Por lo tanto, los páramos son relevantes para la gestión de recursos hídricos (Lazo *et al.*, 2019).

A nivel mundial, aproximadamente el 70% del carbono es almacenado por bosques tropicales y subtropicales, tanto en suelos como en la vegetación. El carbono es un gas de efecto invernadero, proveniente de procesos tanto naturales como artificiales que aceleran la crisis climática. La importancia de la captura de carbono radica en que evita su presencia en la atmósfera, al metabolizar el dióxido de carbono en moléculas más estables a largo plazo. Por ende, para lograr combatir el cambio climático se requiere reducir las fuentes de contaminación ocasionada por el uso de combustibles fósiles y conservar las áreas forestales que actúan como sumideros de carbono (Duque *et al.*, 2021; Longo *et al.*, 2020).

Los ecosistemas de montaña que surgen en la Cordillera de los Andes son el hogar de cerca del 87% de anfibios, aves y mamíferos del mundo, con una alta proporción de especies endémicas. Por ello, los páramos son cruciales para preservar la diversidad faunística y florística del planeta a largo plazo. La topografía propia de las altas montañas las convierte en zonas poco accesibles para el hombre con una protección natural debido a la complejidad del terreno por el movimiento de placas tectónicas, por compresión o estiramiento de la litósfera. La tectónica de placas genera sitios con geografía escarpada como picos altos, laderas, planicies y cuencas. Estas condiciones geológicas y climáticas impulsan la diversificación de las especies a través de selección natural y deriva génica (Rahbek, Borregaard, Colwell, *et al.*, 2019).

La adaptación a condiciones específicas del páramo origina cascadas de especiación en las cuales la generación de una nueva especie influye en la selección de otra. El gradiente climático, la elevada concentración de magnesio en el suelo y la intensa radiación UV que promueve las mutaciones de ADN son factores que tienen un fuerte impacto en el origen, persistencia y extinción de especies. Por lo tanto, los páramos son potenciales refugios de especies y recursos ante la explotación y la urbanización, en la generación de áreas endémicas con una alta biodiversidad (Perrigo *et al.*, 2020).

Grossulariaceae: Descripción de la familia

Características generales

La familia Grossulariaceae está compuesta por arbustos dioicos rastreros o erectos que florecen durante casi todo el año. Su crecimiento a manera de arbusto los convierte en elementos cruciales para la formación del subpáramo y los márgenes superiores del bosque nuboso. Esta familia se caracteriza por presentar frutos en forma de bayas que nacen de inflorescencias pendulares o erectas con flores en forma de cáliz. En general, sus hojas y ramas se encuentran en estado caduco y aspecto coriáceo poco lobulado. Las especies de

América del Sur presentan hojas semiperennifolias. La hoja de todos los grupos infragenéricos de *Ribes* sp. tiene láminas de 3 a 5 lóbulos y corresponde a una plesiomorfía (Freire-Fierro, 2002; Weigend *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Taxonomía y Distribución

La familia Grossulariaceae está conformada por plantas eudicotiledóneas, agrupadas en la Clase *Magnoliopsida*. Esta Clase incluye al Orden *Saxifragales*, un clado monofilético que relaciona estrechamente a las familias Saxifragaceae Grossulariaceae, Iteaceae y Pterostemonaceae en una de sus ramas. El linaje de la familia Grossulariaceae consta de 150 especies que constituyen el género *Ribes* L. y siete subgéneros: *Berisia* (Spach.) Jancz., *Parrilla* Jancz., *Ribes* L., *Coreosoma* (Spach.) Jancz., *Grossularoides* Jancz., *Grossularia* (Mill.) Pers. y *Oligocarpa* Vals. (Weigend *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2013)

La mayoría de especies del género *Ribes* alrededor del mundo se encuentran en zonas templadas y subtropicales entre 2000 y 4000 m.s.n.m. en Norteamérica, Europa, el Este de Asia y el Norte de África. En América del Norte y Europa predominan variedades de alto valor comercial como la grosella negra (*Ribes nigrum* L.) y la grosella espinosa (*Ribes uva-crispa* L.), cuyo parentesco aún se debate para mantenerlas en un género o dividir las en dos. En los Andes Tropicales de América del Sur, se ha encontrado pequeña porción con alto grado de endemismo, compuesta por 43 especies del subgénero *Parrilla* sect. *Andina*. En el territorio ecuatoriano, se han registrado ocho especies, cuatro de ellas son especies endémicas y en peligro de extinción: *R. austroecuadorensis*, *R. lehmannii*, *R. luteynii* y *R. nanophyllum* (Freire-Fierro, 2002; Wang *et al.*, 2021).

***Ribes andicola* Jancz.** *R. andicola* es una especie ampliamente distribuida desde Venezuela hasta el Norte de Perú, a excepción del extremo Sur de Ecuador. Esta especie se caracteriza por tener un crecimiento arbustivo cuyo tallo está cubierto por tricomas. Sus hojas

son simples o alternas, ovadas, de ápice acuminado, de base ligeramente cordada, margen biserrado, envés lanoso y un haz brillante por la presencia de cutina. El pecíolo es alado con inserción decurrente en el tallo y con presencia de estípulas. Las inflorescencias forman racimos terminales y pendulares cuyas flores tienen sépalos rojizos y pétalos con tonalidades amarillas a anaranjado pálido. Sus frutos son bayas de color anaranjado, los cuales se tornan rojo cuando maduran, como se observa en la figura 1 (Weigend *et al.*, 2005; Moreno-Gaona *et al.*, 2018). *Ribes andicola* es una especie considerada indicador de la cubierta forestal, ya que persiste después que los bosques han sido talados (Weigend, 2004; Weigend *et al.*, 2005).

Figura 1

Ejemplar de *Ribes andicola* en campo.



***Ribes ecuadorensis* Jancz.** *R. ecuadorensis* es una especie que ha sido reportada dentro de los taxones endémicos del Distrito Norte del Páramo en Ecuador. Crece como arbusto erecto a escandente de 4 a 6 m, cuyos tallos son pendulares a decumbentes (tallos horizontales a nivel del suelo). Las hojas se caracterizan por ser simples, alternas, espiraladas, cuya lámina foliar puede ser ovada o cordada. Tiene hojas trilobuladas de base cordada y

margen entre serrado a triserrado. Tiene pecíolos (1,5 a 2,5 cm) alados en la base. Las inflorescencias forman racimos terminales pendulares de 9-16 cm que contienen entre 30 y 70 flores. Las flores son pentámeras, actinomorfas y cupuliformes, las cuales forman un cáliz de sépalos de 3 a 5 mm. El cáliz es rojizo, lanceolado, el cual posee una corola blanca de pétalos obovados de 3 a 4 mm. Los frutos son bayas de color amarillo verdoso con remanentes del cáliz en el ápice como se observa en la figura 2 (Freire-Fierro, 2002; Jiménez-Rivillas *et al.*, 2018)

Figura 2

Ejemplar de Ribes ecuadorensis en campo.



Descriptores morfológicos

Los descriptores morfológicos son características cualitativas o cuantitativas que permiten diferenciar entre especímenes en base a la medición o evaluación de ciertos

parámetros asociados a la forma. Estos descriptores deben cumplir algunos criterios de uniformidad y estabilidad (Montoya-Aramburu *et al.*, 2008).

Existen descriptores morfológicos vegetativos y florales. Los descriptores vegetativos están asociados al crecimiento del tallo y la hoja, los cuales reflejan la adaptabilidad de la planta a la luz y a la sombra. Entre estos constan las dimensiones de la hoja, el área foliar, el grosor, la forma, la ubicación en el tallo y el contenido de clorofila (Villegas-Retana & Chavarría-Soto, 2016). En cambio, los descriptores florales incluyen el dimensionamiento, peso húmedo, peso seco, coloración y forma tanto de la flor como del fruto y la semilla. Estos descriptores junto con los parámetros de contenido mineral de semillas, tiempo y porcentaje de germinación, son útiles en programas de mejoramiento genético (Blalogue *et al.*, 2020). En este estudio se han seleccionado los parámetros morfológicos que influyen en la viabilidad de semillas como es el número por fruto, tamaño, peso y porcentaje de humedad, debido a la importancia de estos en el almacenamiento de las muestras.

Al describir específicamente en el Ecuador a la familia Grossulariaceae, se observan diferencias en la forma de la hoja, el tipo de glándula, la posición de la inflorescencia, la forma de la flor y las características del fruto, lo que permite su identificación. Las especies *R. andicola* y *R. ecuadorensis* comparten características como: flores en forma de copa, hipantio mayormente de 3 mm de largo, superficie interna de los lóbulos del cáliz rojo claro, rojo parduzco o verdoso. Sin embargo, *Ribes ecuadorensis*, a diferencia de *R. andicola*, tiene tallos y ovario con glándulas sésiles a subsésiles, amarillentas y hojas con base cordada. Además de poseer inflorescencias con más de 30 flores. *Ribes andicola*, en cambio, tiene hojas con base truncada a obtusa o cuneada. La inflorescencia presenta brácteas de 5 mm de largo, sépalos marrón rojizos y fruto resupinado (Freire-Fierro, 2002). Estas características sirven para poder identificar las especies en el momento de la recolección.

Viabilidad de semillas

La viabilidad de semillas indica la capacidad de germinación en condiciones ambientales favorables. Existen otros términos como el vigor, el cual es la aptitud para formar plántulas sanas y la longevidad, la cual corresponde al periodo que dura la viabilidad. La viabilidad depende de factores como temperatura de almacenamiento, contenido de humedad, oxígeno y genotipo. El bajo contenido de humedad y temperatura son cruciales para conservar la longevidad de semillas ortodoxas como las de la familia Grossulariaceae. Otro factor importante es la maduración de las semillas, ya que esta es la fase de desarrollo más sensible para la viabilidad (Fenu *et al.*, 2012; Stanschewski *et al.*, 2021).

En conservación, las pruebas de viabilidad de semillas son esenciales para determinar el éxito de la conservación *ex situ* en bancos de semillas, pero lamentablemente los protocolos en semillas andinas poseen poca información estandarizada. Por lo cual, es necesario seleccionar pruebas de viabilidad confiables que permitan identificar si la semilla de una muestra está viva y si es metabólicamente activa para la germinación. Este proceso se lleva a cabo con la finalidad de estimar la proporción de semillas vivas en una población, lo cual se expresa como el porcentaje de viabilidad (N. Pradhan *et al.*, 2022).

Las pruebas de viabilidad pueden ser: (a) ensayos colorimétricos, (b) radiografía con rayos X y (c) ensayos de germinación.

Pruebas colorimétricas

Las pruebas colorimétricas son pruebas químicas que tiñen las semillas viables gracias a los compuestos químicos y enzimas que poseen para llevar a cabo la germinación. Estos ensayos pueden ser enzimáticos si la solución de tinción cambia de color en presencia de enzimas asociadas al desarrollo de la radícula. En este caso el tetrazolio sirve para detectar

deshidrogenasas y el diacetato de fluoresceína sirve para detectar esterasas presentes en la semilla.

Las pruebas no enzimáticas en cambio emplean el principio de absorción diferencial del colorante. Este es el caso de las pruebas de índigo carmín y azul de Evans. Estos ensayos químicos requieren protocolos optimizados previamente para obtener resultados uniformes que faciliten la interpretación de los resultados (Marrero *et al.*, 2007; Pradhan *et al.*, 2022).

Prueba de tetrazolio. La prueba de tetrazolio (TTC) es una prueba enzimática que detecta deshidrogenasas presentes en las semillas mediante una reacción de oxido reducción. En un vial de vidrio, los embriones hidratados se sumergen en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5-trifeneil tetrazolio (TTC), durante 4 días a 25 °C y oscuridad. El TTC en su forma oxidada es incoloro. Al reaccionar, se reduce formando 2,3,5-trifenil formazán cuya coloración es roja o rosa. Por ello, se consideran viables los embriones tinturados de rojo. Esta es una de las pruebas más utilizadas dado que es rápida. No obstante, puede presentar resultados inconsistentes y difíciles de interpretar para quien carezca de experiencia (França-Neto & Krzyzanowski, 2019).

Prueba de diacetato de fluoresceína. En la prueba del diacetato de fluoresceína (FDA), las células viables convierten el diacetato de fluoresceína en fluoresceína por hidrólisis mediada por las esterasas intracelulares. La acumulación en el citoplasma de fluoresceína es visible a manera de fluorescencia verde brillante al aplicar luz UV. Por lo que, se consideran vivos los tejidos totalmente teñidos. Esta técnica es aplicable a polen y a semillas microscópicas (Impe *et al.*, 2020).

Prueba de índigo carmín. La prueba de índigo carmín (IC) se basa en la tinción diferencial entre tejidos vivos que permanecen incoloros y tejidos muertos que se colorean de azul. La solución de índigo carmín al 0,15% se obtiene disolviendo 15 mg del colorante

($C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$) en 100 ml de agua destilada. Para esta prueba se extrae el embrión al sumergir las semillas durante 18 horas en agua destilada. Luego, los embriones permanecen por 3 horas en la solución de índigo carmín a temperatura ambiente. Finalmente, se determina el porcentaje de viabilidad considerando inviables a las semillas con tinción completa o parcial, en la radícula (Marrero *et al.*, 2007)

Prueba del azul de Evans. La prueba del azul de Evans (EB) es una prueba no enzimática basada en la integridad de la membrana, la cual es permeable al tinte en tejidos muertos. Las células viables carecen de coloración, puesto que las bombas de la membrana celular están activas. Para esta tinción los embriones se sumergen en la solución de azul de Evans al 0,1% durante 2 minutos, seguido de dos enjuagues con agua destilada por 10 minutos. Es una prueba rápida y precisa, que requiere de experiencia. Debido a que esta prueba es poco empleada, carece de estudios (Tian *et al.*, 2019; Nowicka *et al.*, 2021)

Pruebas de rayos X

Las pruebas de rayos X emplean radiografías para observar la presencia y morfología del embrión y el endospermo. La imagen de una semilla viva muestra homogeneidad en el embrión, sin áreas oscuras que se asocian al daño tisular. Una imagen clara indica ausencia de invasión por microorganismos o invertebrados y refleja bajo contenido de humedad, lo que es favorable para la conservación *ex situ*. Este es un ensayo rápido no destructivo, que requiere equipos costosos. Su uso en semillas diminutas es restringido debido al tamaño y manipulación requerida (Al-Turki *et al.*, 2019).

Germinación de semillas

Las pruebas de germinación indican la capacidad de la semilla de formar plántulas en condiciones adecuadas. Este es el método más efectivo, dado que la capacidad germinativa

refleja directamente la ausencia de latencia y la viabilidad de una semilla. Sin embargo, este método requiere la evaluación de condiciones de germinación individuales como requisito previo. Además, el tiempo para completar el ensayo puede resultar muy extenso, impidiendo la obtención de resultados (Breman *et al.*, 2021).

La germinación es el inicio de la formación de plántulas viables, la cual está determinada por las condiciones ambientales favorables para cada semilla. Este proceso inicia con el rompimiento de la latencia o dormancia. La latencia es un proceso que protege a la semilla de condiciones adversas, la cual puede ser física o fisiológica. La dormancia física ocurre en el 25% de las plantas con flores, debido a la impermeabilidad de la semilla al agua generada por desecación. Esta dormancia se puede interrumpir mediante imbibición en agua y ruptura de la testa. En general, cuanto más dura sea la cubierta y más grande sea la semilla, requiere mayor tiempo de imbibición en agua para germinar. Mientras que, la latencia fisiológica está asociada a las variaciones de temperatura que acompañan al cambio de temporada. Sin embargo, se puede interrumpir por incendios o la ingesta por parte de animales (Jaganathan & Biddick, 2021; Jakovac *et al.*, 2021; Klupczyńska & Pawłowski, 2021).

Parámetros de germinación. Para una germinación exitosa se deben cumplir requerimientos nutricionales y parámetros ambientales específicos de cada especie. En el laboratorio, la germinación se puede llevar a cabo en papel filtro húmedo o en medio Murashige y Skoog (MS), que contiene micro y macro nutrientes esenciales. Un componente decisivo es la suplementación de los medios con fitohormonas, las cuales promueven el elongamiento celular como es el caso de las giberelinas. Otro factor importante es el uso de cámaras de crecimiento para controlar factores ambientales como la humedad, el fotoperiodo, la luz, la temperatura y el CO₂. Es necesario evitar el estrés por bajas temperaturas con calefactores y la falta de luz con lámparas con temporizadores (Freschet *et al.*, 2021)

En el páramo, las plantas se encuentran expuestas tanto a altas como bajas temperaturas, debido al contraste marcado entre el día y la noche. Por lo tanto, la germinación depende y es directamente proporcional a la temperatura. Esto se debe a que este factor influye en la actividad enzimática, la cual es indispensable para la acción de enzimas hidrolasas como la α -amilasa, β -1,3-glucanasa y lipasas. Estas enzimas actúan en la transformación de las reservas del endospermo en compuestos disponibles para la generación de energía y alimento a través del metabolismo (Belmehti *et al.*, 2018; Adetunji *et al.*, 2020)

Estrategias de conservación

La degradación de ecosistemas causada por deforestación, monocultivos intensivos, especies invasoras y expansión urbana son las principales causas que generan pérdida de la diversidad. Por lo que, para tratar de mitigar estos efectos, se han desarrollado estrategias que permitan conservar los datos biológicos y genéticos de especies para regenerarlas en el futuro. Estas estrategias pueden ser *in situ* o *ex situ* (Kulak *et al.*, 2022).

Las estrategias *in situ* permiten conservar especies dentro de su propio hábitat. La reforestación es una excelente estrategia *in situ* a largo plazo para restaurar zonas naturalmente carentes de vegetación o que se han perdido debido a la tala excesiva. Se realiza mediante la plantación de árboles o la regeneración natural del follaje, para recuperar los servicios hidrológicos que provee el páramo como la producción y regulación de agua. A su vez, permite reducir la erosión del suelo y deslizamientos de tierra. Con esto se logra incrementar la tasa de infiltración y la materia orgánica del suelo. No obstante, si se realiza con árboles exóticos puede ser contraproducente en pastizales elevados bien conservados, dado que se reduce la producción de agua hasta un 40% en comparación con la vegetación nativa (Bonnesoeur *et al.*, 2019).

Las estrategias *ex situ* permiten conservar la especie en lugares externos protegidos como jardines botánicos, viveros, herbarios y bancos de germoplasma (Kulak *et al.*, 2022).

Herbarios

Los herbarios son lugares donde se almacena un conjunto de muestras de plantas que han sido recolectadas, prensadas y conservadas junto a sus datos de acceso como lugar, fecha y recolector. Alrededor del mundo existen más de 350 millones de especímenes en aproximadamente 3000 herbarios. El inicio de los herbarios data del siglo XVI, por lo que se les puede considerar como testigos de la historia, que informan los efectos a largo plazo del cambio global en las plantas. Desde sus inicios, hasta la actualidad han sido empleados como herramientas para taxonomía, sistemática, botánica, ecología y conservación (Lang *et al.*, 2019; López & Sassone, 2019).

Germinación in vitro

La germinación *in vitro* se basa en la propagación de células vegetales mediante reproducción asexual en condiciones controladas de laboratorio para producir un elevado número de plántulas. Esta estrategia permite propagar especies en peligro de extinción ayudando a la conservación de la diversidad. Para evaluar la germinación, se realiza el protocolo de desinfección de la muestra antes de introducirla al medio MS de establecimiento. Durante este proceso se controlan parámetros como temperatura, luz y fotoperíodo. Luego, en la aclimatación, las plántulas germinadas se cultivan en macetas con tierra en condiciones estériles (Gallia *et al.*, 2021)

Banco de germoplasma

Los bancos de germoplasma son reservas que permiten salvaguardar recursos biológicos y moleculares de nuestros ecosistemas. Un banco debe garantizar la identidad de

cada accesión bajo custodia mediante el registro y etiquetado adecuado. Los datos de pasaporte deben incluir la información de la recolección como: nombre de la especie, características geográficas, físicas y bióticas del sitio de recolección, altitud, coordenadas, hora y fecha, uso local y recolector. Además, se debe crear una base de datos con información técnica de procesamiento, siembra o propagación, caracterización, identificación con marcadores morfológicos, fenotípicos o moleculares. Dentro de estos parámetros, es crucial monitorear la viabilidad de las muestras para garantizar que sean capaces de regenerar plantas completas (Alonso & Iriondo, 2014)

Capítulo III: Metodología

Fase de campo

En este estudio se trabajó con las especies *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadorensis* Jancz., las cuales fueron recolectadas mediante muestreo aleatorio durante los meses de abril a julio de 2022. La especie *R. andicola* se encontró en la zona del Bosque de *Polylepis* (17M 819069 9966755), la Laguna (17M 817897 9968063) y el Camino Viejo (17M 811301 9963287) del Parque Nacional Cayambe – Coca, ubicado al Norte de la Cordillera de los Andes, en la provincia de Napo. La especie *R. ecuadorensis* fue identificada a 2.5 km al Suroeste del Área Nacional de Recreación El Boliche (17M 767939 9930657), en la provincia de Cotopaxi. En la recolección de los frutos tipo bayas carnosas, se utilizaron tubos cónicos Falcon® etiquetados con el código de acceso, lugar y fecha de colecta. Las hojas se recolectaron en fundas de papel etiquetadas. Adicionalmente, se realizó un registro digital y se realizaron fichas descriptivas.

Fase de laboratorio

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en el Laboratorio de Genética Evolutiva y Conservación de Especies Vegetales y en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sede Matriz ubicada en la Avenida General Rumiñahui, Sangolquí (0°18'56"S 78°26'36"O). La siembra y el estudio de morfología se ejecutaron en el laboratorio del Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO), ubicado la Avenida Río Coca e Isla Seymour, en el Distrito Metropolitano de Quito.

Análisis morfológico

En el análisis morfológico, se utilizaron los siguientes descriptores: (i) número de semillas por fruto, (ii) peso y (iii) dimensiones.

El conteo de semillas se realizó mediante la disección de las bayas. Las semillas se limpiaron con ayuda de pinzas sobre papel toalla. Se dejaron secar durante 24 horas en cajas Petri selladas con papel Parafilm®, siguiendo la metodología de Wu *et al.* (2022).

Posteriormente, se almacenaron a 4 °C. Las semillas se organizaron en 10 lotes de 100 unidades por cada especie: *Ribes andicola* y *Ribes ecuadoreense*.

El peso promedio de las semillas se realizó midiendo la masa de los 10 lotes de 100 semillas en una balanza analítica de precisión (0,0001 g), previamente calibrada. El tamaño se determinó mediante observación de las semillas a través de estereomicroscopio. Se registró cada fotografía con escala mediante el programa *ImageJ*, acorde a la metodología descrita por Martín-Gómez *et al.* (2022). El dimensionamiento se llevó a cabo en base a una muestra de 100 semillas por especie.

Análisis de germinación

Ensayo de desinfección. En el ensayo de desinfección, las semillas se lavaron con agua destilada y se sumergieron en una solución de detergente al 1% con 2 gotas de Tween 20. La muestra se dejó en agitación durante 3 minutos y luego se realizó tres enjuagues con agua estéril. En el grupo control, el tratamiento se detuvo en este paso y se retomó en la siembra. En el resto de semillas, se aplicó la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0, 1 y 3%, durante 3 y 5 minutos acorde al tratamiento. Luego, se lavaron las semillas tres veces con agua estéril. Las semillas desinfectadas fueron sembradas en medio MS ½ e incubadas a 20 °C por 8 días. Todo el procedimiento de desinfección y siembra se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar. En este ensayo se emplearon 10 semillas para cada tratamiento y se realizaron por triplicado. La muestra total fue de 150 semillas por especie.

Ensayo de viabilidad. En este ensayo se realizó un pretratamiento sumergiendo las semillas en agua destilada durante 24 horas a 20 °C, luego se retiró la testa de cada semilla. Para la prueba de tetrazolio, se colocaron las semillas en una solución de tetrazolio al 1% a pH 6,6 durante 24 horas. Las semillas teñidas se enjuagaron con agua destilada y fueron inspeccionadas mediante estereomicroscopio para determinar los embriones viables (tinción total o parcial de color rojo o rosa, mínimo la mitad del embrión) o no viables (no teñido). El ensayo de viabilidad con índigo carmín se llevó a cabo acorde a la metodología de Marrero *et*

al. (2007). Se preparó la solución de índigo carmín al 0,15% disolviendo 15 mg del colorante en 100 ml de agua destilada. Luego, se sumergieron las semillas durante 24 horas en la solución preparada. Finalmente, se cuantificaron las semillas viables (no teñidas) e inviables (teñidas parcial o completamente) y se determinó el porcentaje de viabilidad.

Ensayo de germinación. En este ensayo, las semillas se sometieron a un proceso de escarificación por agua en papel filtro estéril por 24 horas a temperatura ambiente. La germinación se realizó en cámaras con régimen de luz, temperatura y humedad controlada. Las semillas se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) $\frac{1}{2}$, suplementado con ácido giberélico (GA_3) en diferentes concentraciones (125, 250, 500 mg/L) y se registró el crecimiento durante un fotoperíodo diario de 12 horas (luz), seguido de 12 horas de oscuridad continua. Las semillas se incubaron a temperatura constante a 5 °C y en régimen de temperatura alterna (20/10 °C), en la cual la temperatura más alta coincidió con la fase de luz y la temperatura más baja con la oscuridad. El control se cultivó a 5 °C y 20/10 °C en MS $\frac{1}{2}$ con 0 mg/L de giberelinas. La humedad se mantuvo constante a 65 % HR en todos los experimentos (Herranz-Ferrer *et al.*, 2020; Mattana *et al.*, 2012).

Almacenamiento. Las bayas recolectadas se diseccionaron con un bisturí para extraer las semillas del mesocarpio con ayuda de unas pinzas. Las semillas se lavaron con agua destilada sobre una caja Petri y se secaron a temperatura ambiente sobre papel filtro estéril durante un período de 24 a 72 horas. A continuación, se llenaron los pasaportes de cada accesión. Se llevó a cabo el ensayo de viabilidad de la muestra. Se introdujeron las semillas maduras y viables en tubos de ensayo de 10 mL. Finalmente, se almacenaron en refrigeración a 4 °C utilizando sílica gel deshidratada envuelta en algodón como indicador de humedad.

Diseño experimental

Análisis estadístico

En el presente estudio se aplicó estadística inferencial para el análisis de datos de la morfología de semillas. Adicionalmente, se empleó el diseño experimental factorial (DEF) y el

diseño experimental completamente al azar (DCA) para evaluar los factores que influyen en la germinación. Previo a los análisis, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad de los datos. Los tratamientos cuyos datos siguieron una distribución normal, se evaluaron mediante análisis ANOVA y la prueba de diferencia entre las medias se calculó empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). Los datos no normales se sujetaron al análisis de varianza no paramétrica a través de la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 95%. Los análisis anteriormente señalados se realizaron en el programa *InfoStat*.

En el ensayo de desinfección se aplicó un diseño experimental factorial 2^3 (DEF) con dos factores y tres niveles, como se describe en la Tabla 1. Este diseño está compuesto por los factores tiempo de imbibición y concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) con tres niveles medidos en minutos (0, 3, 5 min) y porcentaje (0, 1, 3%), respectivamente. La variable experimental es la semilla sembrada en la caja Petri. La variable de respuesta es el número de semillas contaminadas.

Tabla 1

Diseño experimental para la desinfección de las semillas.

Tratamiento	Tiempo (min)	NaClO (%)	Réplicas			Total
Control	0	0	10	10	10	30
TD1	3	1	10	10	10	30
TD2		3	10	10	10	30
TD3	5	1	10	10	10	30
TD4		3	10	10	10	30
Total			50	50	50	150

En el ensayo de viabilidad se empleó un diseño experimental como se detalla en la Tabla 2. Se contrastó la viabilidad por imbibición durante 24 horas a temperatura ambiente en solución de tetrazolio al 1% e índigo carmín al 0,15%. La variable experimental es cada semilla sometida a tinción. La variable experimental es cada semilla sometida a tinción. La variable de respuesta es el número de semillas viables, no viables y vacías.

Tabla 2

Diseño experimental para la viabilidad de las semillas.

Tratamiento	Prueba	Réplicas			Total
TV1	TZ 1%	40	40	40	120
TV2	IC 0,15%	40	40	40	120
Total		80	80	80	240

Nota: las pruebas colorimétricas de tetrazolio al 1% e índigo carmín al 0,15% se abrevian con TZ e IC, respectivamente.

En el ensayo de germinación se evaluó el efecto del ácido giberélico (GA_3) y la temperatura sobre la emergencia de radícula de las semillas de *Ribes* sp., mediante diseño experimental factorial (DEF), como se indica en la Tabla 3. La germinación se llevó a cabo a humedad constante igual a 65% y fotoperiodo compuesto por 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El control sin giberelinas se expuso a 5 °C y la combinación de 20/10 °C. La variable experimental es cada semilla sembrada en medio MS ½. La variable de respuesta es el número de semillas germinadas, es decir, con radícula visible (>1 mm).

Tabla 3

Diseño experimental para la germinación de las semillas.

Tratamiento	Conc. GA_3 (mg/L)	Temperatura (°C)	Réplicas			Total
Control C1	0	5	10	10	10	30
Control C2		10/20	10	10	10	30
TG11	125	5	10	10	10	30
TG12		10/20	10	10	10	30
TG21	250	5	10	10	10	30
TG22		10/20	10	10	10	30
TG31	500	5	10	10	10	30
TG32		10/20	10	10	10	30
Total			80	80	80	240

Capítulo IV: Resultados

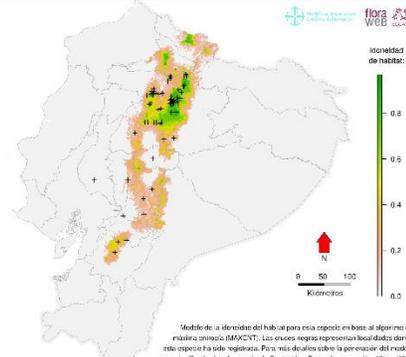
Fase de campo

Las especies *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadorensis* Jancz. recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca y en el Área Recreacional del Boliche fueron identificadas en campo y comparadas con accesiones del Herbario Nacional. Los datos obtenidos permitieron elaborar fichas técnicas de las especies para registrarlas en el banco de germoplasma. La descripción general y morfológica de *Ribes andicola* recolectada en el Camino Viejo (17M 811301 9963287) del Parque Nacional Cayambe – Coca se detalla en la figura 3.

Figura 3

Descripción general y morfológica de la especie *Ribes andicola*.

 <p>Foto: Ribadeneira, P.</p>	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE	
	Nombre Científico: <i>Ribes andicola</i> Jancz.	
	Nombre Común: Mora de monte.	
	Familia: Grossulariaceae	
	Rango altitudinal: 3000 – 4500 m.s.n.m.	
Forma de vida: Arbusto erguido.		
MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA ESPECIE		
Flor	Inflorescencias pendulares de 7 a 24 flores en forma de copa de cáliz rojo y pétalos anaranjados.	
Hojas	Alternas, trilobuladas de margen biserrado y base obtusa. Olor dulce.	
Tallo	Tallos teretes (cilíndricos), pilosos y con glándulas subsésiles.	
Fruto	Baya esférica color verde (inmadura), anaranjado (estado intermedio) o rojo (madura).	
Semillas	Forma: Ovada.	
	Color: Verde (Inmaduras) a marrón (madura)	
	Textura: Rugosa	
	Dispersión del fruto: Fruto comestible.	

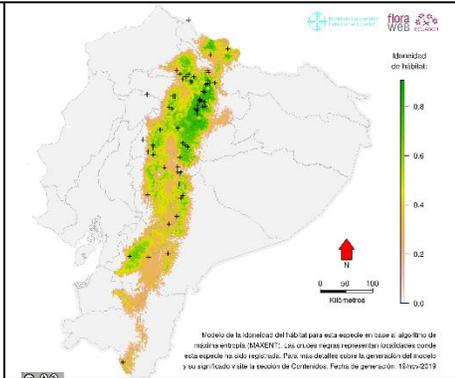
DATOS ADICIONALES	DISTRIBUCIÓN	
<p>Estatus UICN: Ninguno</p> <p>Usos: Restauración ecológica</p> <p>Propiedades: No estudiadas.</p>	<p>Azuay, Bolívar, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua.</p>	 <p>Modelo de la idoneidad del hábitat para esta especie en base al algoritmo de máxima entropía (MAXENT). Las cruces negras representan localidades donde esta especie ha sido registrada. Para más detalles sobre la generación del modelo y su significado véase la sección de Contenidos. Fecha de generación: 18/ene/2018</p>
<p><i>Fuente:</i> (Romoleroux <i>et al.</i>, 2016)</p>		

La descripción general y morfológica de *Ribes ecuadorensis* recolectada a 2.5 km al Suroeste del Área Nacional de Recreación El Boliche (17M 767939 9930657) se detalla en la figura 4.

Figura 4

Descripción general y morfológica de la especie Ribes ecuadorensis.

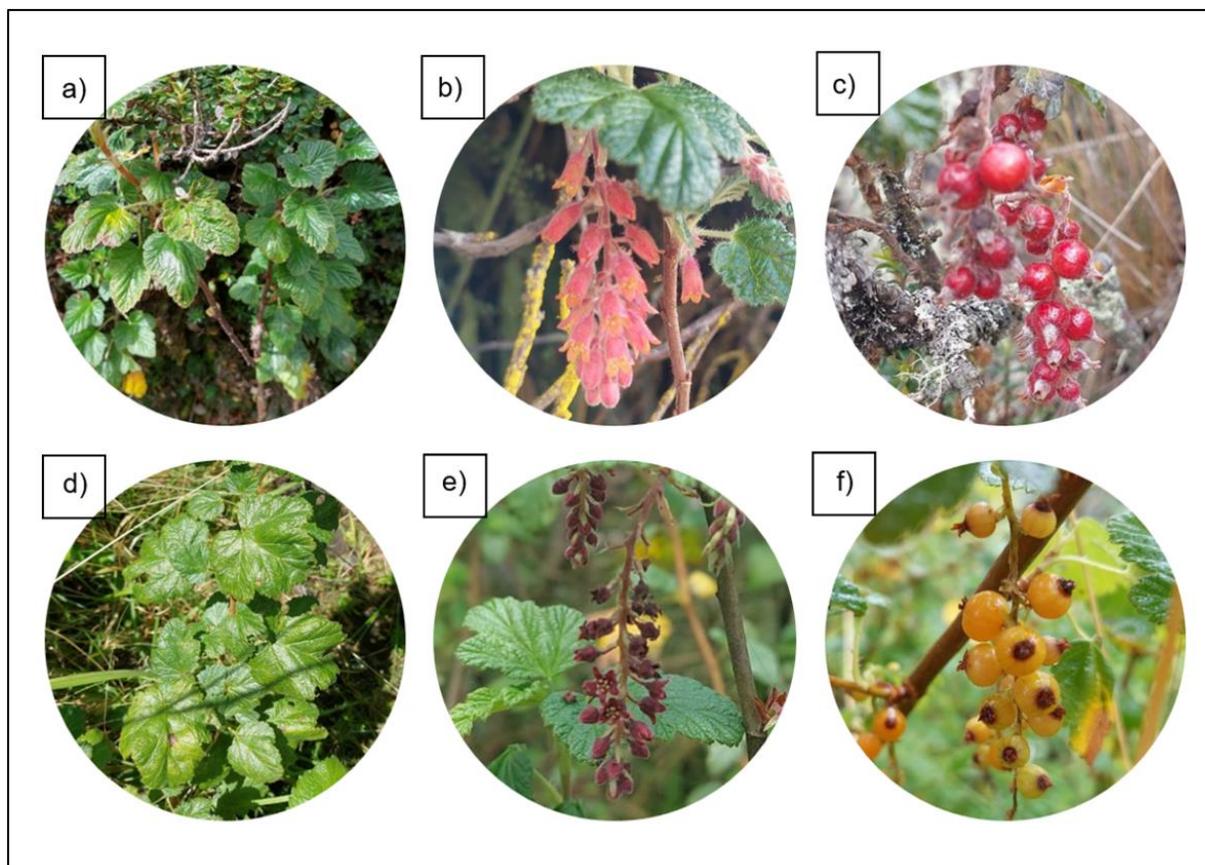
 <p>Foto: Ribadeneira, P.</p>	<p>DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE</p>
	<p>Nombre Científico: <i>Ribes ecuadorensis</i> Jancz.</p>
	<p>Nombre Común: Uva</p>
	<p>Familia: Grossulariaceae</p>
	<p>Rango altitudinal: 2900 – 3800 m.s.n.m.</p>
<p>Forma de vida: Arbusto escandente o erguido.</p>	
<p>MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA ESPECIE</p>	
<p>Flor</p>	<p>Inflorescencias pendulares de 30 a 70 flores en forma de copa de color rojo vino.</p>
<p>Hojas</p>	<p>Alternas, trilobuladas de margen aserrado y base cordada. Sin olor.</p>
<p>Tallo</p>	<p>Tallos teretes (cilíndricos), glabros (carentes de pelos) con glándulas sésiles.</p>
<p>Fruto</p>	<p>Baya esférica estriada color verde (inmadura) o anaranjado (madura).</p>

Semillas	Forma: Ovalada y alargada en forma de cuña.	
	Color: Amarillento (inmadura) o marrón rojizo (madura).	
	Textura: Rugosa. Gelatinosa por el mucílago que la recubre.	
	Dispersión del fruto: Aves frugívoras.	
DATOS ADICIONALES	DISTRIBUCIÓN	
Estatus UICN: Ninguno Usos: Restauración ecológica Propiedades: No estudiadas.	Azuay, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua.	
<i>Fuente:</i> (Romoleroux <i>et al.</i> , 2016).		

Al recolectar, las especies de *Ribes* sp. se observó que las plantas se encontraban en varios estadios de maduración: vegetativo, floración y fructificación (figura 5). *Ribes andicola* se encontró en floración durante los meses de abril y mayo (figura 5b), mientras que *Ribes ecuadorensis* floreció en el mes de julio (figura 5e). La fructificación de *Ribes andicola* se registró a finales de abril (figura 5c). A diferencia de la fructificación de *Ribes ecuadorensis*, la cual se dio en el mes de mayo (figura 5f).

Figura 5

Estado de maduración de *Ribes* sp.

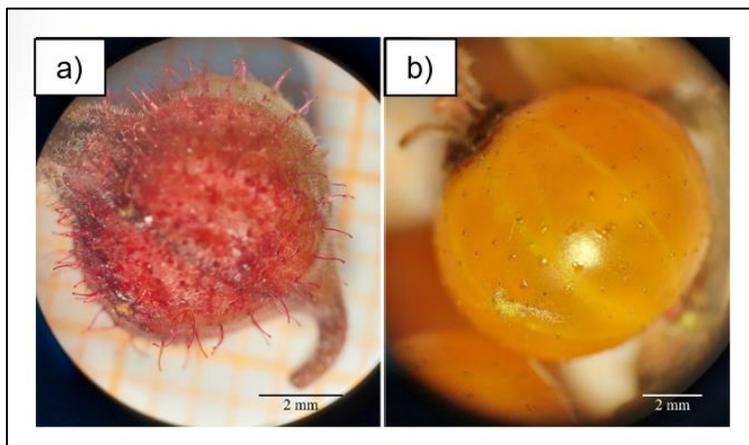


Nota: Fenología de *Ribes* sp. (a) estado vegetativo, (b) floración y (c) frutificación de *R. andicola*; (d) estado vegetativo, (e) floración y (f) frutificación de *R. ecuadorensis*.

Al recolectar los frutos de *Ribes* sp. (figura 6), se observó que *Ribes andicola* presentaba tricomas de coloración rojiza y morfología alargada (figura 6a). En cambio, los tricomas de *R. ecuadorensis* se presentaron de color marrón con estructura sésil. La baya de *R. ecuadorensis* muestra un patrón de estrías que le atraviesan longitudinalmente (figura 6b). Los tricomas son estructuras que se presentan en la epidermis del fruto como una adaptación para protegerlo ante amenazas.

Figura 6

Fruto de *Ribes* sp. con presencia de tricomas.



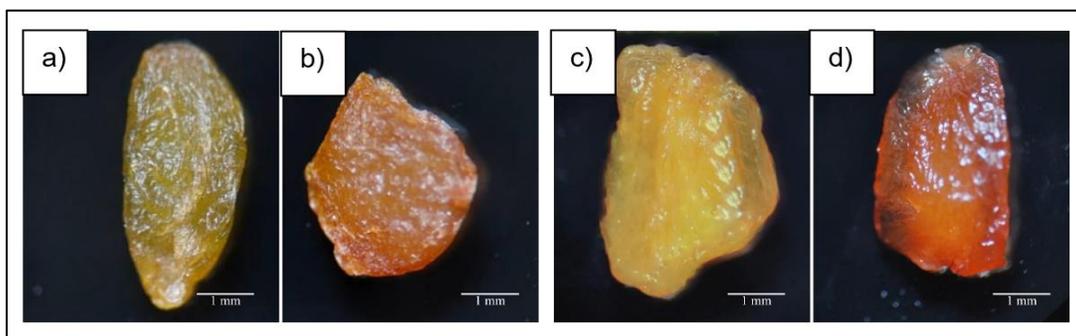
Nota: Tricomas del fruto de *Ribes* sp. (a) *Ribes andicola* y (b) *Ribes ecuadorensis*.

Fase de laboratorio***Análisis morfológico de semillas***

En el análisis morfológico se emplearon semillas maduras, por lo que previamente al ensayo se diferenció el estado de maduración (figura 7). Se observó que *Ribes andicola* presenta coloración verdosa en su estado inmaduro, la cual al madurar se vuelve marrón (figura 7a y 7b). La semilla de *Ribes ecuadorensis* tiene una coloración amarilla en su estado inmaduro, que cambia a marrón al madurar (figura 7c y 7d).

Figura 7

Estado de maduración de las semillas de *Ribes* sp.



Nota: Estado de maduración de las semillas *Ribes* sp. *Ribes andicola* (a) inmadura, (b) madura. *Ribes ecuadorensis* (c) inmadura, (d) madura.

Los parámetros de morfología evaluados fueron número de semillas por baya, peso medido en gramos y dimensiones de largo, ancho y área (Tabla 4). Los resultados indican que *Ribes andicola* produce mayor número de semillas por fruto (24 ± 9) que *Ribes ecuadorensis* (11 ± 5). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las semillas de *R. andicola* tienen menor masa y menor tamaño que las semillas de *R. ecuadorensis*, lo que posiblemente influya en la dispersión. En relación a las medidas el largo, ancho y área, estas se obtuvieron mediante el programa *ImageJ*. A partir de estas medidas se obtuvo además la relación entre largo/ancho y el espesor del mucílago. Se empleó una muestra de 100 semillas por especie para cada parámetro.

Tabla 4

Parámetros morfológicos de las semillas *Ribes andicola* y *Ribes ecuadorensis*.

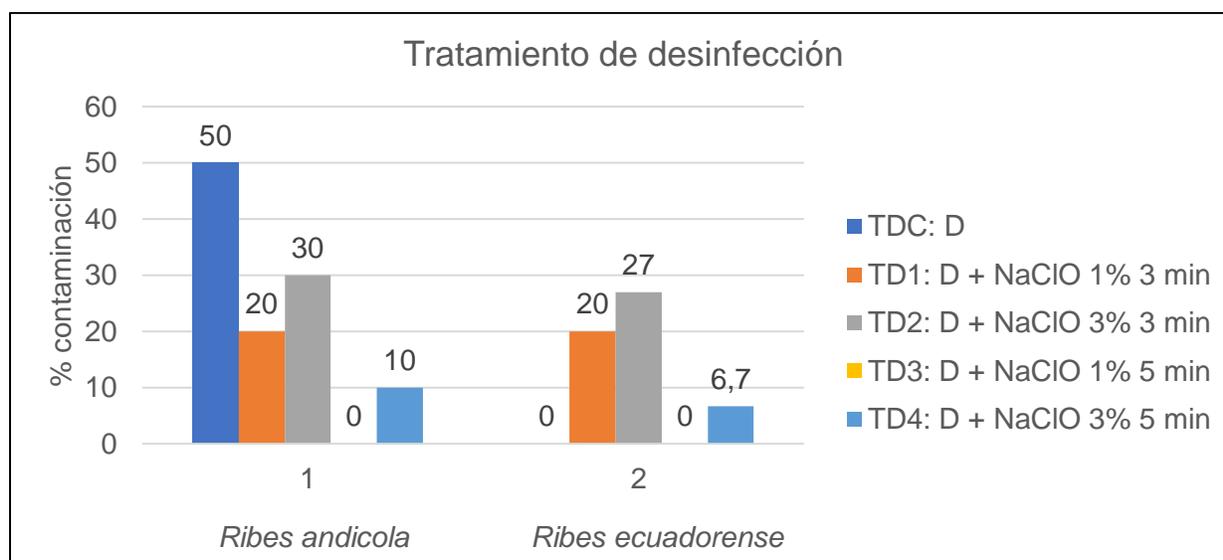
Característica	<i>Ribes andicola</i>	<i>Ribes ecuadorensis</i>
Número de semillas por fruto	24 ± 9	11 ± 5
Peso (g)	$0,059 \pm 0,005$	$0,199 \pm 0,017$
Largo (mm)	$1,827 \pm 0,224$	$2,766 \pm 0,430$
Ancho (mm)	$1,161 \pm 0,167$	$1,705 \pm 0,344$
Área (mm ²)	$1,605 \pm 0,358$	$3,901 \pm 0,974$
Largo/ancho	$1,594 \pm 0,236$	$1,684 \pm 0,422$
Espesor del mucílago (mm)	$0,205 \pm 0,125$	$0,399 \pm 0,226$

Análisis de germinación de las semillas

Ensayo de desinfección. En este ensayo se empleó como desinfectante el detergente al 1% con Tween 20. Adicionalmente, se evaluó el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (1% y 3%), así como diferentes tiempos de exposición (3 y 5 min). Los resultados de este ensayo se pueden observar en la figura 8.

Figura 8

Porcentaje de contaminación con diferentes tratamientos de desinfección en Ribes sp.



Nota: Semillas de *Ribes* sp., D: detergente al 1% con Tween 20, TDC: tratamiento control.

TDC: D, TD1: D+NaClO 1% 3 min, TD2: D+NaClO 3% 3 min. TD3: D+NaClO 1% 5 min. TD4: D+NaClO 3% 5 min.

En esta figura se puede observar que la contaminación disminuye al emplear NaClO al 1% por 5 minutos de exposición (TD3). En el caso de *R. andicola*, al comparar el control con este tratamiento, la contaminación se redujo del 50 al 0%. En *R. ecuadorensis*, se observó ausencia de contaminación tanto en el control como en el tratamiento TD3. Estos resultados sugieren que el mayor tiempo de exposición al NaClO favorece la desinfección de la semilla.

Al realizar el análisis estadístico Shapiro-Wilks con estos resultados para indicar si son paramétricos o no paramétricos, el valor p resultó menor que el nivel de confianza, por lo que los datos siguen una distribución no normal (Tabla 5, Apéndice 1).

Tabla 5

Prueba de Shapiro-Wilks para el análisis de desinfección de Ribes sp.

Especie	Variable	n	Media	DE	W*	Valor p
<i>R. andicola</i>	Semillas	15	2,20	3,57	0,66	<0,0001
<i>R. ecuatorense</i>	contaminadas	15	1,07	2,49	0,51	<0,0001

Nota: DE es desviación estándar. W* es el estadístico de prueba de Shapiro-Wilk. Valor p es unilateral derecho.

En base a estos resultados, se aplicó el análisis de varianza no paramétrica Kruskal Wallis. En esta prueba no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. En *R. andicola* se obtuvo un valor p igual a 0,5323 y en *R. ecuatorense* se obtuvo un valor p igual a 0,6685 (Tabla 6).

Tabla 6

Prueba de Kruskal Wallis para el análisis de desinfección de Ribes sp.

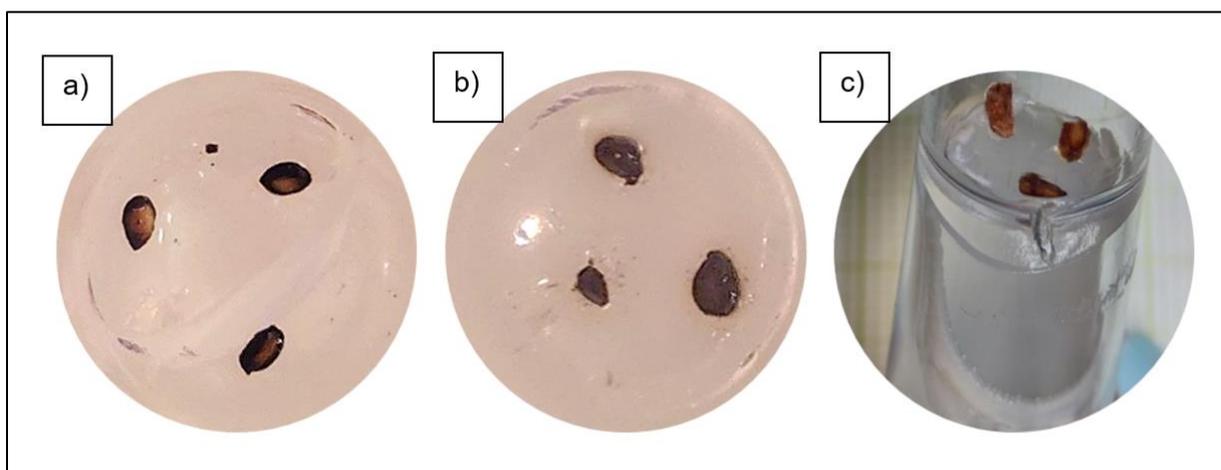
Variable	Tratamiento	N	Media	DE	PR	gl	H	Valor p
Semillas contaminadas de <i>Ribes</i> <i>andicola</i>	TD1	3	2,00	3,46	8,00	4	2,23	0,5323
	TD2	3	3,00	5,20	8,33			
	TD3	3	0,00	0,00	5,50			
	TD4	3	1,00	1,73	7,33			
	TDC	3	5,00	5,00	10,83			
Semillas contaminadas de <i>Ribes</i> <i>ecuatorense</i>	TD1	3	2,00	3,46	9,00	4	1,16	0,6685
	TD2	3	2,67	4,62	9,33			
	TD3	3	0,00	0,00	6,50			
	TD4	3	0,67	1,15	8,67			
	TDC	3	0,00	0,00	6,50			

Nota: DE es la abreviación de desviación estándar, PR es promedio de rangos y gl es grados de libertad.

Luego del tratamiento de desinfección se pudo observar los efectos del hipoclorito de sodio en las semillas de *Ribes* sp. (figura 9). En las semillas de *R. andicola* hubo un efecto escarificador por parte del NaClO, ya que se desprendieron partes de la testa (figura 9a). En las semillas de ambas especies se observó que hubo oxidación en la cubierta exterior (figura 9a y 9b). Además, en *R. ecuadoreense* se observó contaminación por colonias microbianas de crecimiento blanquecino cremoso (figura 9c).

Figura 9

Efectos del tratamiento de desinfección en *Ribes* sp.



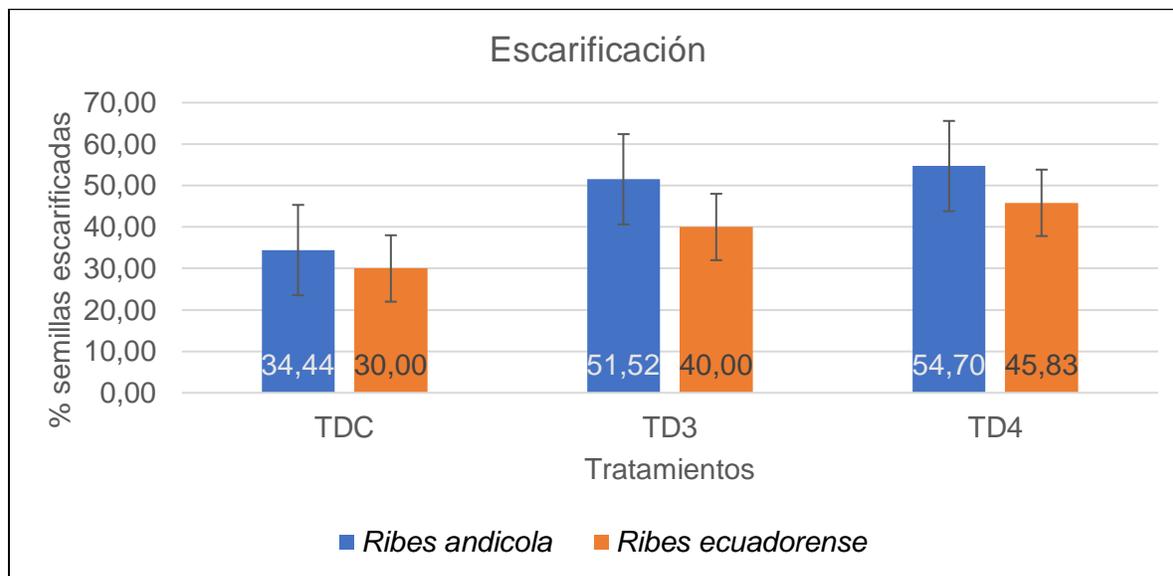
Nota: Efecto del hipoclorito de sodio en *Ribes* sp. (a) Oxidación de la testa y escarificación de *R. andicola*. (b) Oxidación y (c) contaminación en semillas de *R. ecuadoreense*.

El porcentaje de semillas de *Ribes* sp. escarificadas por los tratamientos de desinfección se observa en la figura 10, en esta gráfica se encuentran contemplados los efectos de los tratamientos TD3 y TD4 en contraste con el control. Estos tratamientos corresponden a la concentración de NaClO igual al 1%, aplicados por un tiempo de exposición de 3 minutos (TD3) y 5 minutos (TD4), respectivamente. Se consideraron estos tratamientos dado que esta concentración de hipoclorito (1%) fue la más favorable para la desinfección. Se obtuvo que la exposición a NaClO al 1% durante 5 minutos brinda un mayor porcentaje de

semillas escarificadas tanto para *Ribes andicola* (54,70%) como para *Ribes ecuadoreense* (45,83%), respecto al control. Esto implica que un mayor tiempo de exposición permite una mayor probabilidad de ruptura de la testa.

Figura 10

Efecto escarificador del hipoclorito de sodio 1% en semillas de *Ribes* sp.

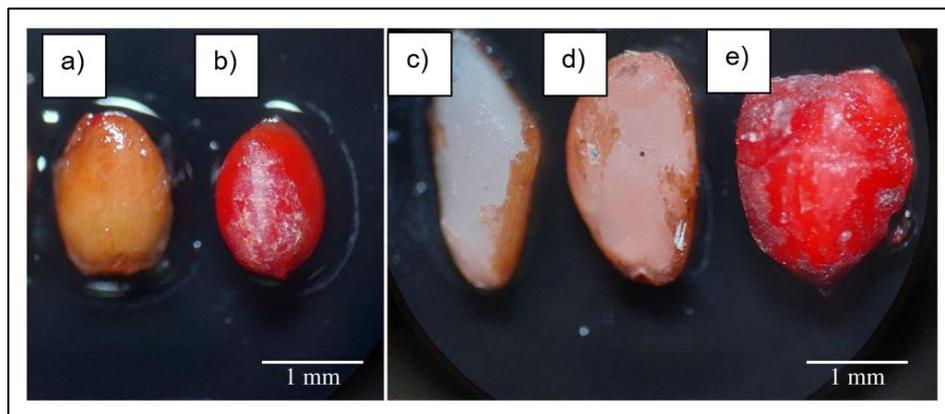


Nota: Porcentaje de semillas de *Ribes* sp. escarificadas por los tratamientos de desinfección. D: detergente al 1% con Tween 20, TDC: tratamiento control. TDC: D, TD3: D+NaClO 1% 5 min. TD4: D+NaClO 3% 5 min.

Ensayo de viabilidad. La viabilidad se analizó mediante tinción con tetrazolio al 1% y con índigo carmín al 0,15% por 24 horas a temperatura ambiente. En la prueba con tetrazolio, las semillas viables de *R. andicola* y *R. ecuadoreense* se tiñeron de rojo y rosado, mientras que las semillas no viables no presentaron tinción (figura 11).

Figura 11

Patrones de tinción observados en la prueba de tetrazolio en semillas de *Ribes* sp.

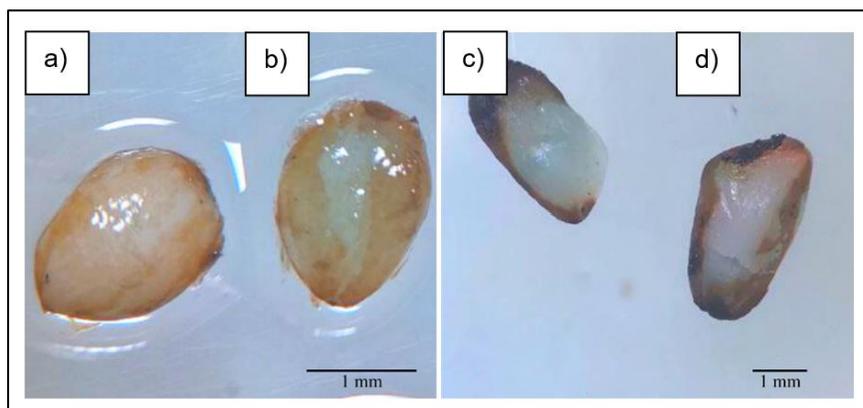


Nota: Tinción con tetrazolio de *Ribes* sp. Semillas inviables (a) y viables (b) de *R. andicola*. Semillas inviables (c) y viables (d,e) de *R. ecuadorensis*.

En la prueba de índigo carmín, la coloración azul es señal de daño celular. Las semillas de *Ribes* sp. viables permanecieron sin teñirse y las semillas no viables se tiñeron de azul (figura 12).

Figura 12

Patrones de tinción observados en la prueba de índigo carmín en semillas de *Ribes* sp.

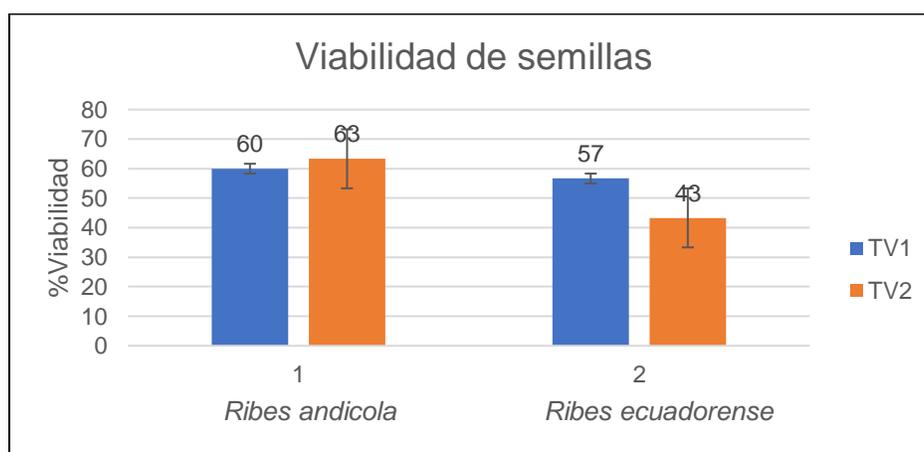


Nota: Tinción con índigo carmín de *Ribes* sp. Semillas viables (a) y no viables (b) de *R. andicola*. Semillas inviables (c) y viables (d) de *R. ecuadorensis*.

La prueba de tetrazolio reflejó un porcentaje de viabilidad de 60% para *R. andicola* y 57% *R. ecuadorensis*. En cambio, el porcentaje de viabilidad obtenido mediante la prueba con índigo carmín dio un valor de 63% para *R. andicola* y 43% *R. ecuadorensis* (Figura 13). Estos resultados permiten observar una alta viabilidad de las semillas de *Ribes* sp.

Figura 13

Porcentaje de viabilidad de *Ribes* sp. mediante prueba de tetrazolio e índigo carmín.



Nota: Viabilidad de semillas de *Ribes* sp. TV1: prueba de tetrazolio al 1% por 24 h a temperatura ambiente, TV2: prueba con índigo carmín al 0,15% bajo las mismas condiciones.

Al realizar el análisis estadístico de Shapiro-Wilks para verificar el supuesto de normalidad de datos, el valor p resultó mayor que el nivel de confianza ($\alpha = 0,05$), por lo que los datos siguieron una distribución normal (Tabla 7, Apéndice 2).

Tabla 7

Prueba de Shapiro-Wilks para el análisis de viabilidad de *Ribes* sp.

Especie	Variable	n	Media	DE	W*	Valor p
<i>R. andicola</i>	% Viabilidad	6	61,67	11,69	0,89	0,3986
<i>R. ecuadorensis</i>		6	50,00	20,00	0,99	0,9751

Nota: DE es desviación estándar. W* es el estadístico de prueba de Shapiro-Wilk. Valor p es unilateral derecho.

En base a estos resultados, se aplicó el análisis de varianza ANOVA. En esta prueba se obtuvo homogeneidad en los valores, dado que el coeficiente de variación dio un valor de 20,94 para *R. andicola* y un valor de 41,63 para *R. ecuadorensis* (Tabla 8).

Tabla 8

Análisis de la varianza de Ribes sp.

Especie	Variable	N	R²	R² Aj.	CV
<i>Ribes andicola</i>	%Viabilidad	6	0,02	0,00	20,94
<i>Ribes ecuadorensis</i>	%Viabilidad	6	0,13	0,00	41,63

Nota: N: tamaño de muestra, CV: coeficiente de varianza.

En el Cuadro de análisis de la varianza, se obtuvo un valor p igual a 0,7676 para *R. andicola* y un valor p igual a 0,4766 para *R. ecuadorensis*. Dado que estos valores fueron menores al intervalo de confianza, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (Tabla 9).

Tabla 9

Cuadro de Análisis de la varianza de Ribes sp.

Especie	F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
<i>Ribes andicola</i>	Modelo	16,67	1	16,67	0,10	0,7676
	Tratamiento	16,67	1	16,67	0,10	0,7676
	Error	666,67	4	166,67		
	Total	683,33	5			
<i>Ribes ecuadorensis</i>	Modelo	266,67	1	266,67	0,62	0,4766
	Tratamiento	266,67	1	266,67	0,62	0,4766
	Error	1733,33	4	433,33		
	Total	2000,00	5			

Nota: FV: Fuente de variación, SC: suma de cuadrados, gl: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F: estadístico F.

Los resultados anteriores se corroboraron mediante la prueba de Duncan (Tabla 10), en la cual ambos ensayos de viabilidad resultaron no ser significativamente diferentes, dado que el

valor p es mayor al intervalo de confianza ($\alpha= 0,05$). Por lo tanto, ambos tratamientos son similares para determinar la viabilidad en semillas de *Ribes* sp.

Tabla 10

Prueba de Duncan para el tratamiento de viabilidad de Ribes sp.

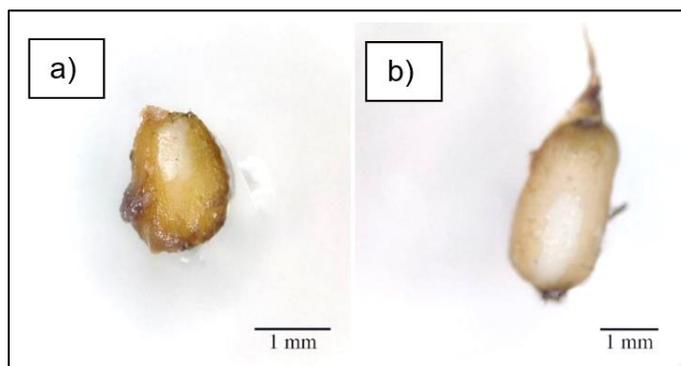
Especie	Tratamiento	Error	gl	Medias	n	E. E	Clase
<i>Ribes andicola</i>	TV1	166,67	4	60,00	3	7,45	A
	TV2	166,67	4	63,33	3	7,45	A
<i>Ribes ecuadoreense</i>	TV2	433,33	4	43,33	3	12,02	A
	TV1	433,33	4	56,67	3	12,02	A

Nota: gl: grados de libertad, EE: error estándar.

Ensayo de germinación. En este ensayo se estudió el efecto de la temperatura y la concentración de giberelinas sobre la germinación de las semillas de *Ribes* sp. La imbibición en agua destilada por 24 horas estimuló el desarrollo del embrión en las dos especies, haciéndolo visible como se puede observar en la figura 14.

Figura 14

Desarrollo del embrión de Ribes sp.



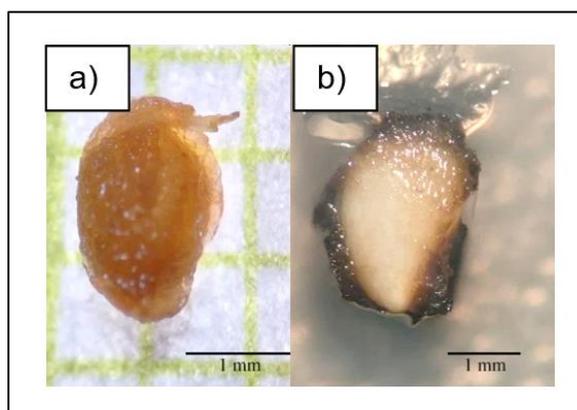
Nota: Embrión desarrollado de (a) *Ribes andicola* y (b) *Ribes ecuadoreense*.

El desarrollo de la radícula en semillas de *Ribes* sp. se observa en la figura 15. Las semillas de *Ribes andicola* desarrollaron radícula en la primera semana después de la siembra en medio sin giberelinas a temperatura 20/10 °C (Figura 15a). Pese al tratamiento de ruptura

de la latencia, las semillas de *Ribes ecuadoreense* no fueron capaces de romper la testa y formar radículas durante los 28 días de tratamiento (Figura 15b), lo que sugiere que las semillas de *Ribes* sp. requieren mayor tiempo de imbibición previo a la siembra o que el medio de cultivo tenga mayor contenido de agua. A su vez, estos resultados indican que la concentración de giberelinas empleada podría haber sido muy elevada, por lo que podría haber un efecto inhibitor.

Figura 15

Desarrollo de radícula en semillas de Ribes sp.



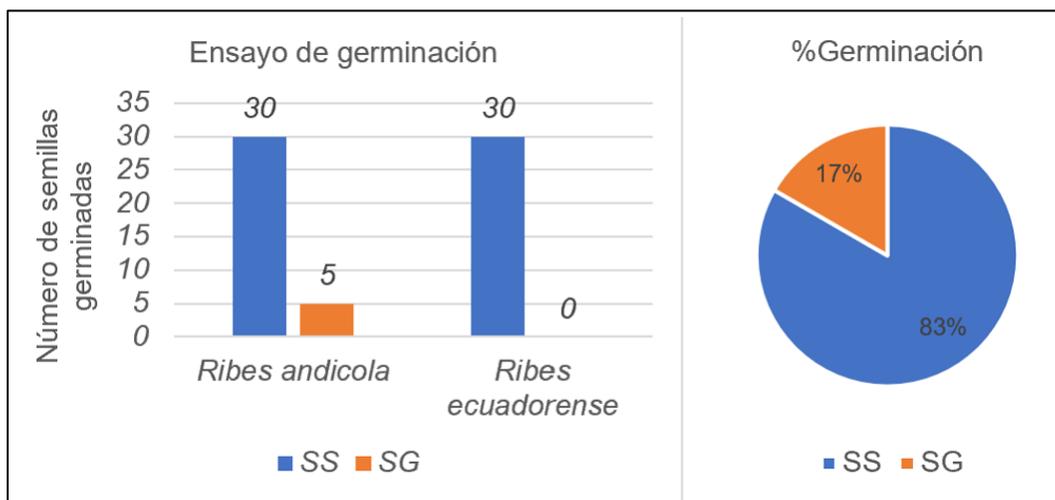
Nota: Desarrollo de radícula en semillas de *Ribes* sp. (a) Formación de radícula de *R. andicola*, (b) ausencia de radícula en *R. ecuadoreense*.

En el presente estudio se probaron dos tratamientos 1) a temperatura de 5 °C y otro 2) temperatura 20 °C en combinación con 10 °C alternando el fotoperiodo 12h/12h en la que se trató de simular la temperatura más alta del día y la temperatura más baja de la noche. Adicionalmente, se probaron cuatro concentraciones de giberelinas al 0, 125, 250 y 500 mg/L. Los resultados del ensayo de germinación presentaron ausencia de germinación para todas las combinaciones probadas tanto en *Ribes andicola* como *Ribes ecuadoreense*, a excepción del tratamiento de temperatura combinada 20/10 °C en ausencia de giberelinas (TGC1). En este

último tratamiento, el 17% de semillas de *Ribes andicola* sembradas con el tratamiento TG1 germinaron exitosamente (figura 16).

Figura 16

Número de semillas germinadas en relación a la temperatura y giberelinas en la de *Ribes sp.*



Nota: Efecto de la temperatura combinada 20/10 °C y la ausencia de giberelinas en la germinación de *Ribes sp.* SS: semillas sembradas. SG: semillas germinadas. (a) número de semillas germinadas, (b) porcentaje de germinación.

En la figura 17 se pueden observar las plántulas obtenidas a partir de semillas tras 28 días de germinación. Estos resultados sugieren que los mecanismos de ruptura de latencia como la escarificación y la suplementación de giberelinas en el medio podrían estar ejerciendo un efecto inhibitor de la germinación.

Figura 17

Plántulas de *Ribes andicola*.



Nota: Plántulas de *Ribes andicola*. (a-e) tratamiento control en medio MS ½ sin giberelinas a 20/10 °C. (d-e) contaminación fúngica en plántulas de *R. andicola*.

Capítulo V: Discusión

El avance de la agricultura, ganadería, minería y otras actividades practicadas de manera no sustentable ocasionan la degradación de bosques nativos de Los Andes y la extinción de especies que allí habitan. La siembra de nuevas variedades de manera intensiva con el afán de obtener mayores rendimientos desplaza a las variedades nativas (Wilkus *et al.*, 2018). Esto reduce la diversidad, dado que provoca la disminución de variantes de genes entre poblaciones o también llamada erosión genética. Por ello, los bancos de germoplasma de semillas son muy útiles para preservar el material vegetal, dado que conservan fuentes genéticas que representan la biodiversidad. Las accesiones guardadas se pueden emplear en reforestación o en mejoramiento genético frente a factores bióticos o abióticos que afecten la biodiversidad, así como a condiciones climáticas adversas (Peres, 2016).

En el banco de semillas andinas se guardan accesiones consideradas fuente de genes de interés de resistencia a condiciones de páramo como baja disponibilidad de oxígeno y radiación solar intensa. Este banco de germoplasma está dedicado al almacenamiento de material vegetal, dado que la temperatura de conservación entre 5–10 °C permite preservar las semillas durante algunas décadas. Las accesiones que ingresan al banco de genes requieren de caracterización mediante descriptores morfológicos y fisiológicos asociados a la germinación (Sinkovič *et al.*, 2019). En el presente estudio se caracterizaron las especies *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadorensis* Jancz. de la familia *Grossulariaceae*, con el objetivo de preservar genes de interés de poblaciones andinas. El estudio de estas especies se centró utilizando los siguientes descriptores morfológicos de semillas: número de semillas por fruto, largo de la semilla, ancho de la semilla, relación entre largo/ancho de la semilla, área y peso de 100 semillas.

Según Bawa y colaboradores (2019), el número de semillas por fruto puede categorizarse acorde a la abundancia, como: una (1), pocas (≤ 4), muchas (≥ 6) y numerosas (≥ 20). Por lo tanto, *Ribes andicola* puede producir entre muchas y numerosas semillas dado

que se cuantificaron 24 ± 9 semillas (Tabla 4). Mientras que *Ribes ecuadoreense* produce muchas semillas (11 ± 5). Los resultados indican que *R. andicola* produce mayor número de semillas por baya que *R. ecuadoreense*. La cantidad de semillas está influenciada por la polinización, la dispersión de semillas, la disponibilidad de recursos y factores ambientales como la salinidad, la cual reduce significativamente el número de semillas producidas (Rosental *et al.*, 2016). La planta asigna recursos limitados entre varias semillas, lo cual implica la reducción de la cantidad de recursos invertidos en cada una de ellas (Lázaro & Larrinaga, 2018). De esta manera, una mayor producción de semillas implica designar menor cantidad de nutrientes para cada una, pero con finalidad de que sean distribuidas a mayor distancia.

Rosental y colaboradores (2016), en su estudio sobre el efecto del ambiente y la genética sobre el balance metabólico de semillas de tomate (*Solanum pennelli* y *S. esculentum*), estudia parámetros morfológicos como el peso y el número de semillas maduras. El autor indica que el peso de la semilla está regido por una estricta regulación genética, pero no está relacionado con el vigor de la germinación de plántulas. En el presente estudio, los resultados indican que la masa promedio de las semillas de *R. andicola* es 0,059 g y la masa de *R. ecuadoreense* es 0,199 g (Tabla 4). Estos valores están en concordancia con los que reporta la bibliografía (0,05 y 0,9 g) para las especies emparentadas, *R. hudsonianum* Richardson var. *petiolare* (Douglas) Jancz. y *R. speciosum* Pursh, respectivamente (Mattana *et al.*, 2014). No obstante, se requieren otros estudios para determinar la influencia del componente genético en el peso de semillas del género *Ribes* y sus implicaciones.

En este estudio se evidenció que las semillas de *R. ecuadoreense* tienen mayor tamaño que las semillas de *R. andicola*, lo cual marca un precedente de diferenciación morfológica entre dichas especies por su tamaño. Pese a que aún no se ha podido esclarecer si el tamaño de la semilla se conserva entre taxones más estrechamente emparentados o si es un rasgo poco documentado, se sospecha de interacciones entre la selección ecológica y el fondo genético (Cardinal-McTeague *et al.*, 2019). Estudios indican que un mayor tamaño

posiblemente representa una mayor reserva de carbohidratos en el endospermo para obtener plántulas más grandes. Además, tanto la forma como el tamaño de la semilla pueden influir en la imbibición de agua, el contenido de humedad de la semilla y, en consecuencia, en la germinación de la semilla (Blalogue *et al.*, 2020).

Otro factor que influye sobre el tamaño de la semilla es el mecanismo de dispersión, debido a que en la naturaleza se ha encontrado que las semillas pequeñas se diseminan gracias a frugívoros y a cápsulas secas que explotan con fuerza cuando maduran (Cardinal-McTeague *et al.*, 2019). A diferencia de las cápsulas explosivas, las especies que dispersan el fruto completo tienen cierta ventaja si tienen éxito en encontrar un lugar, ya que germinan varias semillas a la vez (Castillo *et al.*, 2020). Entre ellas, *Ribes* sp. cuyas bayas redondas caen naturalmente de la inflorescencia después del período de secado en la planta. Estas semillas luego de caer, pueden rodar cuesta abajo para asentarse en una zanja húmeda, donde es probable que germinen varias plántulas. Esto se ha evidenciado en la familia *Grossulariaceae* durante la fase de campo, debido a que son plantas que se encuentran en laderas en el margen de bosque y en zonas con alta humedad.

La interacción con el dispersor está relacionada con la morfología y la fenología de fructificación. De esta manera, especies como *Ficus* (*Moraceae*), *Cecropia* (*Urticaceae*) y *Miconia* (*Melastomataceae*), al igual que *Ribes* (*Grossulariaceae*), tienen pequeños frutos ricos en agua, azúcar y abundantes semillas pequeñas. Las cosechas de estas especies son mucho más grandes durante una temporada más corta, con la finalidad de atraer frugívoros menos especializados (Messeder *et al.*, 2021). Esto indica que la dispersión de semillas mediada por frugívoros es una relación mutualista relevante en la gestión de ecosistemas para el mantenimiento de la biodiversidad, lo cual respalda a prácticas de restauración más eficaces.

Los bancos de germoplasma de semillas almacenan especies con características de interés para emplearlas en reforestación o mejoramiento en el futuro. La regeneración vegetal comprende el desarrollo desde semilla hasta plántula y planta adulta. En el proceso, la

germinación y el establecimiento de plántulas son pasos críticos, ya que determinan la dinámica y persistencia de la población. La tasa de germinación está influenciada por la morfología, los niveles de hormonas vegetales, la ruptura de la latencia, la regulación de la transcripción, la viabilidad de la semilla y las condiciones ambientales, incluidas la disponibilidad de agua, temperatura, niveles de nitrato y luz (Roque Marca *et al.*, 2021).

Durante la maduración de las semillas, los metabolitos necesarios para la germinación como almidón, ácidos grasos y aminoácidos se acumulan en el endospermo. Además, en esta etapa las semillas denominadas ortodoxas pierden hasta el 95% del contenido de humedad y entran en latencia para mantener su viabilidad en condiciones ambientales fuertemente fluctuantes. Luego, en la germinación se movilizan y degradan las moléculas que sirven como fuente de energía. Esta etapa está marcada por la ruptura de la testa y el alargamiento de la radícula, para lo cual, el metabolismo de la pared celular es esencial. Tras la germinación, el establecimiento de plántulas requiere de la apertura, el reverdecimiento y la expansión de los cotiledones para dejar de emplear los nutrientes presentes en el endospermo y convertirse en un ser autótrofo (Rosental *et al.*, 2016; Smolikova *et al.*, 2020; Tognacca & Botto, 2021).

Esta caracterización fisiológica de semillas del género *Ribes* está compuesta por ensayos de desinfección, de viabilidad, del efecto de la temperatura y del ácido giberélico en la germinación. El proceso de obtención de plántulas viables, requiere que la semilla tenga tejidos vivos y capaces de reaccionar a estímulos externos. La viabilidad es la capacidad que tiene la semilla para germinar y producir plantas en condiciones adecuadas (Mattana *et al.*, 2014). La viabilidad consiste en determinar potencialmente la máxima germinación de un lote. La viabilidad se determina a través del porcentaje de semillas germinadas en una muestra sometida a pruebas de coloración, rayos X o electroconductividad. Los métodos colorimétricos como el tetrazolio o el índigo carmín son métodos rápidos muy usados, ya que permiten acelerar la toma de decisiones en cuanto al manejo de los lotes de semillas (Matías *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2015).

En este estudio, se analizó la viabilidad mediante pruebas colorimétricas con tetrazolio (TTC) al 1% e índigo carmín (IC) al 0,15%. La prueba con TTC reflejó un porcentaje de 60% y 57% de viabilidad para *R. andicola* y *R. ecuadorensis*, respectivamente (figura 13). En cambio, la prueba con IC indicó un porcentaje de viabilidad de 63% y 43%. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Negrón-Ortiz (2018) con *Ribes echinellum* quienes utilizaron 1% de solución de tetrazolio a pH 6.5. Por lo que, ambas pruebas colorimétricas permiten evaluar la viabilidad de las semillas en *Ribes* sp. para el almacenamiento en un banco de semillas.

La prueba de TTC se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas que reducen la sal de tetrazolio (TTC) en los tejidos vivos de la semilla, generando un compuesto indicador de actividad respiratoria de color rojo (trifenil formazan) a diferencia de los tejidos muertos incoloros. La adecuada absorción del tinte requiere de pretratamientos que consisten en colocar las semillas en agua (Cripa *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Semirian & Isolde, 2017) Por otro lado, la prueba de IC diferencia tres categorías: (a) vivos, embriones blancos, (b) muertos, tinción en la radícula o manchas de azul intenso, (c) vitalidad limitada, embriones que no se pueden categorizar por los criterios anteriores (Matías *et al.*, 2004). Pese a que la prueba de IC, no se encuentra en las normas internacionales, ofrece estimaciones comparables a las obtenidas mediante la prueba con tetrazolio. Sin embargo, las dos pruebas requieren de experiencia para reconocer la coloración sin interferencias o sesgo.

Las características de la cubierta exterior de las semillas influyen en la conductividad eléctrica, en la tolerancia a la desecación y la abundancia de picaduras pudiendo afectar a viabilidad. Esto implica que la cubierta afecta las estrategias de conservación, dado que el contenido de humedad es uno de los principales factores que afecta la viabilidad de la semilla durante su almacenamiento. Las semillas de la familia *Grossulariaceae* presentan tolerancia a la desecación, lo que las convierte en candidatas para ser almacenadas. Se debe tomar en cuenta que un elevado porcentaje de humedad es perjudicial al promover el crecimiento de

hongos e insectos en las semillas (Pradhan & Badola, 2012; Negrón-Ortiz, 2018; Castillo *et al.*, 2020).

Por las razones antes mencionadas, durante el ensayo de desinfección, se pretende reducir la presencia de microorganismos bacterianos o fúngicos que compiten con las semillas por los minerales presentes en el medio de cultivo. En la desinfección, se reduce la carga microbiana con ayuda de detergente, etanol 70%, hipoclorito de sodio o pesticidas. En este estudio se encontró que la combinación de detergente al 1% con Tween 20 e hipoclorito de sodio en varias concentraciones (1% y 3%) tiene acción antimicrobiana y antifúngica, así como también, presenta efecto escarificador (figura 8 y 9). Estos resultados concuerdan con los presentados por Pepe y colaboradores (2021), que emplean diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para evaluar el porcentaje de contaminación y mejorar la germinación de semillas.

Otro factor influyente en la germinación es la latencia de la semilla, la cual se rompe en condiciones ambientales favorables. De manera general, el inicio y fin de la latencia depende de las proteínas DOG (proteínas de retraso de la germinación) en conjunto con la proporción de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA). La latencia puede ser física cuando la testa endurecida evita la imbibición, morfológica debido a que el embrión no se ha desarrollado por completo o fisiológica cuando presenta bajos niveles de GA. Un periodo de latencia prolongado permite que la semilla se disperse más en el tiempo y en el espacio para reducir los conflictos de recursos entre madre y descendientes (Smolikova *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2021). Sin embargo, el mecanismo fisiológico y los factores genéticos de la latencia de las semillas aún no se revelan por completo en especies andinas.

En la familia *Grossulariaceae*, se ha estudiado la latencia de especies representativas como *Ribes alpinum* L. y *Ribes uva-crispa* L., así como también la especie endémica de montaña, *Ribes multiflorum* Kit. ex Schult. ssp. *sandalioticum* Arrigoni. Adicionalmente, *R. hudsonianum* Richardson var. *petiolare* (Douglas) Jancz., *R. nevadaense* Kellogg, *R. roezlii*

Regel var. *cruentum* (Greene) Rehder y *R. speciosum* Pursh, especies distribuidas en un gradiente altitudinal de 1300 m en Europa. Estos estudios indican que *Ribes* sp. pueden presentar latencia de tipo morfológico o morfofisiológico con varios niveles de complejidad. Dicha latencia puede ser interrumpida mediante el uso de giberelinas y la exposición a diferentes temperaturas, también llamada estratificación (Mattana *et al.*, 2012; Mattana *et al.*, 2014; Herranz-Ferrer *et al.*, 2020)

Pese a los estudios presentados sobre el género *Ribes*, se desconoce el tipo de latencia de *R. andicola* y *R. ecuadorensis*. Por lo que, en este estudio se emplearon técnicas ante la latencia física, morfológica y morfofisiológica. La latencia se puede romper mecánicamente o por abrasión con soluciones de ácidos fuertes. El uso de ácido sulfúrico al 2%, 10% y 50% por 5 minutos como agente escarificador tiene efectos significativos en *Ribes cereum* al aplicarse en combinación con una estratificación en frío (Rosner *et al.*, 2003). Mientras que el ácido clorhídrico al 50% e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % por 90 minutos, crean una abertura estrecha en el hilio y las regiones extrahiliares para permitir el ingreso de agua (Zhang *et al.*, 2015; Jaganathan *et al.*, 2019). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que el desinfectante NaOCl (1% y 3%) aplicado por 3 y 5 minutos mostró acción escarificadora del 54,70% de semillas de *Ribes andicola* y el 45,83% de semillas de *Ribes ecuadorensis* (figura 10). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la germinación a 20 °C entre semillas intactas y escarificadas con ácido clorhídrico.

Adicionalmente, para interrumpir la posible latencia física se retiró la testa junto con el mucílago de las semillas mediante raspado con pinzas y bisturí. Esto permitió evitar la oxidación de la testa e incrementar la exposición de la semilla a los nutrientes del medio. No obstante, la semilla está envuelta con una estructura denominada mucílago, la cual está compuesta por polisacáridos como pectinas, hemicelulosas y celulosa, dado que tiene capacidad de hidratarse y retener agua para la germinación. Además, brinda protección ante patógenos y pequeños insectos, facilita el paso por el intestino de aves al reducir la fricción

(endozoocoria), permite la adhesión al cuerpo de los animales (epizoocoria) y la permanencia en el suelo (antitelocoria) (Kreitschitz *et al.*, 2021). En este experimento, el control que permaneció con mucílago en agua presentó radícula. Esto sugiere que el tiempo de imbibición en agua permite romper la latencia morfológica. Por lo que, el retirar el mucílago podría presentarse consecuencias negativas en la acumulación de agua.

Dado que el mucílago es una estructura importante en la germinación, una alternativa para evitar la oxidación de la cubierta de la semilla sin tener que retirarlo, es la adición de componentes antioxidantes en el medio. La bibliografía reporta diferentes concentraciones de carbón activado y sacarosa, entre las cuales el carbón activado al 0,3% proporciona mayor crecimiento de raíces y plantas con menos hojas senescentes. Mientras que la suplementación de sacarosa 0,1 M permite el mejor crecimiento de la especie ornamental *Zingiber spectabile* (dos Reis *et al.*, 2017). Al igual que el antioxidante polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 0,5% reduce el contenido de compuestos fenólicos asociados a la oxidación en *Psidium guajava* L (Concepción *et al.*, 2005). La adición de agentes antioxidantes al medio de cultivo podría permitir superar la primera fase de cultivo *in vitro* evitando la oxidación de la testa.

En este estudio, la latencia fisiológica se trató suplementando giberelinas en concentraciones de 125, 250 y 500 mg/L en el medio Murashige y Skoog, en combinación con estratificación en frío. Para lo cual, las semillas fueron expuestas a 4 °C durante dos meses antes de ser sembradas y expuestas al régimen combinado de 20/10 °C, con la finalidad de activar las vías de señalización relacionadas con GA (Smolikova *et al.*, 2020). Durante la germinación, el 17% de las semillas de *Ribes andicola* sembradas en temperatura combinada de 20/10 °C en ausencia de giberelinas rompieron la latencia y germinaron exitosamente hasta formar plántulas (figuras 16 y 17). Estos resultados concuerdan con las pruebas de germinación de semillas de *Ribes echinellum*, en las cuales el 25% logró germinar pese a tener una viabilidad del 60% (Negrón-Ortiz, 2018). No obstante, se ha determinado que la adición de

giberelinas en altas concentraciones directamente al medio, puede tener efecto inhibitorio en el crecimiento de semillas de *Ribes* sp.

La caracterización morfológica y germinativa de las semillas permite sentar las bases del conocimiento acerca de una especie que se pretende almacenar en un banco de genes. La conservación de especies de la familia *Grossulariaceae* en bancos de semillas aporta a la seguridad alimentaria y la restauración de bosques, dado que se interrelacionan con otras plantas en el margen de bosque y con aves frugívoras al ser su fuente de alimento.

Capítulo VI: Conclusiones

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la morfología y germinar semillas de la familia Grossulariaceae en Bosques Andinos del Ecuador, para cumplir este propósito se realizaron análisis de morfología, desinfección, viabilidad y germinación de semillas, que permitieron caracterizar las especies *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadoreense* Jancz. de esta familia y se pudo concluir lo siguiente:

- La recolección de semillas de las especies endémicas de los Bosques Andinos, *Ribes andicola* Jancz. y *Ribes ecuadoreense* Jancz., permite reunir datos morfológicos, de viabilidad y de germinación que sirven como base para el pasaporte de conservación de dichas especies.
- La morfología de las especies estudiadas difiere en cuanto a número y tamaño. *R. ecuadoreense* produce menor número de semillas que *R. andicola*. Las semillas de *R. ecuadoreense* tienen mayor tamaño y mayor masa que las de *R. andicola*. Estos aspectos morfológicos tienen influencia tanto en la dispersión como en la dinámica entre especies.
- El protocolo de desinfección aplicado para la germinación *in vitro* de semillas de *R. andicola* y *R. ecuadoreense* consta de detergente al 1% con Tween 20 durante 3 minutos, en combinación con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos, ya que se evidenció un porcentaje de contaminación de 0%.

- El protocolo de viabilidad para *Ribes* sp. indica que no hay diferencias significativas entre la prueba de tetrazolio (TV1) y la prueba de prueba de índigo carmín (TV2) bajo las mismas condiciones (valor $p= 0,7676$ para *R. andicola* y $0,4766$ para *R. ecuadoreense*), por lo que estas dos pruebas pueden ser empleadas en este tipo de estudio.
- El porcentaje de viabilidad de *R. andicola* es de 60% al 63% para las dos pruebas, TV1 y TV2 respectivamente, mientras que en *R. ecuadoreense* es de 57% y 43% en TV1 y TV2 respectivamente. Por lo tanto, las semillas de *R. andicola* y *R. ecuadoreense* tienen un porcentaje de viabilidad alto.
- El porcentaje de semillas escarificadas se incrementó un 20,26% en semillas de *R. andicola* y un 15,83% en semillas de *R. ecuadoreense* mediante la exposición a hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. Por lo cual, el hipoclorito de sodio tiene potencial como agente escarificador en *Ribes* sp.
- El 17% de semillas de *R. andicola* germinaron exitosamente hasta formar plántulas con el tratamiento de temperatura combinada 20/10 °C y ausencia de giberelinas. Sin embargo, las diferentes concentraciones de ácido giberélico (0, 125, 250 y 500 mg/L) y de temperaturas (5 °C y 20/10 °C) en *R. andicola* y *R. ecuadoreense* no presentaron germinación, posiblemente debido por el tiempo y por las altas concentraciones de giberelina.

Capítulo VII: Recomendaciones

La recolección de material vegetal es primordial para el estudio de semillas. Por lo que, se recomienda recolectar en zonas húmedas, en la línea de bosque nuboso, bajo la protección de árboles, en terrenos inclinados y en zonas bajas al borde del camino. Adicionalmente, se debería recolectar frutos durante distintas épocas del año para expandir los conocimientos acerca de la fenología de estas especies.

Se recomienda que durante la recolección se empleen recipientes sólidos para reducir la pérdida de material vegetal, desinfectar las bayas con hipoclorito de sodio al 1% por 3 minutos, seguido de 3 enjuagues con agua estéril y dejar secar sobre papel toalla previo a su almacenamiento.

En las pruebas de viabilidad por tinción, para extraer los embriones, se recomienda colocar las semillas escarificadas en agua destilada por 3 horas. En caso de no tener éxito, se recomienda teñir las semillas escarificadas, dado que el mucílago interfiere en la visualización de resultados.

En la germinación, se recomienda probar medio semisólido o líquido debido a que se ha observado en campo que las semillas de *Ribes* sp. requieren condiciones de alta humedad para la elongación de la radícula.

No se descarta la posibilidad de que *R. andicola* y *R. ecuadorensis* estén reguladas por una latencia morfofisiológica. Por lo que se requieren más estudios, cuyos tratamientos de germinación sean planificados con un tiempo mayor a 30 días, en combinación con estrategias de estratificación y diversas concentraciones de giberelinas.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abbas, M., Sharma, G., Dambire, C., Marquez, J., Alonso-Blanco, C., Proaño, K., & Holdsworth, M. J. (2022). An oxygen-sensing mechanism for angiosperm adaptation to altitude. *Nature*, 606(7914), 565–569. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04740-y>
- Adetunji, A. E., Sershen, Varghese, B., & Pammenter, N. W. (2020). Effects of inorganic salt solutions on vigour, viability, oxidative metabolism and germination enzymes in aged cabbage and lettuce seeds. *Plants*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/plants9091164>
- Alonso, P., & Iriondo, J. M. (2014). URJC GB dataset: Community-based seed bank of Mediterranean high-mountain and semi-arid plant species at Universidad Rey Juan Carlos (Spain). *PhytoKeys*, 2014(35), 57–72. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.35.6746>
- Al-Turki, T. A., Al-Namazi, A. A., & Masrahi, Y. S. (2019). Conservation of genetic resources for five traditional crops from Jazan, SW Saudi Arabia, at the KACST Gene-Bank. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1626–1632. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.007>
- Ayala Izurieta, J. E., Márquez, C. O., García, V. J., Jara Santillán, C. A., Sisti, J. M., Pasqualotto, N., van Wittenberghe, S., & Delegido, J. (2021). Multi-predictor mapping of soil organic carbon in the alpine tundra: a case study for the central Ecuadorian páramo. *Carbon Balance and Management*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13021-021-00195-2>
- Bawa, K. S., Ingty, T., Revell, L. J., & Shivaprakash, K. N. (2019). Correlated evolution of flower size and seed number in flowering plants (monocotyledons). *Annals of Botany*, 123(1), 181–190. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy154>
- Belmehdi, O., el Harsal, A., Benmoussi, M., Laghmouchi, Y., Skali Senhaji, N., & Abrini, J. (2018). Effect of light, temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.032>

- Blalogue, J. S., Odindo, A. O., Sogbohossou, E. O. D., Sibiya, J., & Achigan-Dako, E. G. (2020). Origin-dependence of variation in seed morphology, mineral composition and germination percentage in *Gynandropsis gynandra* (L.) Briq. accessions from Africa and Asia. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02364-w>
- Bonnesoeur, V., Locatelli, B., Guariguata, M. R., Ochoa-Tocachi, B. F., Vanacker, V., Mao, Z., Stokes, A., & Mathez-Stiefel, S. L. (2019). Impacts of forests and forestation on hydrological services in the Andes: A systematic review. In *Forest Ecology and Management* (Vol. 433, pp. 569–584). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.033>
- Breman, E., Ballesteros, D., Castillo-Lorenzo, E., Cockel, C., Dickie, J., Faruk, A., O'donnell, K., Offord, C. A., Pironon, S., Sharrock, S., & Ulian, T. (2021). Plant diversity conservation challenges and prospects—the perspective of botanic gardens and the millennium seed bank. In *Plants* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants10112371>
- Brück, S. A., Contato, A. G., Gamboa-Trujillo, P., de Oliveira, T. B., Cereia, M., & de Moraes Polizeli, M. de L. T. (2022). Prospection of Psychrotrophic Filamentous Fungi Isolated from the High Andean Paramo Region of Northern Ecuador: Enzymatic Activity and Molecular Identification. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020282>
- Calbi, M., Fajardo-Gutiérrez, F., Posada, J. M., Lücking, R., Brokamp, G., & Borsch, T. (2021). Seeing the wood despite the trees: Exploring human disturbance impact on plant diversity, community structure, and standing biomass in fragmented high Andean forests. *Ecology and Evolution*, 11(5), 2110–2172. <https://doi.org/10.1002/ece3.7182>
- Cardinal-McTeague, W. M., Wurdack, K. J., Sigel, E. M., & Gillespie, L. J. (2019). Seed size evolution and biogeography of *Plukenetia* (Euphorbiaceae), a pantropical genus with traditionally cultivated oilseed species. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1308-9>

- Castillo, N. R., Melgarejo, L. M., & Blair, M. W. (2020). Seed Structural Variability and Germination Capacity in *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00498>
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., & Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*, 26(1), 33–39.
- Cripa, F. B., Freitas, L. C. N. de, Grings, A. C., & Bortolini, M. F. (2014). Tetrazolium test for viability estimation of *Eugenia involucrata* DC. and *Eugenia pyriformis* Cambess. seeds. *Journal of Seed Science*, 36(3), 305–311. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v36n3991>
- Dangles, O., Rabatel, A., Kraemer, M., Zeballos, G., Soruco, A., Jacobsen, D., & Anthelme, F. (2017). Ecosystem sentinels for climate change? Evidence of wetland cover changes over the last 30 years in the tropical Andes. *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175814>
- Dong, W., Xu, C., Cheng, T., Lin, K., & Zhou, S. (2013). Sequencing angiosperm plastid genomes made easy: A complete set of universal primers and a case study on the phylogeny of saxifragales. *Genome Biology and Evolution*, 5(5), 989–997. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt063>
- dos Reis, M. V., Nery, F. C., Prudente, D. D. O., Paiva, P. D. de O., Paiva, R., Freitas, R. T., & Silva, D. P. (2017). Propagação *in vitro* de *Zingiber spectabile*. *Ornamental Horticulture*, 23(3), 270. <https://doi.org/10.14295/oh.v23i3.1035>
- Duque, A., Peña, M. A., Cuesta, F., González-Caro, S., Kennedy, P., Phillips, O. L., Calderón-Loor, M., Blundo, C., Carilla, J., Cayola, L., Farfán-Ríos, W., Fuentes, A., Grau, R., Homeier, J., Loza-Rivera, M. I., Malhi, Y., Malizia, A., Malizia, L., Martínez-Villa, J. A., ... Feeley, K. J. (2021). Mature Andean forests as globally important carbon sinks and future

carbon refuges. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22459-8>

- Fenu, G., Mattana, E., & Bacchetta, G. (2012). Conservation of endemic insular plants: The genus *Ribes* L. (Grossulariaceae) in Sardinia. *ORYX*, 46(2), 219–222.
<https://doi.org/10.1017/S0030605311000809>
- França-Neto, J. de B., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359–366.
<https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- Freire-Fierro, A. (2002). A New Species Of *Ribes* (Grossulariaceae), Along with Notes and A Key to The Ecuadorian Species. *Systematic Botany*, 27(1), 14–18.
<https://doi.org/10.1043/0363-6445-27.1.14>
- Freschet, G. T., Pagès, L., Iversen, C. M., Comas, L. H., Rewald, B., Roumet, C., Klimešová, J., Zadworny, M., Poorter, H., Postma, J. A., Adams, T. S., Bagniewska-Zadworna, A., Bengough, A. G., Blancaflor, E. B., Brunner, I., Cornelissen, J. H. C., Garnier, E., Gessler, A., Hobbie, S. E., ... McCormack, M. L. (2021). A starting guide to root ecology: strengthening ecological concepts and standardising root classification, sampling, processing and trait measurements. In *New Phytologist* (Vol. 232, Issue 3, pp. 973–1122). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/nph.17572>
- Gallia, M. C., Echeverri Del Sarto, J., & Bongiovanni, G. A. (2021). Sustainable and efficient protocols for in vitro germination and antioxidants production from seeds of the endangered species *Araucaria araucana*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00280-6>
- García, V. J., Márquez, C. O., Isenhardt, T. M., Rodríguez, M., Crespo, S. D., & Cifuentes, A. G. (2019). Evaluating the conservation state of the páramo ecosystem: An object-based image analysis and CART algorithm approach for central Ecuador. *Heliyon*, 5(10).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02701>

- Herranz-Ferrer, R., Copete-Carreño, M. Á., Herranz-Sanz, J. M., Copete-Carreño, E., & Ferrandis-Gotor, P. (2020). Different levels of morphophysiological seed dormancy in *Ribes alpinum* and *R. uva-crispa* (Grossulariaceae) facilitate adaptation to differentiated habitats. *Forest Systems*, 29(2), 1–13. <https://doi.org/10.5424/fs/2020292-15932>
- Impe, D., Reitz, J., Köpnick, C., Rolletschek, H., Börner, A., Senula, A., & Nagel, M. (2020). Assessment of Pollen Viability for Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01588>
- Jaganathan, G. K., & Biddick, M. (2021). Experimental Warming Hastens Physical Dormancy Break and Germination in Tropical Fabaceae. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.782706>
- Jaganathan, G. K., Li, J., Biddick, M., Han, K., Song, D., Yang, Y., Han, Y., & Liu, B. (2019). Mechanisms underpinning the onset of seed coat impermeability and dormancy-break in *Astragalus adsurgens*. *Scientific Reports*, 9(1), 9695. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46158-z>
- Jakovac, C. C., Junqueira, A. B., Crouzeilles, R., Peña-Claros, M., Mesquita, R. C. G., & Bongers, F. (2021). The role of land-use history in driving successional pathways and its implications for the restoration of tropical forests. *Biological Reviews*, 96(4), 1114–1134. <https://doi.org/10.1111/brv.12694>
- Jiménez-Rivillas, C., García, J. J., Quijano-Abril, M. A., Daza, J. M., & Morrone, J. J. (2018). A new biogeographical regionalisation of the Páramo biogeographic province. *Australian Systematic Botany*, 31(4), 296–310. <https://doi.org/10.1071/SB18008>
- Klupczyńska, E. A., & Pawłowski, T. A. (2021). Regulation of seed dormancy and germination mechanisms in a changing environment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 3, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22031357>

- Kreitschitz, A., Haase, E., & Gorb, S. N. (2021). The role of mucilage envelope in the endozoochory of selected plant taxa. *The Science of Nature*, 108(1), 2.
<https://doi.org/10.1007/s00114-020-01709-7>
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., & Saxena, P. (2022). In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. In *Plants* (Vol. 11, Issue 4). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/plants11040503>
- Lang, P. L. M., Willems, F. M., Scheepens, J. F., Burbano, H. A., & Bossdorf, O. (2019). Using herbaria to study global environmental change. *New Phytologist*, 221(1), 110–122.
<https://doi.org/10.1111/nph.15401>
- Lázaro, A., & Larrinaga, A. R. (2018). A multi-level test of the seed number/size trade-off in two Scandinavian communities. *PLOS ONE*, 13(7), e0201175.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201175>
- Lazo, P. X., Mosquera, G. M., McDonnell, J. J., & Crespo, P. (2019). The role of vegetation, soils, and precipitation on water storage and hydrological services in Andean Páramo catchments. *Journal of Hydrology*, 572, 805–819.
<https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2019.03.050>
- Longo, M., Saatchi, S., Keller, M., Bowman, K., Ferraz, A., Moorcroft, P. R., Morton, D. C., Bonal, D., Brando, P., Burban, B., Derroire, G., dos-Santos, M. N., Meyer, V., Saleska, S., Trumbore, S., & Vincent, G. (2020). Impacts of Degradation on Water, Energy, and Carbon Cycling of the Amazon Tropical Forests. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 125(8). <https://doi.org/10.1029/2020JG005677>
- López, A., & Sassone, A. B. (2019). The Uses of Herbaria in Botanical Research. A Review Based on Evidence From Argentina. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01363>
- Marrero, P., Padilla, D. P., Valdés, F., & Nogales, M. (2007). Comparison of three chemical tests to assess seed viability: The seed dispersal system of the Macaronesian endemic

- plant *Rubia fruticosa* (Rubiaceae) as an example. *Chemoecology*, 17(1), 47–50.
<https://doi.org/10.1007/s00049-006-0360-x>
- Martín-Gómez, J. J., Porceddu, M., Bacchetta, G., & Cervantes, E. (2022). Seed Morphology in Species from the *Silene mollissima* Aggregate (Caryophyllaceae) by Comparison with Geometric Models. *Plants*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/plants11070901>
- Matías, B., Herrero, N., Jiménez, I., & Peñuelas, J. (2004). Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de tetrazolio e índigo carmín. *Cuadernos de La Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 17, 23–28.
- Mattana, E., Pritchard, H. W., Porceddu, M., Stuppy, W. H., & Bacchetta, G. (2012). Interchangeable effects of gibberellic acid and temperature on embryo growth, seed germination and epicotyl emergence in *Ribes multiflorum* ssp. *sandalioticum* (Grossulariaceae). *Plant Biology*, 14(1), 77–87. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00476.x>
- Mattana, E., Stuppy, W. H., Fraser, R., Waller, J., & Pritchard, H. W. (2014). Dependency of seed dormancy types on embryo traits and environmental conditions in *Ribes* species. *Plant Biology*, 16(4), 740–747. <https://doi.org/10.1111/plb.12115>
- Messeder, J. V. S., Silveira, F. A. O., Cornelissen, T. G., Fuzessy, L. F., & Guerra, T. J. (2021). Frugivory and seed dispersal in a hyperdiverse plant clade and its role as a keystone resource for the Neotropical fauna. *Annals of Botany*, 127(5), 577–595.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcaa189>
- Montoya-Aramburu, M. A., Rodríguez, N., Pérez-Almeida, I., & Marín, C. (2008). Identificación de descriptores morfológicos relevantes para la distinción de variedades y líneas élites de arroz venezolano con fines de protección intelectual. *Agronomía Tropical*, 58(3), 223–232.
- Moreno-Gaona, D., Gil, J., Morales-Puentes, M., & Bravo-Pedraza, W. (2018). Plantas y animales del páramo de rabanal (Ventaquemada, Boyacá). In *Entre plantas y animales:*

- una muestra de la diversidad del DRMI Rabanal (Boyacá) y el piedemonte llanero Sabanalarga (Casanare)*. Universidad de Sucre. <https://doi.org/10.19053/978-958-660-332-4.1>
- Morrone, J. (2018). Evolutionary biogeography of the Andean region. *CRC Press*.
- Negrón-Ortiz, V. (2018). Breeding System, Seed Germination and Recruitment of A Threatened, Southeastern U.S. Endemic, *Ribes echinellum* (Grossulariaceae). *Rhodora*, 120(982), 99–116. <https://doi.org/10.3119/17-25>
- Nowicka, A., Sahu, P. P., Kovacik, M., Weigt, D., Tokarz, B., Krugman, T., & Pecinka, A. (2021). Endopolyploidy Variation in Wild Barley Seeds across Environmental Gradients in Israel. *Genes*, 12(5), 711. <https://doi.org/10.3390/genes12050711>
- Oliveira, F. N. de, Torres, S. B., Nogueira, N. W., & Freitas, R. M. O. de. (2016). Viability of *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto seeds by the tetrazolium test. *Journal of Seed Science*, 38(1), 7–13. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n1153565>
- Pennington, R. T., Lavin, M., Särkinen, T., Lewis, G. P., Klitgaard, B. B., & Hughes, C. E. (2010). Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13783–13787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001317107>
- Pepe, M., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). Machine Learning-Mediated Development and Optimization of Disinfection Protocol and Scarification Method for Improved *In Vitro* Germination of Cannabis Seeds. *Plants*, 10(11), 2397. <https://doi.org/10.3390/plants10112397>
- Peres, S. (2016). Saving the gene pool for the future: Seed banks as archives. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 55, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2015.09.002>
- Perrigo, A., Hoorn, C., & Antonelli, A. (2020). Why mountains matter for biodiversity. *Journal of Biogeography*, 47(2), 315–325. <https://doi.org/10.1111/jbi.13731>

- Peyre, G., Balslev, H., & Font, X. (2018). Phytoregionalisation of the Andean páramo. *PeerJ*, 2018(6). <https://doi.org/10.7717/peerj.4786>
- Pradhan, B. K., & Badola, H. K. (2012). Effect of Storage Conditions and Storage Periods on Seed Germination in Eleven Populations of *Swertia chirayita*: A Critically Endangered Medicinal Herb in Himalaya. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1100/2012/128105>
- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00333-0>
- Rahbek, C., Borregaard, M. K., Antonelli, A., Colwell, R. K., Holt, B. G., Noguez-Bravo, D., Rasmussen, C. M. Ø., Richardson, K., Rosing, M. T., Whittaker, R. J., & Fjeldså, J. (2019). Building mountain biodiversity: Geological and evolutionary processes. *Science*, 365(6458), 1114–1119. <https://doi.org/10.1126/science.aax0151>
- Rahbek, C., Borregaard, M. K., Colwell, R. K., Dalsgaard, B., Holt, B. G., Morueta-Holme, N., Noguez-Bravo, D., Whittaker, R. J., & Fjeldså, J. (2019). Humboldt's enigma: What causes global patterns of mountain biodiversity? *Science*, 365(6458), 1108–1113. <https://doi.org/10.1126/science.aax0149>
- Rodrigues, A. P. M. dos S., Mendonça Júnior, A. F. de, Torres, S. B., Nogueira, N. W., & Freitas, R. M. O. de. (2015). Tetrazolium test for evaluation of the physiological quality of seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA*, 46(3). <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150048>
- Romoleroux, K., Cárate Tandalla, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2016). *Plantas Vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi* (Primera edición).
- Roque Marca, N., López, R. P., & Naoki, K. (2021). Effect of shade and precipitation on germination and seedling establishment of dominant plant species in an Andean arid

region, the Bolivian Prepuna. *PLOS ONE*, 16(3), e0248619.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248619>

Rosental, L., Perelman, A., Nevo, N., Toubiana, D., Samani, T., Batushansky, A., Sikron, N., Saranga, Y., & Fait, A. (2016). Environmental and genetic effects on tomato seed metabolic balance and its association with germination vigor. *BMC Genomics*, 17(1), 1047. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3376-9>

Rosner, L. S., Harrington, J. T., Dreesen, D. R., & Murray, L. (2003). Sulfuric Acid Scarification of Wax Currant Seeds from New Mexico. *Native Plants Journal*, 4(1), 65–71. <https://doi.org/10.3368/npj.4.1.65>

Semirian, C. A., & Isolde, D. K. F. (2017). Seed quality evaluation by tetrazolium staining during a desiccation study of the recalcitrant seeds of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa surinamensis* Miq. - Meliaceae. *African Journal of Agricultural Research*.

Sinkovič, L., Pipan, B., Sinkovič, E., & Meglič, V. (2019). Morphological Seed Characterization of Common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Runner (*Phaseolus coccineus* L.) Bean Germplasm: A Slovenian Gene Bank Example. *BioMed Research International*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/6376948>

Smolikova, G., Leonova, T., Vashurina, N., Frolov, A., & Medvedev, S. (2020). Desiccation Tolerance as the Basis of Long-Term Seed Viability. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 101. <https://doi.org/10.3390/ijms22010101>

Soltani, A., Walter, K. A., Wiersma, A. T., Santiago, J. P., Quiqley, M., Chitwood, D., Porch, T. G., Miklas, P., McClean, P. E., Osorno, J. M., & Lowry, D. B. (2021). The genetics and physiology of seed dormancy, a crucial trait in common bean domestication. *BMC Plant Biology*, 21(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02837-6>

Stanschewski, C. S., Rey, E., Fiene, G., Craine, E. B., Wellman, G., Melino, V. J., Patiranage, D. S. R., Johansen, K., Schmöckel, S. M., Bertero, D., Oakey, H., Colque-Little, C., Afzal, I., Raubach, S., Miller, N., Streich, J., Amby, D. B., Emrani, N., Warmington, M., ... Tester,

- M. (2021). Quinoa phenotyping methodologies: An international consensus. In *Plants* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10091759>
- Tapia-Armijos, M. F., Homeier, J., Espinosa, C. I., Leuschner, C., & de La Cruz, M. (2015). Deforestation and forest fragmentation in south Ecuador since the 1970s - Losing a hotspot of biodiversity. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133701>
- Tian, X., Li, S., Zeng, Q., Huang, W., Liu, X., & Song, S. (2019). Relationship between loss of desiccation tolerance and programmed cell death (PCD) in mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *PLoS ONE*, *14*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218513>
- Tognacca, R. S., & Botto, J. F. (2021). Post-transcriptional regulation of seed dormancy and germination: Current understanding and future directions. *Plant Communications*, *2*(4), 100169. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100169>
- Vargas-Ríos, O. (2022). *Bases ecológicas y sociales para la restauración de los páramos* (O. Vargas-Ríos, Ed.).
- Villegas-Retana, S. A., & Chavarría-Soto, M. (2016). Morfometría foliar y clorofila de *Piper reticulatum* (Piperaceae) en luz y sombra en la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University*, *8*(2), 255–258.
- Wang, L., Liang, J., Sa, W., & Wang, L. (2021). Sequencing and comparative analysis of the chloroplast genome of *Ribes odoratum* provide insights for marker development and phylogenetics in *Ribes*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *27*(1), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00932-4>
- Weigend, M. (2004). Additional observations on the biogeography of the Amotape-Huancabamba zone in Northern Peru: Defining the South-Eastern limits. *Rev. Peru. Biol.*, *11*(2), 127–134.
- Weigend, M., Cano, A., & Rodríguez, E. (2005). New species and new records of the flora in Amotape-Huancabamba Zone: Endemics and biogeographic limits. *Rev. Peru. Biol.*, *12*(2), 249–274.

- Weigend, M., Mohr, O., & Motley, T. J. (2002). Phylogeny and classification of the genus *Ribes* (Grossulariaceae) based on 5S-NTS sequences and morphological and anatomical data. *Botanische Jahrbücher Für Systematik, Pflanzengeschichte Und Pflanzengeographie*, 124(2), 163–182. <https://doi.org/10.1127/0006-8152/2002/0124-0163>
- Wilkus, E. L., Berny Mier y Teran, J. C., Mukankusi, C. M., & Gepts, P. (2018). Genetic Patterns of Common-Bean Seed Acquisition and Early-Stage Adoption Among Farmer Groups in Western Uganda. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00586>
- Wu, J.-F., Jia, D.-R., Liu, R.-J., Zhou, Z.-L., Wang, L.-L., Chen, M.-Y., Meng, L.-H., & Duan, Y.-W. (2022). Multiple lines of evidence supports the two varieties of *Halenia elliptica* (Gentianaceae) as two species. *Plant Diversity*, 44(3), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.09.004>
- Yasin, M., & Andreasen, C. (2016). Effect of reduced oxygen concentration on the germination behavior of vegetable seeds. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57(5), 453–461. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0170-1>
- Young, K. R., & León, B. (2007). Tree-line changes along the Andes: Implications of spatial patterns and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1478), 263–272. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1986>
- Zhang, Y.-Y., Wu, K.-L., Zhang, J.-X., Deng, R.-F., Duan, J., Teixeira da Silva, J. A., Huang, W.-C., & Zeng, S.-J. (2015). Embryo development in association with asymbiotic seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu. *Scientific Reports*, 5(1), 16356. <https://doi.org/10.1038/srep16356>

Apéndices