



Establecimiento *in vitro* de *Draba obovata* Benth. con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana

Cañadas Rivadeneira, Andrea Estefania

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Jadán Guerrero Mónica Beatriz Ph.D.

25 de agosto de 2022



Tesis Draba Andrea Cañadas.docx

Scanned on: 15:51 July 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	157
Words with Minor Changes	106
Paraphrased Words	383
Omitted Words	1322



Generado por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “Establecimiento *in vitro* de *Draba obovata* Benth. con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana” fue realizado por la señorita **Cañadas Rivadeneira Andrea Estefania**; 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, 28 de julio de 2022



Firmado electrónicamente por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO

.....
Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.
C. I. 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cañadas Rivadeneira Andrea Estefania**, con cédula de ciudadanía n° 1721892576, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Establecimiento *in vitro* de *Draba obovata* Benth. con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Artesana”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de julio de 2022

.....
Cañadas Rivadeneira Andrea Estefania
C.I.: 1721892576



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Cañadas Rivadeneira Andrea Estefania**, con cédula de ciudadanía n° 1721892576, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Establecimiento *in vitro* de *Draba obovata* Benth. con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de julio de 2022

.....
Cañadas Rivadeneira Andrea Estefania

C.I.: 1721892576

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo de investigación a mi familia por ser mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis padres Angélica y Danilo que con amor, apoyo y dedicación me han guiado para alcanzar mis metas y logros.

A mi hermana Dayanna que con su cariño y tenacidad llena mi vida de felicidad y es un ejemplo a seguir para mí.

A mi abuelita Bertha que con sus palabras llenas de sabiduría me motivaron a seguir adelante y perseguir mis anhelos.

A mis tíos, tías, primos y primas quiénes me han brindado su mano en los momentos más difíciles.

A mis amigos y amigas que llenan de alegría y de anécdotas a mi vida.

Agradecimiento

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

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

A mi codirectora María Claudia Segovia, Ph.D. le agradezco por su guía y por estar pendiente del proceso para el exitoso desarrollo del presente trabajo.

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

Un merecido agradecimiento al FONAG por el apoyo financiero, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y a la Universidad de las Fuerzas Armadas por permitirme el uso de las instalaciones para el desarrollo del trabajo de titulación.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes.

Índice de contenidos

Resultado de análisis de Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	10
Índice de figuras	11
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción	15
Planteamiento del Problema	15
Justificación del problema	16
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Hipótesis	19
Capítulo II: Marco Teórico	20
Páramos	20
Generalidades	20
Tipos	21
Importancia	22
Problemática ambiental	24
Páramos en el Ecuador	25
Clima	26
Suelo	26
Vegetación	27
Área de Conservación Hídrica Artesana	31
Familia Brassicaceae	32
Genero Draba	33
Especie Draba obovata Benth.	34
Cultivo in vitro	40
Generalidades	40

Importancia	42
Etapas	43
Latencia de semillas	44
Tipos de Latencia	45
Tratamientos pre germinativos	45
Germinación in vitro	46
Capítulo III: Materiales y Métodos	48
Localización Geográfica	48
Fase de Campo	48
Obtención del Material Vegetal	48
Fase de Laboratorio	50
Etapa de Desinfección del Material Vegetal	50
Etapa de Introducción de Semillas	51
Etapa de Germinación de Semillas	51
Etapa de Multiplicación	51
Etapa de Enraizamiento	52
Análisis Estadístico	53
Etapa de Desinfección del Material Vegetal	53
Etapa de Germinación de Semillas	54
Etapa de Multiplicación	56
Etapa de Enraizamiento	57
Capítulo IV: Resultados	59
Etapa de Desinfección del Material Vegetal	59
Porcentaje de Contaminación	59
Porcentaje de Oxidación	64
Etapa de Germinación de Semillas	68
Porcentaje de Germinación	68
Etapa de Multiplicación	70
Número de brotes	70
Longitud del tallo	74
Etapa de Enraizamiento	75
Porcentaje de plantas que presentan raíces	75
Capítulo V: Discusión	80
Etapa de Desinfección del Material Vegetal	80
Porcentaje de Contaminación	80
Porcentaje de Oxidación	82
Etapa de Germinación de Semillas	84

	10
Porcentaje de Germinación	84
Etapa de Multiplicación	87
Número de brotes	87
Longitud del tallo	89
Etapa de Enraizamiento	90
Porcentaje de enraizamiento	90
Capítulo VI: Conclusiones	94
Capítulo VII: Recomendaciones	95
Capítulo VIII: Referencias Bibliográficas	96

Índice de tablas

Tabla 1 Familias de plantas con mayor número de especies endémicas en los páramos ecuatorianos	28
Tabla 2 Géneros de plantas con mayor número de especies endémicas en los páramos ecuatorianos	29
Tabla 3 Taxonomía de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	36
Tabla 4 Ventajas y Desventajas del cultivo de tejidos vegetales	41
Tabla 5 Ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE	48
Tabla 6 Ubicación del Área de conservación hídrica Antisana	49
Tabla 7 Tratamientos de desinfección para las semillas de <i>Draba obovata</i> Benth.	53
Tabla 8 Tratamientos de germinación para las semillas de <i>Draba obovata</i> Benth.	55
Tabla 9 Tratamientos de multiplicación para <i>Draba obovata</i> Benth.	56
Tabla 10 Tratamientos de enraizamiento para <i>Draba obovata</i> Benth.	57
Tabla 11 Porcentaje de contaminación en las semillas de <i>Draba obovata</i> Benth. según el tratamiento aplicado	59
Tabla 12 ANOVA para la variable porcentaje de contaminación	63

Tabla 13 Porcentaje de oxidación en las semillas de <i>Draba obovata</i> Benth. según el tratamiento aplicado	65
Tabla 14 ANOVA para la variable porcentaje de oxidación	67
Tabla 15 ANOVA para la variable porcentaje de germinación	69
Tabla 16 ANOVA para la variable número de brotes	71
Tabla 17 ANOVA para la variable longitud del tallo	74
Tabla 18 ANOVA para la variable porcentaje de plantas que presentan raíces	76

Índice de figuras

Figura 1 Formas de vegetación encontradas en los páramos ecuatorianos	27
Figura 2 Mapa de ubicación del Área de Conservación Hídrica Antisana	32
Figura 3 Mapa de distribución de <i>Draba obovata</i> Benth. en el Ecuador	34
Figura 4 Fotografía de la especie <i>Draba obovata</i> Benth. en los páramos del Distrito Metropolitano de Quito	35
Figura 5 Hojas de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	37
Figura 6 Inflorescencias de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	38
Figura 7 Fruto de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	39
Figura 8 Semillas de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	40
Figura 9 Fotografías de la especie <i>Draba obovata</i> Benth. en el Área de conservación hídrica Antisana	49
Figura 10 Proceso de desinfección de semillas de la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	50
Figura 11 Proceso de multiplicación en la especie <i>Draba obovata</i> Benth.	52
Figura 12 Interacción entre los factores concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo para la variable porcentaje de contaminación	60
Figura 13 Contaminación por Bacteria y Hongo en las semillas de <i>Draba obovata</i> Benth.	61

	12
Figura 14 Semillas contaminadas y no contaminadas de <i>Draba obovata</i> Benth.	62
Figura 15 Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de contaminación	64
Figura 16 Interacción entre los factores concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo para la variable porcentaje de oxidación	66
Figura 17 Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de oxidación	68
Figura 18 Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de germinación	69
Figura 19 Germinación de semillas de <i>Draba obovata</i> Benth. en cada tratamiento aplicado	70
Figura 20 Subconjuntos obtenidos para la variable número de brotes	72
Figura 21 Desarrollo de los segmentos de tallo de <i>Draba obovata</i> Benth. en cada tratamiento	73
Figura 22 Subconjuntos obtenidos para la variable longitud de tallo	75
Figura 23 Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de plantas que presentan raíces	77
Figura 24 Desarrollo de raíces en plantas de <i>Draba obovata</i> Benth. en cada tratamiento	78
Figura 25 Desarrollo de raíces en plantas de <i>Draba obovata</i> Benth. aplicando el tratamiento E2	79

Resumen

Los páramos son ecosistemas donde se puede encontrar una gran biodiversidad de especies vegetales endémicas que se encuentran amenazadas, debido a la vulnerabilidad de los páramos a la acción antrópica y efectos del cambio climático. Una de ellas, la especie *Draba obovata* Benth. que se encuentra como especie casi amenazada debido a la degradación del suelo. La preservación de esta especie es fundamental debido a su vulnerabilidad, sin embargo, su baja viabilidad de propagación natural dificulta las técnicas de restauración. El presente estudio tiene como objetivo establecer *in vitro* la planta *Draba obovata* Benth. para futuros procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana. Luego de evaluar las variables de las etapas de desinfección, germinación, multiplicación y enraizamiento, los resultados mostraron que el mejor tratamiento de desinfección para las semillas fue con una concentración de 2.5% de hipoclorito de sodio y un tiempo de inmersión de 10 minutos, con un porcentaje de contaminación y oxidación del 0%. Por otro lado, el mejor tratamiento de germinación corresponde al medio MS al 100% suplementado con 30 g/L de sacarosa, con un porcentaje de germinación de 86.67%. Además, el mejor tratamiento para la multiplicación a partir de segmentos de tallo, corresponde al medio MS suplementado con 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, con un total de 3.13 brotes por explante. Finalmente, el mejor tratamiento para el enraizamiento corresponde al medio MS suplementado con 0.5 mg/L de AIA, con un porcentaje de explantes enraizados de 66.67%.

Palabras clave: páramo, antrópica, endémica, preservación

Abstract

The paramos are ecosystems where you can find a great biodiversity of endemic plant species that are threatened due to the vulnerability of the paramos to anthropogenic action and effects of climate change. One of them, the species *Draba obovata* Benth, is almost threatened due to soil degradation. The preservation of this species is fundamental due to its vulnerability; however, its low viability of natural propagation makes restoration techniques difficult. The present study aims to establish in vitro the plant *Draba obovata* Benth. for future ecological restoration processes in the Área de Conservación Hídrica Antisana. After evaluating the variables of the disinfection, germination, multiplication and rooting stages, the results showed that the best disinfection treatment for the seeds was with a concentration of 2.5% sodium hypochlorite and an immersion time of 10 minutes, with a contamination and oxidation percentage of 0%. On the other hand, the best germination treatment corresponds to the 100% MS medium supplemented with 30 g/L sucrose, with a germination percentage of 86.67%. In addition, the best treatment for multiplication from stem segments corresponds to MS medium supplemented with 3 mg/L BAP and 1 mg/L AIA, with 3.13 shoots per explant. Finally, the best treatment for rooting corresponds to the MS medium supplemented with 0.5 mg/L of AIA, with a percentage of rooted explants of 66.67%.

Key words: paramo, anthropic, endemic, preservation

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del Problema

Los suelos de páramo son altamente vulnerables a la acción antrópica y a los efectos del cambio climático con amenazas de erosión y desertificación, el ecosistema de páramo pierde su integridad ecológica como resultado de la eliminación de flora sensible a las quemadas y al pisoteo. Los páramos deben ser protegidos y conservados, por lo tanto, es necesario acordar políticas que limiten su uso a las funciones propias de conservar su biodiversidad, mantener las regulaciones hídricas y ofrecer belleza paisajística. En el Ecuador algunas zonas de páramo han sido forestadas y reforestadas con variedades exóticas, lo que ha contribuido también con el deterioro de este ecosistema, al igual que la pérdida de especies de flora y fauna propias del páramo, la desertificación y erosión del suelo, la pérdida de vertientes naturales, entre otras (Gómez, 2005).

Los eventos que alteran los páramos, conocidos como disturbios, incluyen las quemadas, el pastoreo continuo, minería, agricultura, entre otros. Los disturbios pueden ser tanto naturales o antrópicos, los naturales son los provocados por la naturaleza como incendios, terremotos, heladas, huracanes e inundaciones. Mientras que, los antrópicos son los provocados por las personas como la tala, quemadas y sobrepastoreo. Estos disturbios afectan a las plantas, que son parte de la cobertura vegetal de estos ecosistemas. Con la pérdida de esta cobertura vegetal, el suelo se erosiona, desgasta y empobrece, perdiendo su capacidad de retención y regularización del agua (Salgado & Cárete, 2010).

Teniendo en cuenta esta pérdida de especies vegetales, la protección de plantas endémicas y nativas del país es indispensable, se estima que existen especies vulnerables o en peligro de extinción, las cuales aún no han sido descritas o han sido escasamente estudiadas, se cree que algunas de estas podrían presentar propiedades farmacológicas útiles por lo que su conservación se convierte en una prioridad (Mora, 2008). La extinción de especies endémicas, consecuencia de la sobre explotación de los recursos naturales,

ocasiona un impacto negativo en el medio ambiente. El suelo termina degradándose debido a la modificación de los hábitats, la introducción y propagación de especies exóticas invasoras y fragmentación de bosques (Estrella, 2003).

Las técnicas de restauración ecológica intentan recuperar los ecosistemas que están dañados gravemente con el objetivo de que el suelo vuelva a cumplir con sus funciones de regulación y almacenamiento del agua (Vargas & Velasco, 2011). La recuperación de un ecosistema de forma exitosa dependerá netamente de los conocimientos que se tengan del mismo, por ejemplo, el estado del ecosistema antes y después del disturbio, las causas por las que se produjo el daño, la interrelación de factores ecológicos, entre otros (Vargas et al., 2010).

La combinación de políticas y tecnologías, con la colaboración estrecha de comunidades locales, permiten tener éxito en la recuperación y restauración de ecosistemas (Vargas et al., 2010). La reintroducción de determinadas especies al ecosistema, es una de las medidas de restauración y recuperación que permite recuperar la cubierta vegetal perdida (GreenFacts, 2021).

Teniendo en cuenta lo mencionado con anterioridad, el presente estudio pretende establecer *in vitro* la planta *Draba obovata* Benth. a partir de semillas recolectadas en el Área de Conservación Hídrica Antisana, para futuros procesos de restauración ecológica en las zonas que presentan desertificación.

Justificación del problema

La vegetación provee de materia orgánica al suelo, para sostenerlo y protegerlo de la compactación y otras consecuencias del mal uso del ecosistema. Las plantas que cubren el suelo capturan el agua de la lluvia y la niebla que posteriormente penetra en el suelo, sin la presencia de esta cobertura vegetal la retención del agua sería imposible (Vargas & Velasco, 2011).

La función principal de los páramos es absorber el agua que recibe de las precipitaciones, actuando como una gran esponja que va administrando el agua y la distribuye a la ciudad, zonas rurales y vegetales (Vargas & Velasco, 2011).

Lamentablemente, es uno de los ecosistemas más frágiles y vulnerables frente al mal manejo por parte del hombre. La quema de la vegetación y el sobrepastoreo provocan una modificación en la composición y estructura vegetal, provocando cambios en el uso del suelo (Hofstede, 1995; Suárez, 2009), el cual pierde su estructura porosa hidrófila (Poulenard et al., 2001).

En los últimos años se ha observado que los páramos han tenido cambios con respecto a su ecología debido a la pérdida de la cobertura vegetal natural del mismo, con consecuencias negativas tales como reducción de la infiltración, aumento de la escorrentía superficial y exposición de la capa del suelo a la radiación del sol, provocando la erosión de este (Buytaert et al., 2006). Con el objetivo de mantener la biodiversidad de los páramos andinos se utilizan estrategias que contribuyen a la restauración de estos y en muchos casos a la protección de estos (Noboa Silva, 2011; Pérez & Valdivieso, 2007).

En el Ecuador la implementación de estrategias de restauración de los páramos andinos es una necesidad debido a la elevada tasa de degradación de estos (Vargas et al., 2010). Se ha iniciado un proceso a largo plazo que tiene como objetivo restaurar la funcionalidad hidrológica de los páramos pertenecientes a la Zona de Conservación del Antisana a través del programa de Recuperación de la Cobertura Vegetal del Fondo para la protección del Agua (FONAG) (Aguirre et al., 2013).

El Área de Conservación Hídrica Antisana posee una gran variedad florística, que se encuentra relacionada con el amplio rango altitudinal que cubre. En las zonas de los páramos altos existe un alto porcentaje de endemismo y se han registrado seis especies pertenecientes a la familia Brassicaceae, Gentianaceae (*Gentianella limoselloides* (Kunth)) y Poaceae (*Calamagrostis ecuadoriensis* Laegaard) (ECOLAP & MAE, 2007).

Una de las especies de la familia Brassicaceae que se encuentra dentro de la categoría de especie casi amenazada es la planta *Draba ovobata* Benth. (Verdezoto, 2017). Esta especie es endémica del Ecuador y pertenece a la zona de la cordillera de los Andes. Su preservación es importante debido a la vulnerabilidad y baja viabilidad de propagación natural que presenta (León et al., 2011).

Establecer una estrategia de preservación y restauración de la especie *Draba ovobata* Benth. mediante propagación tradicional no resulta factible, ya que, no satisface la demanda del cultivo. Por lo que, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* para la micropropagación de esta especie se convierte en una opción viable (Cruz, 2012).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son atractivas para la propagación de especies amenazadas, debido a las altas tasas de multiplicación que presentan y al reducido material de partida que se requiere. Mediante su utilización se busca obtener material vegetal de especies que están destinadas a trabajos de restauración ecológica, introducción y reintroducción (Alegría, 2001). Estas técnicas se han utilizado en un amplio número de especies silvestres y amenazadas que presentan problemas de propagación por métodos convencionales o cuyas poblaciones son bastante reducidas (Quiala et al., 2004).

Objetivos

Objetivo General

Establecer *in vitro* *Draba obovata* Benth. con miras a procesos de restauración ecológica en el Área de Conservación Hídrica Antisana

Objetivos Específicos

- Estandarizar el protocolo de desinfección óptimo para las semillas de *Draba obovata* Benth.
- Establecer el medio de cultivo para la germinación *in vitro* de las semillas de *Draba obovata* Benth.
- Determinar el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Draba obovata* Benth.
- Establecer el medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de los explantes de *Draba obovata* Benth.

Hipótesis

Los protocolos de desinfección, germinación, multiplicación y enraizamiento permiten el establecimiento *in vitro* de *Draba obovata* Benth. a partir de semillas.

Capítulo II: Marco Teórico

Páramos

Generalidades

Los páramos son considerados ecosistemas neotropicales de alta montaña, localizados entre el límite del bosque cerrado y las nieves perpetuas, a altitudes de 3000 y 5000 msnm (Vásconez, 2011). Su función principal es la recolección, regulación, mantención y suministro de agua, por lo que, en los países sudamericanos juegan un papel importante en la gestión de los recursos hídricos (Morocho & Chuncho, 2019).

La palabra páramo procede del latín páramus, que significa llano, refiriéndose a la erosión e infertilidad que se observaba en este tipo de ecosistemas. De igual manera, el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua define al páramo como un terreno sin vegetación y bastante frío. Sin embargo, se sabe que la flora vascular del páramo es sumamente diversa en comparación a otras altas montañas tropicales (Vásconez, 2011). Este tipo de ecosistemas es propio de los Andes del norte y centrales, pero también pueden encontrarse en otras partes del mundo (Cruz, 2009).

Los páramos se caracterizan por ser ecosistemas de alta altitud y encontrarse en el cinturón tropical del planeta. Presentan una estacionalidad diaria, donde el frío es intenso durante las noches y madrugadas, existe una alta radiación ultravioleta y la cobertura vegetal es principalmente del tipo herbácea y hay una escasa presencia de vegetación arbórea (Aguirre et al., 2013).

Estos ecosistemas son los encargados de proveer agua potable de alta calidad y cantidad a muchos poblados andinos, incluidas grandes ciudades. Sin embargo, actualmente el páramo es considerado un parche de vegetación entre pasturas y cultivos. Que ha ido perdiendo sus beneficios debido a su uso frecuente como pasturas para ganadería (Vargas & León, 2022).

La vegetación de los páramos ha desarrollado estrategias adaptativas frente a condiciones abióticas extremas producto de su exposición a variantes de temperatura, cobertura de niebla, baja presión atmosférica y alta radiación (Buytaert et al., 2006). Además, presenta una gran diversidad de plantas, considerada la más grande entre los paisajes alpinos (Hofstede & Llambí, 2019).

En estos ecosistemas también pueden encontrarse un gran número de especies endémicas producto de la radiación, diversificación y aislamiento geográfico (Hughes & Eastwood, 2006). Estas especies se encuentran amenazadas por el uso de las tierras del páramo para la agricultura, incendios provocados, reforestación con especies introducidas y el pastoreo (Jorgensen & Ulloa, 2002).

Tradicionalmente el páramo se puede dividir en tres zonas, que se presentan a continuación:

Subpáramos. Zona considerada como la franja inferior del páramo que sigue a la ocupada por la vegetación arbórea del bosque andino de la región. Es caracterizada por el predominio de cháscales, vegetación arbustiva y de bosques bajos altoandinos (Vásconez, 2011).

Páramos. Zona considerada como la franja intermedia del páramo es caracterizada por vegetación dominante de pajonales y diferentes especies de frailejones (Vásconez, 2011).

Superpáramos. Zona considerada como la franja superior del páramo caracterizada por poca cobertura vegetal y diferentes grados de superficie de suelo desnudo (Vásconez, 2011).

Tipos

Los páramos se han clasificado en función de donde estén localizados y ciertas características del sitio, existiendo cinco tipos, que se presentan a continuación:

Páramos interandinos. Localizados en montañas centrales y delimitados por valles longitudinales paralelos. Este tipo de páramos pueden encontrarse en la cordillera central y algunas islas de los Andes ecuatorianos (Aguirre et al., 2013).

Páramos de exposición oriental. Se localizan en las cumbres del eje oriental Andino y están influenciados por los procesos dinámicos de las selvas y sabanas septentrionales de Sudamérica (Aguirre et al., 2013).

Páramos de exposición occidental. Ubicados en las crestas del eje occidental andino, influenciados por los litorales semisecos y áreas selváticas lluviosas (Aguirre et al., 2013).

Páramos de exposición norte. Localizados en la cresta septentrional de los andes, expuestos a la acción estacional de los vientos alisios y circundados por una ola seca en el norte de Sudamérica (Aguirre et al., 2013).

Páramos de exposición mínima. Situados en cualquiera de los ejes cordilleranos e influenciados por una acción cambiada de diversos factores (Aguirre et al., 2013).

Importancia

Debido a las características que presentan estos ecosistemas, su importancia abarca cuatro aspectos básicos, que se describen a continuación:

Suelo. Los suelos del páramo presentan características especiales como la densidad aparente baja y su fuerte relación con el contenido de carbón orgánico. Al ser suelos con estas características, presentan una estructura abierta y porosa con alta conductividad hidráulica y alta capacidad de retención de agua (Podwojewski & Poulénard, 2006). Por lo que son considerados un gran reservorio de agua inactiva (Buytaert et al., 2006).

Recursos hídricos. Ecosistemas y poblaciones de las zonas bajas de todo el mundo son beneficiados por los recursos hídricos de los páramos. Su capacidad de

producción sostenida, almacenamiento y regulación del agua, los convierten en fuentes confiables de calidad de agua (López et al., 2017). Debido a la gran acumulación de materia orgánica y la morfología de las plantas, los páramos tienen la capacidad de almacenar y regular el agua que reciben de las precipitaciones y del descongelamiento del hielo o nieve. Las precipitaciones en estos ecosistemas suelen ser altas y el consumo de agua es bajo debido a la presencia de pajonales y plantas xerofíticas (Hofstede & Llambí, 2019).

Flora y Fauna. Los páramos tienen gran importancia biológica debido a que albergan una gran cantidad de especies de flora y fauna, con características únicas y excepcionales. Teniendo en cuenta las características de los páramos, las especies tuvieron que adaptarse resultando en una gran variedad de plantas y animales, que no se encuentran en ningún lugar del mundo (Mena-Vásconez et al., 2001).

Estos ecosistemas albergan una gran diversidad de plantas endémicas que se han adaptado a condiciones fisicoquímicas y climáticas. Dentro de las especies encontradas se pueden destacar los pajonales, rosetas, arbustos pequeños y musgos (Hofstede & Llambí, 2019). Con respecto a la fauna, la mayoría de las especies, principalmente mamíferos y aves, utilizan el páramo como corredor o zona de transición. Entre los mamíferos se pueden destacar el oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*), el tapir lanudo (*Tapirus pinchaque*), el venado de páramo (*Mazama rufina*), el conejo de páramo (*Sylvilagus brasiliensis*), entre otros. Además, la diversidad del páramo es alta con respecto a la herpetofauna e invertebrados (Llambí et al., 2012).

Almacenamiento de carbono. Características como las bajas temperaturas, tasas de descomposición bajas, acumulación de materia orgánica y la capacidad de almacenar agua, convierten al páramo en los sumideros más importantes de carbono. Estos ecosistemas ayudan a regular el clima a través de la captura del carbono (Villa et al., 2019).

Social y Cultural. La gente que vive en los páramos es la población más marginada. Ahora, se está buscando una armonía entre la gente y su entorno, entre la

agricultura y el páramo, de tal forma, que exista sustentabilidad entre la tierra y el uso de la tierra. Los páramos proveen beneficios económicos tanto a nivel local como regional, el agua que proveen es la base de la producción andina y debido a las áreas con paisaje, los páramos se consideran un atractivo turístico (Mena-Vásconez et al., 2001).

Problemática ambiental

Los páramos donde la densidad poblacional es alta han sufrido deterioro a lo largo del tiempo, debido a que las poblaciones que habitan en ellos utilizan sus tierras para su sustento económico. Estas tierras se han utilizado para la agricultura, forestación y pastoreo, llevando a convertirse en suelos empobrecidos y erosionados (Román, 2013).

El cambio climático tiene un efecto claro en la temperatura y precipitación dentro de los páramos, provocando cambios en el ciclo hidrológico y redistribución de los recursos hídricos (Yin et al., 2017). Las zonas de alta elevación de los Andes responden de forma rápida al estrés ambiental, por lo que, los efectos del cambio climático se acentúan más (Engler et al., 2011). El aumento de la temperatura anual y el cambio de la frecuencia de precipitaciones, provoca la disminución de la capacidad del páramo para retener el carbono (Curiel et al., 2017).

Por otro lado, los cambios en los usos del suelo y la presencia de sistemas agrícolas provocan erosión siendo esta una amenaza para los páramos. Los cuales empiezan a perder su capacidad de retención, regulación y contenido total de agua, además, existe pérdida por evapotranspiración y movilidad del agua (Mosquera et al., 2016).

La quema y el pastoreo son otros problemas que afectan a los páramos, ocasionando aumentos de la escorrentía y erosión, reducción de la conductividad hidráulica y la formación de suelos que repelen el agua. Tras la labranza, suelos que, con cenizas volcánicas, emergen y provocan escorrentías (Lazo et al., 2019).

La reforestación de los páramos con especies exóticas, como el Pino (*Pinus radiata*) también conduce a un deterioro de los páramos. Hay que tener en cuenta que, debido a las

características de estos ecosistemas, las especies de plantas encontradas son endémicas y pueden sufrir un desplazamiento al momento de la introducción de especies exóticas como el Pino (Buytaert et al., 2006).

La concesión de tierras de páramos para la minería se ha convertido en un problema cada vez mayor. Debido a la fragilidad de los páramos y su baja capacidad de recuperación, cualquier tipo de minería resultaría en un daño irreversible en la red hídrica de los páramos (Beltrán, 2009).

Páramos en el Ecuador

Los páramos en el Ecuador cubren alrededor de 1.250.000 hectáreas, es decir, alrededor del 7% del territorio nacional. En el Ecuador los páramos tienen una altitud promedio de 3500 msnm, sin embargo, tomando en cuenta las condiciones geológicas, climáticas y antrópicas, se pueden encontrar páramos a altitudes de 2800 msnm o por sobre los 4000 msnm (Mena et al., 2001).

Con respecto a la extensión total, Ecuador es el país con más páramos. Estos se encuentran por encima de lo que se conocía como ecosistema de bosques andinos, los cuales en la actualidad se encuentran fuertemente alterados. Existe una zona de transición entre ellos, que se conoce como subpáramo. Marcada por la disminución de altura y densidad de árboles con respecto al bosque andino (Coppus et al., 2001).

Los páramos ecuatorianos no son homogéneos, factores meteorológicos como el suelo, influyen en la vegetación y la formación de diferentes microclimas (Román, 2013). A partir de esto, el páramo ecuatoriano, puede dividirse en tres categorías: páramo inferior, ubicada entre 3200 a 4000 msnm y conocida como zona de pajonal; páramo medio, ubicado entre 4000 a 4500 msnm; y páramo superior, localizado sobre los 4500 msnm (Vásquez, 2011).

Existe otra categorización para los páramos basada en el sistema de Holdridge, según el cual existen dos pisos altitudinales: páramos, localizados sobre los 3900 a 4700

msnm y con temperaturas entre 3 a 6°C; y subpáramos, localizados entre 3000 a 3600 msnm, con rangos de temperatura entre 6 y 12°C (Román, 2013).

Clima

El clima se caracteriza por ser húmedo y frío, con cambios extremos de temperatura, que pueden variar de 30°C a temperaturas bajo 0°C. Por cada 200 m de incremento de altitud, la temperatura puede disminuir 11°C (Afonso et al., 2010). La distribución y frecuencia de las heladas pueden influir en la diversidad de plantas presentes en los diferentes gradientes de vegetación (Mena et al., 2001). A altitudes de 3600 msnm, la temperatura promedio es de 9.32°C en la cordillera occidental, mientras que, en la central es de 8.32°C. Un grado de diferencia, a la misma altura, lo que tiene efectos sobre la vegetación (Román, 2013).

Los patrones de precipitación son bastante complejos, estos pueden variar en dependencia de la elevación, orientación de las cordilleras y posición geográfica en función de las influencias oceánicas. En la zona norte y central del Ecuador, el clima es más seco y está influenciado por masas de aire que vienen desde la planicie amazónica y del oeste correspondiente a la corriente fría de Humboldt (Chuncho, 2019).

Suelo

La compleja geología de los Andes ha llevado a que se desarrollen una gran variabilidad de tipos de suelos. Dentro de los páramos estos son habitualmente húmedos, negros, con pH ácido y alto contenido de materia orgánica. En los páramos del Ecuador, se pueden encontrar dos tipos de suelos, los de origen volcánico y aquellos que no han estado sometidos a actividad volcánica (Espinosa et al., 2018).

En la parte norte del Ecuador son característicos los suelos de cenizas volcánicas, mientras que, en la parte sur, son característicos los suelos que no se encuentran sobre depósitos volcánicos (Podwojewski & Poulenard, 2006). De igual manera, existen diferencias en los suelos, dependiendo de si son parte de la alta o baja montaña. Estas

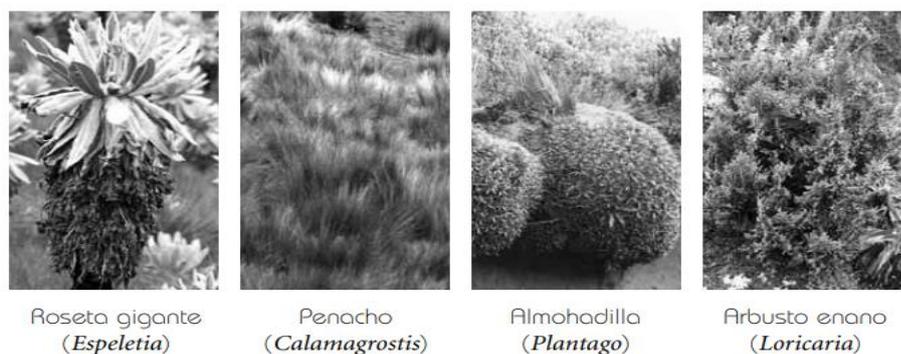
diferencias dependen del clima y la distancia a puntos de emisión volcánica. Por lo tanto, páramos localizados en partes altas, tienen poco espesor, mucha roca y arena, y poca materia orgánica, lo que limita su capacidad de retención de agua, a diferencia de los páramos localizados en partes bajas, cuya capacidad de retención de agua es mayor (Vargas & León, 2022).

Vegetación

Se han registrado en los páramos ecuatorianos un total de 1524 especies de plantas. Estas presentan morfologías características, dentro de las cuales se puede destacar: rosetas gigantes y enanas, penachos de gramíneas, almohadillas, alfombras, arbustos enanos y postrados (Figura 1). Estas plantas comparten características como densa pubescencia y hojas pequeñas, que les han permitido compensar las extremas condiciones de vida en estos ecosistemas (Hedberg, 1994).

Figura 1

Formas de vegetación encontradas en los páramos ecuatorianos



Nota. La figura representa diferentes formas de vegetación encontradas en los páramos ecuatorianos, como es el caso de Roseta gigante, Penacho, Almohadilla y Arbusto enano. Tomado de Páramos. Vásconez, et al. 2011.

En los páramos ecuatorianos se pueden encontrar 659 especies que son endémicas, de las cuales 273 son exclusivas del páramo, y el resto pueden encontrarse en bosques andinos. Las especies que son exclusivas de los páramos se encuentran

distribuidas en 108 géneros y 40 familias (León et al., 2011). Las familias más representativas, con mayor número de especies endémicas, corresponden a Asteraceae y Orchidaceae (Tabla 1). Mientras que, a nivel de género, se pueden destacar los géneros *Gentianella* (Gentianaceae), seguido por *Draba* (Brassicaceae) y *Epidendrum* (Orchidaceae), que presentan una gran cantidad de especies endémicas (Tabla 2) (Yáñez, 2018).

Tabla 1

Familias de plantas con mayor número de especies endémicas en los páramos ecuatorianos

Familia	Número de especies
Asteraceae	45
Orchidaceae	44
Gentianaceae	25
Poaceae	18
Melastomataceae	12
Bromeliaceae	11
Campanulaceae	11
Berberidaceae	8
Brassicaceae	8
Fabaceae	8
Geraniaceae	8
Scrophulariaceae	8
Caryophyllaceae	6
Lycopodiaceae	6

Nota. La tabla representa las familias de plantas con mayor número de especies endémicas encontradas en los páramos ecuatorianos. Adaptado del Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Yáñez. 2018.

Tabla 2

Géneros de plantas con mayor número de especies endémicas en los páramos ecuatorianos

Género	Número de especies
<i>Gentianella</i> (Gentianaceae)	20
<i>Draba</i> (Brassicaceae)	11
<i>Epidendrum</i> (Orchidaceae)	10
<i>Lysipomia</i> (Campanulaceae)	9
<i>Berberis</i> (Berberidaceae)	8
<i>Puya</i> (Bromeliaceae)	8
<i>Geranium</i> (Geraniaceae)	8
<i>Brachyotum</i> (Melastomataceae)	8
<i>Lepanthes</i> (Orchidaceae)	8
<i>Gynoxys</i> (Asteraceae)	6
<i>Lupinus</i> (Fabaceae)	6

Nota. La tabla representa los géneros de plantas con mayor número de especies endémicas encontradas en los páramos ecuatorianos. Adaptado del Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Yáñez. 2018.

En la zona de transición entre el bosque andino y el páramo, se pueden encontrar una combinación de árboles, que disminuyen en tamaño conforme aumenta la altitud, y también arbustos. Géneros arbóreos representativos son: *Oreopanax*, *Gynoxys*, *Buddleja*, *Weinmannia*, *Escallonia*, *Miconia*, *Polylepis* y *Hesperomeles*. Mientras que, dentro de los géneros arbustivos representativos se tiene: *Calceolaria*, *Chuquiraga*, *Diplostegium*, *Loricaria*, *Hypericum*, *Bejaria*, *Cavendishia*, *Brachyotum*, *Monnina* y *Rubus* (Mena et al., 2001).

Dentro del páramo propiamente dicho, se puede observar una cobertura de vegetación continua y formada principalmente por pajonales pertenecientes a los géneros *Calamagrostis* y *Festuca*. También se desarrollan rosetas gigantes, conocidas comúnmente como frailejones y pertenecientes a los géneros *Puya* y *Blechnum loxense* (Chuncho, 2019).

El páramo alto o conocido también como subpáramo, se caracteriza por la presencia de suelos rocosos, gruesos y arenosos, bajo un tenue manto de nieve. En esta franja la temperatura es mucho menor, los suelos son más pobres y existe mayor radiación. Especies características de esta franja son *Azorella pedunculata*, *Culcitium canescens*, *Xenophyllum rigidum*, *Pernettya prostrata*, *Lupinus alopecuroides*, *Nototriche ecuadoriensis*, *Stipa ichu*, *Ephedra americana* y *Ephedra rupestris*. También, pueden encontrarse varias especies de los géneros *Draba*, *Aciachne*, *Agrostis*, *Calamagrostis* y *Poa* (Mena et al., 2001).

El 75% de las especies endémicas de los páramos ecuatorianos se encuentran amenazadas y de este porcentaje, solamente el 48%, ha sido registrado dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador (Cruz, 2009). De ahí, se ha determinado que el 9.5% se hallan en peligro crítico, el 27.8% en peligro y el 40.7% son vulnerables (Yáñez, 2018).

El ser humano es el causante de las principales amenazas para las plantas endémicas de los páramos ecuatorianos. La quema, el avance de la frontera agrícola, reforestación con especies introducidas, ganadería y sobrepastoreo, representan el mayor riesgo para las plantas endémicas (Yáñez, 2018). Pero también eventos naturales, tales como, erupciones volcánicas, son una amenaza inminente para las especies endémicas (Mena et al., 2001).

Existen localidades en el Ecuador, donde la práctica de ciertas actividades que están dañando los páramos ecuatorianos, se realizan de una manera más amigable con el medio

ambiente, como es el caso del Parque Nacional Cajas, sin embargo, mientras mayor es la población humana, mayor es el deterioro de los páramos (vonHagen & Kadereit, 2003).

Área de Conservación Hídrica Antisana

El Área de Conservación Hídrica Antisana con una extensión de 8437.03 hectáreas, se encuentra ubicada entre las provincias de Pichincha y Napo. El mayor porcentaje del área, 77.09%, se encuentra en la provincia del Napo y el resto, 22.91%, se encuentra en la provincia de Pichincha. Su altitud se encuentra desde los 3720 hasta los 4640 msnm (FONAG, 2008).

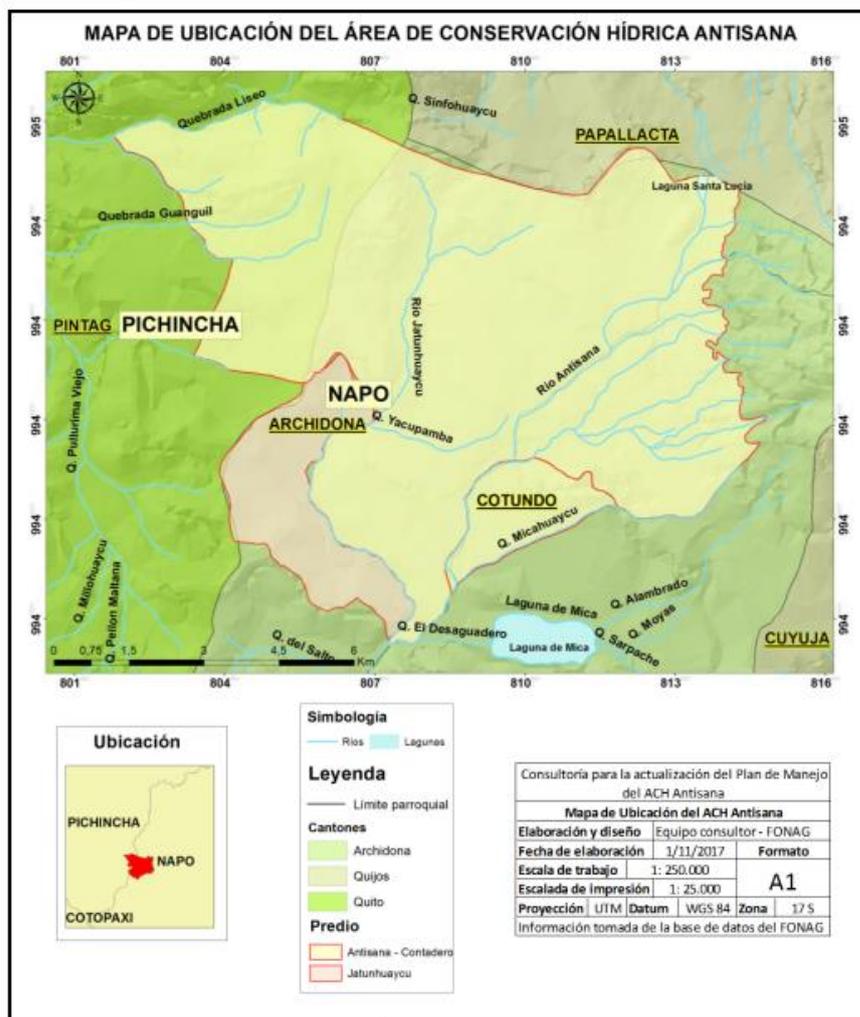
El Antisana es uno de los mayores proveedores de agua para Quito, considerando esto se buscó proteger el área, en un trabajo conjunto realizado por el Ministerio del Ambiente, el Fondo para la Protección del Agua (FONAG) y la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento de Quito (EPMAPS) (Cardona, 2021).

Inicialmente formaba parte del Cacicazgo de Pintag y luego paso a ser parte de la hacienda conocida como “Antisana”. Finalmente, se llegó a un acuerdo con los propietarios de la hacienda, para comprar los predios Antisana – Contadero con el fin de proteger las microcuencas de los ríos Antisana y Jatunhuayco (Cáceres, 2010).

El área comprende tres predios: Antisana, Contadero y Jatunhuayco, de los cuales, los dos primeros pertenecen a la EPMAPS y el último al FONAG. En la Figura 2, se puede observar que el área se encuentra en las parroquias Pintag, Papallacta, Archidona y Cotundo. Siendo en la parroquia Archidona donde se encuentra el mayor porcentaje del área, 55%, seguido de Pintag y Cotundo, con porcentajes de 22.91% y 21.79% (Aguirre et al., 2013).

Figura 2

Mapa de ubicación del Área de Conservación Hídrica Antisana



Nota. En la figura se muestra la ubicación del Área de Conservación Hídrica Antisana. Adaptado de actualización del plan de manejo del Área de Conservación Hídrica Antisana (FONAG, 2008).

Familia Brassicaceae

La familia Brassicaceae, también conocida como Cruciferae, agrupa a un largo número de especies de plantas con importancia económica. Comprende alrededor de 3000 especies agrupadas en 350 géneros, incluyendo un gran número de plantas comestibles.

Dentro de esta familia se pueden encontrar vegetales ampliamente conocidos como el brócoli, coliflor, entre otros; y plantas ornamentales como el alhelí o el aliso (Aires, 2015).

Las plantas de esta familia suelen ser anuales, bienales o perennes y son del tipo herbácea. Presentan hojas con morfología variada, dispuestas de forma alternativa o en forma de roseta. Las flores tienen forma de cruz con cuatro pétalos y sépalos, y de color blanco, amarillo o lavanda. Mientras que, las semillas se encuentran dentro de frutos secos largos y delgados en forma de vaina. Su coloración es anaranjada o marrón oscuro, de superficie lisa o reticulada (Samec & Salopeck-Sondi, 2019). Los tallos son delgados y pueden ser herbáceos o leñosos, estos últimos son comunes en plantas que se desarrollan a grandes altitudes (Monsalve, 2003).

Esta familia presenta una gran cantidad de metabolitos secundarios con sabores característicos y bioactividades. Los más estudiados son los glucosinolatos (GSL), isotiocianatos e indoles. También, se ha encontrado que las plantas de esta familia son ricas y poseen perfiles únicos de compuestos fenólicos, carotenoides y otros grupos como, fitoalexinas, fitoesteroides, terpenos y tocoferoles (Aires, 2015).

Genero *Draba*

Plantas del género *Draba* pertenecen a la familia Brassicaceae, que comprende 999 especies y es el género más grande de la familia Brassicaceae. Se distribuye ampliamente en el Ártico, Subártico, Alpes y regiones montañosas del mundo (Arroyo & Cavieres, 2013). Pueden ser encontradas en América del Norte, Europa, Asia, África, América del Sur, en raras ocasiones han sido identificadas en zonas templadas y a baja altitud (Monsalve, 2003).

Son plantas herbáceas y perennes, aunque también pueden encontrarse plantas anuales y bienales. Las hojas pueden ser simples, enteras o ramificadas. Las flores tienen forma de racimos, formadas por un cáliz de cuatro sépalos, androceo de seis estambres, 4

nectarios laterales y medianos. El fruto es del tipo silícula de forma elíptica u ovalada, con semillas dispuestas en dos series (Bernal et al., 2015).

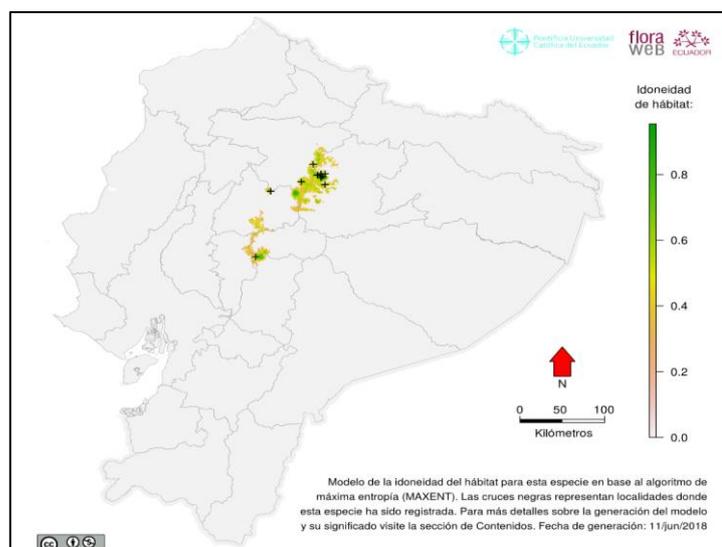
El género *Draba* está muy extendido en la naturaleza en una amplia variedad de hábitats, debido a que las especies de este género son bastante resistentes y se adaptan bien a las condiciones complejas presentes en diferentes hábitats. Las especies pertenecientes a este género varían ampliamente en forma y existen como cojines, mechones, rosetas, alfombras, subarbustos e incluso arbustos (Qasem, 2004).

Especie *Draba obovata* Benth.

Planta endémica del Ecuador se encuentra tanto en el páramo como en el superpáramo, a altitudes de 3500 a 4500 msnm. Esta especie se ha identificado en las provincias de Cotopaxi, Napo, Pichincha y Tungurahua. Es considerada una especie casi amenazada, siendo sus principales amenazas el pastoreo y quemas (León et al., 2011). En la Figura 3, se observa el mapa de distribución de *Draba obovata* Benth. en Ecuador.

Figura 3

*Mapa de distribución de *Draba obovata* Benth. en el Ecuador*



Nota. En la figura se presenta la distribución de la especie *Draba obovata* Benth. en el Ecuador. Tomado de Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Al-Shehbaz, I. León-Yáñez, S. 2017.

Es una especie del tipo herbácea de 3 cm de alto, generalmente son solitarias o se encuentran en grupos pequeños, acaulescentes. Se caracterizan por estar recubiertas con tricomas grises tanto en hojas, flores y frutos. En la Figura 4, se puede observar a la especie *Draba obovata* Benth. (Palacios, 2015).

Figura 4

Fotografía de la especie Draba obovata Benth.



Nota. La figura presenta una fotografía de la especie *Draba obovata* Benth. Tomado de Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito. Palacios, W. 2015.

Taxonomía. En la Tabla 3 se describe la taxonomía de *Draba obovata* Benth.

Tabla 3

Taxonomía de la especie Draba obovata Benth.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Brassicaceae
Tribu	Arabidae
Género	<i>Draba</i>
Especie	<i>Draba obovata</i> Benth.

Nota. En la tabla se presenta las características taxonómicas de la especie *Draba obovata* Benth. Tomado de The IUCN Red List of Threatened Species León-Yáñez & Pitman, 2003.

Hojas. Esta especie presenta hojas basales simples, que pueden estar amontonadas, en forma de roseta o espatuladas. El tamaño normalmente es de 4 x 2 mm. Son hojas carnosas con base truncada y un ápice obtuso – mucronado. Tanto el haz como el envés de las hojas se encuentra recubierto por tricomas de color gris, como se puede observar en la Figura 5 (Palacios, 2015).

Figura 5

Hojas de la especie Draba obovata Benth.



Nota. Fotografía del tipo de hojas de la especie *Draba obovata* Benth. Tomado de Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito. Palacios, W. 2015.

Flores. Esta especie presenta inflorescencias en forma de corimbo terminal y cubiertas de tricomas grisáceos, con un tamaño de 4 mm de largo. El cáliz tiene una coloración verde claro y presenta 4 pétalos traslapados de color amarillo o verde. Presenta seis estambres de color amarillo, como se puede observar en la Figura 6 (Palacios, 2015).

Figura 6

Inflorescencias de la especie Draba obovata Benth.



Nota. Fotografía del tipo de inflorescencia de la especie *Draba obovata* Benth.

Tomado de Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito. Palacios, W. 2015.

Fruto. Esta especie presenta un fruto silicua y de forma ovoide – aplanado. El tamaño es de alrededor 4 x 2 mm y se puede apreciar un gran número de tricomas grises que lo cubren. Las valvas se separan y se puede evidenciar un replo membranoso argénteo, como se puede evidenciar en la Figura 7 (Palacios, 2015).

Figura 7

Fruto de la especie Draba obovata Benth.



Nota. Fotografía del fruto de la especie *Draba obovata* Benth. Tomado de Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito. Palacios, W. 2015.

Semillas. Esta especie presenta semillas biseriadas, sin alas, oblongas, ovaladas u orbiculares, generalmente aplanadas. La cubierta de las semillas es minuciosamente reticulada, no mucilaginosa cuando se humedece y con cotiledones acumbentes, como se puede evidenciar en la Figura 8 (León-Yáñez & Pitman, 2003).

Figura 8

Semillas de la especie Draba obovata Benth.



Nota. Fotografía de semillas de la especie *Draba obovata* Benth. adheridas al replo membranoso. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Cultivo *in vitro****Generalidades***

El cultivo *in vitro* de plantas se define como el conjunto de técnicas que tiene la finalidad de regenerar una planta completa a partir de un explante, parte o porción de la planta, tales como semillas, hojas, tallos, entre otros. Esto es posible debido a la totipotencia que tienen las plantas, que les permite regenerarse ya sea a través de embriogénesis somática u organogénesis (Bhatia S. , 2015).

También conocido como cultivo de tejidos vegetales puede ser definido como el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes en condiciones físicas y químicas definidas de manera *in vitro*. En el año 1902, Gottlieb Haberlandt describió las bases teóricas necesarias para el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales (Vasil, 2014).

El uso del cultivo de tejidos vegetales tiene muchas aplicaciones, sin embargo, la principal es la propagación vegetativa de plantas, la cual ha sido utilizada para todo tipo de plantas, pero aún tiene ciertas limitaciones (Ribas et al., 2000). Una de ellas es la dificultad para imitar las condiciones naturales en las que se desarrolla la planta, humedad, temperatura y fotoperiodo, dentro de un laboratorio (Orquera Delgado, 2013). En la Tabla 4 se puede visualizar algunas ventajas y desventajas del cultivo de tejidos vegetales.

Tabla 4

Ventajas y Desventajas del cultivo de tejidos vegetales

Ventajas	Desventajas
El trabajo de deshierbe, fumigación, riego, entre otros, puede omitirse con el cultivo de tejidos vegetales	Requiere procedimientos altamente especializados y caros
La producción de plantas es independiente de la temporada	Las plantas son dependientes de fuentes nutricionales, las cuales deben ser proporcionadas en el medio de cultivo
Permite obtener una gran cantidad de clones con características de resistencia a ciertas condiciones, libres de virus, con altos niveles nutricionales y con capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios	Las plántulas obtenidas del cultivo de tejidos vegetales son susceptibles a la contaminación y la pérdida de agua, cuando se encuentran en el ambiente externo

Nota. En la tabla se presenta las principales ventajas y desventajas que puede presentar el cultivo de tejidos vegetales. Tomado Plant Tissue Culture. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences (Bhatia S. , 2015).

Los explantes o segmentos de plantas se siembran en medio artificiales bajo condiciones asépticas (Hussain et al., 2012). Los cuales tienen todos los nutrientes

necesarios para el crecimiento de una planta, que incluye macronutrientes, micronutrientes, reguladores de crecimiento, vitaminas, fuentes de carbono y agentes gelificantes (Saad & Elshahed, 2012).

Cuando se requiere realizar propagación vegetativa el medio más utilizado es el medio Murashige y Skoog (MS), el cual ha sido utilizado para varias especies vegetales (Witte et al., 2002). Los medios de cultivo utilizados pueden ser tanto sólidos como líquidos, y además de los componentes de estos, el pH es de suma importancia, el cual debe mantenerse a valores de 5.4 a 5.8. Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en la vía que tomarán los explantes para su desarrollo (Soliman, 2019).

Auxinas, citoquininas y giberelinas, son los reguladores más utilizados en los medios de cultivo y de su cantidad depende el tipo de cultivo establecido. Altas concentraciones de auxinas promueven el desarrollo de raíces, mientras que, altas concentraciones de citoquininas favorecen el desarrollo de brotes. Si las concentraciones de citoquininas y auxinas son equitativas, se favorece el desarrollo de callo, es decir, células indiferenciadas (Hill & Schaller, 2013).

Importancia

La propagación de genotipos seleccionados con altas tasas de multiplicación se puede lograr mediante el cultivo de tejidos vegetales, en un ambiente aséptico con temperatura controlada (Roca et al., 1991). El uso de los explantes o segmentos de plantas, permite reducir los requerimientos de espacios y costos de mano de obra. Por otro lado, los materiales vegetales se pueden mantener *in vitro* por mucho más tiempo con el uso de medios de cultivo de crecimiento lento o mediante métodos de crioconservación (Hussain et al., 2012).

El cultivo de tejidos vegetales ha sido utilizado para la propagación de especies que presentan problemas de propagación por métodos convencionales, con el fin de preservar estas especies, que en muchas ocasiones se encuentran en peligro de extinción

(Sudhersan et al., 2003). Por otro lado, esta técnica también ha sido ampliamente utilizada para recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma vegetal (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010).

Las especies nativas y endémicas, adaptadas únicamente a las condiciones ambientales y climáticas locales, son componentes importantes para la diversidad biológica global. El cultivo de estas especies permite mantener el equilibrio ecológico y la supervivencia de otros individuos, que pueden utilizarlas como alimento. Sin embargo, actualmente muchas de estas especies se encuentran en peligro, debido a las acciones del ser humano (Murillo-Gómez et al., 2014).

El uso del cultivo *in vitro* de especies vegetales abre oportunidades para la propagación y conservación de especies nativas y endémicas en peligro de extinción que presentan problemas de propagación (Sudhersan et al., 2003). Para preservar la variabilidad genética, generalmente se utilizan semillas, las cuales son introducidas *in vitro*, con el fin de obtener plántulas libres de enfermedades y puedan ser utilizadas en un futuro para restauración ecológica de hábitats intervenidos (Praveen, 2022).

Etapas

Etapa 0. Durante esta etapa se procede con la selección de la planta y el tipo de explante, que se utilizará para las etapas posteriores. La planta elegida debe tener las mejores características fenotípicas como tamaño, número de brotes, vigorosidad y no debe presentar enfermedades (Roca et al., 1991).

Etapa 1. En esta etapa se establece un cultivo aséptico, para lo cual es necesario llevar a cabo la desinfección de los explantes con el objetivo de eliminar el mayor porcentaje de contaminantes que pueden afectar el cultivo (Varela, 2018). Dentro del proceso de desinfección se pueden encontrar los siguientes pasos:

- Lavado del material vegetal
- Eliminación de las partes necrosadas de la planta

- Uso de alcohol al 70% durante unos segundos
- Colocación del explante en una solución de hipoclorito de sodio al 1% con un agente tensoactivo como Tween 20- 80% durante 10 a 15 minutos (Mroginski & Roca, 1991).

Etapa 2. En esta etapa se busca obtener la mayor cantidad de brotes a partir de un explante mediante un continuo subcultivo de propágulos. Para este fin, es necesario el uso de reguladores de crecimiento que permitan la inducción a brotes (Varela, 2018). Es importante tener un medio de cultivo que cuente con los requerimientos nutricionales como carbono, vitaminas, minerales, entre otros (Mroginski & Roca, 1991).

Etapa 3. Durante esta etapa se busca la obtención de raíces en los brotes obtenidos con anterioridad. Para este fin, es necesario un crecimiento de los brotes para proceder con la transferencia de estos a un medio de cultivo suplementado con auxinas. Estos brotes deben encontrarse en condiciones adecuadas, es decir sin vitrificación (Varela, 2018).

Etapa 4. En esta etapa se procede a transferir las plántulas obtenidas a un ambiente *ex vitro*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas plántulas se desarrollaron en condiciones asépticas, de alta humedad y baja intensidad de luz, por lo tanto, las hojas no están adaptadas para condiciones externas. Teniendo en cuenta esto, es necesario sacarlas a un medio cerrado, dentro de un invernadero, donde vayan recibiendo los factores externos paulatinamente (Varela, 2018).

Latencia de semillas

La latencia se produce cuando una semilla es incapaz de germinar en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y concentración de gases (Solano Ortiz, 2021).

Dependiendo de la procedencia de las semillas, año de cosecha y el lote de las semillas, la latencia puede variar. Esta puede ir desde una latencia absoluta en donde la semilla no germina bajo ninguna condición; pasando por una latencia intermedia, donde las

semillas pueden germinar bajo ciertas condiciones; a una latencia extrema, donde no existen problemas de germinación (Ramírez-Gill, 2016).

Para que las semillas germinen, ya sea que tengan o no latencia, deben tener condiciones favorables, las cuales varían en dependencia de la especie. Principalmente, estas condiciones incluyen humedad suficiente, temperatura favorable, intercambio de gases y luz adecuada (Pita & Pérez, 2006).

Tipos de Latencia

Latencia exógena. Este tipo de latencia puede deberse a que la cubierta de la semilla es impermeable permitiendo preservar al embrión durante años; a cubiertas que son demasiado duras que impiden la salida del embrión; y a la producción u acumulación de sustancias químicas que inhiben la germinación (Figuroa & Jaksic, 2004).

Latencia endógena. Este tipo de latencia se presenta en semillas cuyos embriones no se han desarrollado por completo. Los embriones pueden ser rudimentarios, los cuales son solamente preembriones embebidos en el endospermo; y no desarrollados, los cuales tienen forma de torpedos que alcanzan un tamaño de la mitad de la cavidad de la semilla (Figuroa & Jaksic, 2004).

Latencia interna. Este tipo de latencia es controlada por tres fenómenos, el primero causado por la semipermeabilidad de las cubiertas de las semillas; el segundo es un letargo presente en el embrión; y el tercero es causado por un mecanismo fisiológico. En el caso del letargo, este puede ser superado utilizando un periodo de enfriamiento en húmedo (Figuroa & Jaksic, 2004).

Tratamientos pre germinativos

Si las semillas presentan latencia se pueden utilizar una serie de técnicas que permiten romper esta latencia, conocidas como tratamientos pre germinativos. Los cuales pueden ser aplicados antes o después del tratamiento de desinfección y cuyo objetivo principal es mejorar la tasa de germinación de las semillas (Díaz-Chuquizuta et al., 2017).

Los métodos pre germinativos más comunes se presentan a continuación:

Estratificación. Cuando la latencia que presenta la semilla es del tipo fisiológico, se puede romper colocando las semillas entre estratos que conservan la humedad como arena, turba y vermiculita. Existen dos tipos, la fría que consiste en colocar las semillas a temperaturas bajas de 4 a 10°C entre 20 a 60 días; y la cálida en donde las semillas se colocan en temperaturas de 20 a 30°C durante 30 a 60 días (MacDonald & Omoruyi, 2003).

Escarificación. Cuando las especies presentan testas duras que impiden la entrada de agua y por ende no se produce la germinación, se puede utilizar la escarificación. Este proceso consiste en romper o alterar mecánicamente la cubierta de la semilla y hacerle permeable a los gases y el agua. También pueden utilizarse métodos químicos en donde las semillas se remojan en ácido sulfúrico durante tiempos breves (MacDonald & Omoruyi, 2003).

Lixiviación. Durante este proceso las semillas se colocan en agua corriente con el fin de remover cualquier tipo de inhibidor en la cubierta. Esto también puede ser utilizado para ablandar la testa. El remojo se realiza entre 12 a 72 horas, y el agua puede ser utilizada a temperatura ambiente o caliente (MacDonald & Omoruyi, 2003).

Hormonas y estimulantes químicos. Ciertas hormonas o estimulantes químicos pueden favorecer a la germinación, como el ácido giberélico, nitrato de potasio, etileno, tiourea, citoquininas, entre otras. Dependiendo de las especies las cantidades y tiempos de exposición pueden variar (MacDonald & Omoruyi, 2003).

Germinación in vitro

La embriogénesis somática indirecta es una técnica dentro del cultivo *in vitro* que permite el desarrollo de individuos a partir de semillas. Por medio de esta técnica se busca aumentar el proceso de crecimiento vegetal de las semillas y del embrión por medio de la aplicación de algunos reguladores de crecimiento (Cortes et al., 2017).

La germinación *in vitro* de semillas trae ventajas sobre la germinación *ex vitro* de las mismas, solucionando casos de inhibición total de la germinación, aumento de la tasa de germinación, reducción del tiempo de germinación y genera uniformidad de semillas germinadas (Encina & Padilla, 1996). Por otro lado, el establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de las semillas proporciona de manera rápida plántulas que sirven de explante para la micropropagación, permite conservar la variabilidad genética natural de las especies vegetales y facilita la germinación de semillas que presentan problemas durante la germinación *ex vitro* (Fay, 1992).

Muchas especies vegetales presentan problemas durante la propagación tradicional debido a que las semillas exhiben dormancia o tienen largos periodos de germinación, y es necesario aplicar tratamientos pre germinativos, introducirlas de manera *in vitro*, o una combinación de ambos (Panchev & Ivanova, 2018). Autores como Roni et al. (2018) han combinado el uso de tratamientos pre germinativos y la germinación *in vitro* para mejorar los tiempos y porcentajes de germinación en la especie vegetal *Eustoma grandiflorum*, la cual presenta problemas durante la germinación *ex vitro*, logrando porcentajes de germinación del 100% en tan solo 6 días.

De igual manera Gómez-Merino et al. (2010) trabajaron con semillas de Heliconias a las cuales sometieron al tratamiento pre germinativo de escarificación y posteriormente fueron sembradas en un medio cultivo. Esto permitió alcanzar porcentajes de germinación de 21.44% en comparación al control donde el porcentaje de germinación fue de 3.04%.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Localización Geográfica

El desarrollo del presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, campus Sangolquí; cuya ubicación se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5

Ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

Provincia	Pichincha
Cantón	Rumiñahui
Ciudad	Sangolquí
Altitud	2510 msnm
Latitud UTM	0°18'53"S
Longitud UTM	78°26'36"O

Nota. La tabla muestra la ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, donde msnm: metros sobre el nivel del mar. S: Sur. O: Oeste.

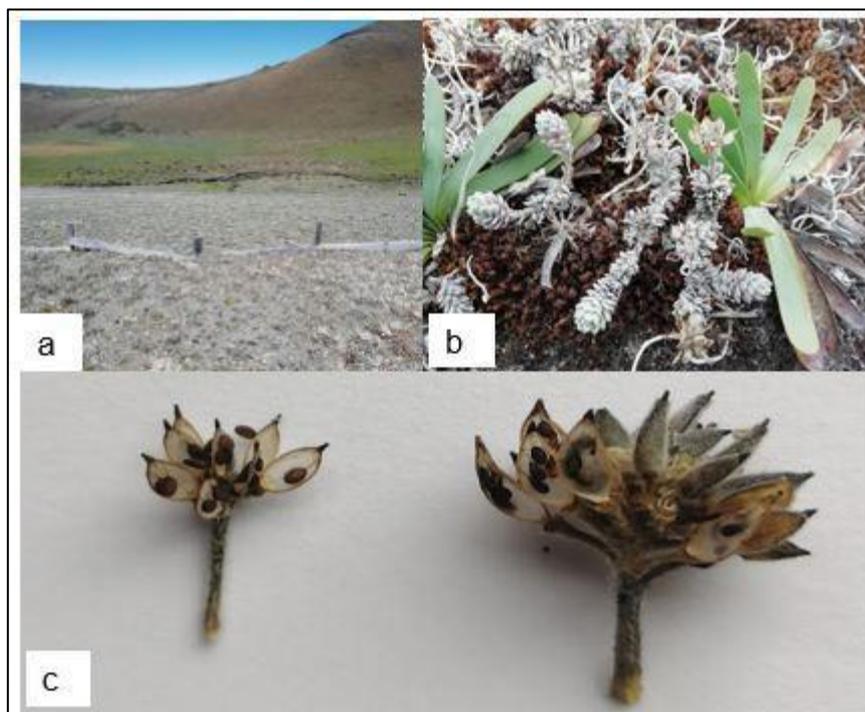
Fase de Campo

Obtención del Material Vegetal

Para la realización del presente proyecto se utilizaron semillas de la planta *Draba obovata* Benth. (Figura 9), recolectadas en el área denominada “Arenal 2” de los predios del Fondo para la Protección del Agua (FONAG) localizados en el Área de Conservación Hídrica Antisana, cuya ubicación se describe en la Tabla 6. Las semillas se recolectaron en fundas de papel con las medidas de asepsia correspondientes, para luego ser transportadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Figura 9

Fotografías de la especie *Draba obovata* Benth. en el Área de conservación hídrica Antisana



Nota. En la figura se presentan diferentes fotografías de la especie *Draba obovata* Benth. localizada en el Área de conservación hídrica Antisana, donde, a) Área de recolección "Arenal 2". b) Especie *Draba obovata* Benth, c) Semillas de *Draba obovata* Benth. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Tabla 6

Ubicación del Área de conservación hídrica Antisana

Provincia	Pichincha y Napo
Altitud	5785 msnm
Latitud UTM	0°28'53"S
Longitud UTM	78°08'27"O

Nota. La tabla muestra la ubicación del Área de conservación hídrica Antisana, donde, msnm: metros sobre el nivel del mar. S: Sur. O: Oeste.

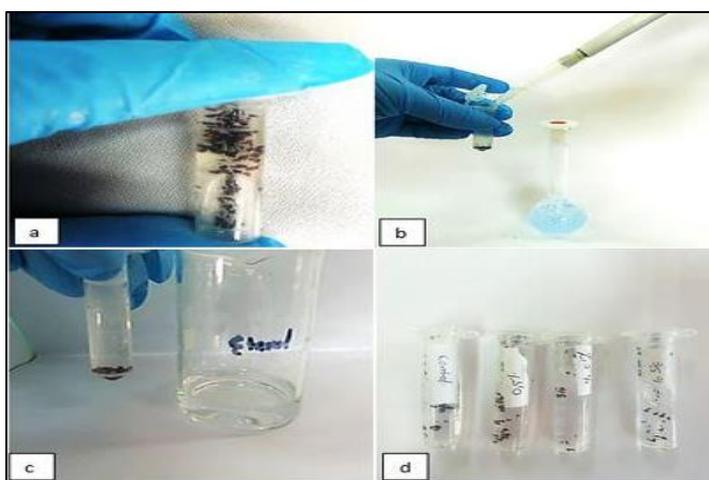
Fase de Laboratorio

Etapa de Desinfección del Material Vegetal

El presente estudio se basó en el protocolo de desinfección propuesto por Zinhari et al. (2017) el cual fue modificado y adaptado para la especie en estudio. Las semillas maduras se extrajeron de las vainas con la ayuda de pinzas y se colocaron en un tubo de 2 mL de capacidad. Se procedió a colocar agua de la llave con la ayuda de una micropipeta y se agitó manualmente durante 5 minutos. Se colocó una solución de detergente al 2% (p/v) durante 15 minutos, seguido de etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto. Se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (0.5%, 2.5% y 3,5%) durante 5 y 10 minutos. El proceso de desinfección puede visualizarse en la Figura 10. Finalmente, dentro de la cámara de flujo laminar marca ESCO, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito de sodio y proceder con el proceso de introducción de las semillas.

Figura 10

Proceso de desinfección de semillas de la especie Draba obovata Benth.



Nota. En la figura se muestran fotografías del proceso de desinfección aplicado a las semillas de la especie *Draba obovata* Benth., donde, a) Semillas en agua de la llave. b) Adición de la solución detergente c) Adición de etanol al 70%. d) Semillas a diferentes concentraciones de NaClO. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Etapas de Introducción de Semillas

Para la introducción de las semillas se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 40 g/L de sacarosa y 7.5 g/L de agar. El pH se ajustó a 5.7. Se dispensó 4 mL de medio en tubos de ensayo de vidrio autoclavable de 10 ml de capacidad. El medio se esterilizó en autoclave marca Tuttnauer (121°C y 15 PSI durante 15 minutos) con el fin de eliminar cualquier tipo de microorganismo.

Etapas de Germinación de Semillas

La germinación de las semillas inicia con la imbibición de estas, es decir, con la entrada de agua en la semilla y se finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula. En el caso de la germinación *in vitro* en condiciones de laboratorio, la rotura posterior de las cubiertas seminales por parte de la radícula se considera como germinación (Pita & Pérez, 2006).

El presente estudio se basó en el protocolo de germinación propuesto por Zinhari et al. (2017) el cual fue modificado y adaptado para la especie en estudio. Para la etapa de germinación de las semillas se aplicó un tratamiento pre germinativo denominado lixiviación que consistió en remojar las semillas en agua corriente caliente durante 24 horas con el objetivo de ablandar la testa. Posteriormente se sembraron en medio de cultivo MS al 100% y al 50% suplementado con 5 g/L de agar y diferentes concentraciones de sacarosa (15 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L y 60 g/L). El pH se ajustó a 5.8. Las condiciones del cuarto incubación fueron 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Etapas de Multiplicación

Una vez determinado el mejor tratamiento de desinfección y germinación, se procedió a multiplicar las plantas robustas *in vitro* de aproximadamente 2 meses de edad obtenidas a partir de las semillas germinadas. Para esta etapa se basó en el protocolo de multiplicación propuesto por Mera (2020) el cual fue modificado. Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a cortar con un bisturí estéril segmentos del tallo de 1 cm. El

proceso de multiplicación puede evidenciarse en la Figura 11. Posteriormente se sembraron en medio de cultivo MS al 100%, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de agar y diferentes concentraciones de las hormonas de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) (0.5 mg/L y 3 mg/L) y Ácido Indol Acético (AIA) (0.3 mg/L, 0.5 mg/L y 1 mg/L). Las condiciones del cuarto incubación fueron 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Figura 11

Proceso de multiplicación en la especie Draba obovata Benth.



Nota. En la figura se muestran fotografías del proceso de multiplicación de la especie *Draba obovata* Benth., donde, a) Plantas robustas provenientes de semillas germinadas de *Draba obovata* Benth. b) Segmentos de tallos obtenidos de plantas robustas c) Segmentos de tallos sembrados en el medio de cultivo. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Etapas de Enraizamiento

Los explantes obtenidos en la etapa de multiplicación fueron sometidos a enraizamiento con el fin de que adquieran un sistema radicular adecuado para que sean completamente autótrofos. Para lo cual se basó en el protocolo de enraizamiento propuesto por Mera (2020) el cual fue modificado para la especie en estudio, se sembraron en medio

de cultivo MS al 100%, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 2,2 g/L de phytigel, 0.5 g/L de carbón activado y diferentes concentraciones de AIA (0.2 mg/L, 0.5 mg/L y 1 mg/L) (Patiño, 2020).

El carbón activado es un elemento poroso capaz de atrapar ciertos compuestos orgánicos. Se lo utiliza en cultivo de tejidos vegetales, debido a que se ha observado que tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas que actúan como inhibidores de crecimiento (Vaca et al., 2018).

Análisis Estadístico

Etapas de Desinfección del Material Vegetal

Unidad experimental. Una semilla colocada en un tubo de ensayo de vidrio con capacidad de 10 mL y 4 mL de medio de cultivo.

Tratamientos. Se trabajó con un total de 6 tratamientos, como se indica en la Tabla 7, y dos controles.

Tabla 7

Tratamientos de desinfección para las semillas de Draba obovata Benth.

Tratamiento	NaClO (% v/v)	Tiempo de inmersión (minutos)
T1	0.5	5
T2	2.5	5
T3	3.5	5
T4	0.5	10
T5	2.5	10
T6	3.5	10

Diseño Experimental. Se aplicó un diseño factorial con dos factores, concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión. Se utilizaron un total de 120 semillas, 15 por cada tratamiento. Para el análisis estadístico se realizaron 3 observaciones de 5 semillas por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

Porcentaje de contaminación (%). Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* contaminadas por hongo y/o bacteria y se comparó con el número total de semillas en cada observación. La evaluación del porcentaje de contaminación de las semillas se la realizó a los 15 días tras la siembra.

Porcentaje de oxidación (%). Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* que presentaban oxidación y se comparó con el número total de semillas en cada observación. La evaluación de las semillas se realizó a los 15 días tras la siembra.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) con un nivel de significancia del 5%. Además, se procedió a realizar una comparación de medias Duncan con significancia del 0.05.

Etapas de Germinación de Semillas

Unidad experimental. Una semilla colocada en un tubo de ensayo de vidrio con capacidad de 10 mL y 4 mL de medio de cultivo.

Tratamientos. Se trabajó con un total de 6 tratamientos, como se indica en la Tabla 8, y un control.

Tabla 8

Tratamientos de germinación para las semillas de Draba obovata Benth.

Tratamiento	MS (%)	Concentración de sacarosa (g/L)
G1	50	15
G2	50	30
G3	50	40
G4	50	50
G5	50	60
G6	100	30

Diseño Experimental. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron un total de 105 semillas, 15 por cada tratamiento. Para el análisis estadístico se realizaron 3 observaciones de 5 semillas por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

Porcentaje de Germinación (%). Se contó el número de semillas germinadas *in vitro* y se comparó con el número total de semillas en cada observación. La evaluación de las semillas se realizó a los 15 días tras la siembra.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) con un nivel de significancia del 5%. Además, se procedió a realizar una comparación de medias Duncan con significancia del 0.05%.

Etapa de Multiplicación

Unidad experimental. Un segmento de tallo sembrado en un tubo de ensayo de vidrio con capacidad de 10 mL y 4 mL de medio de cultivo.

Tratamientos. Se trabajó con un total de 6 tratamientos, como se indica en la Tabla 9, y un control.

Tabla 9

Tratamientos de multiplicación para Draba obovata Benth.

Tratamiento	BAP (mg/L)	AIA (mg/L)
M1	0.5	0.3
M2	0.5	0.5
M3	0.5	1
M4	3	0.3
M5	3	0.5
M6	3	1

Diseño Experimental. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron un total de 105 segmentos de tallo, 15 por cada tratamiento. Para el análisis estadístico se realizaron 3 observaciones de 5 segmentos de tallo por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

Número de brotes (#). Se contó el número de brotes por segmento de tallo. La evaluación de los brotes se realizó a los 30 días tras la siembra.

Longitud del tallo (cm). Se midió la longitud de los tallos. La evaluación de los segmentos de tallo se realizó a los 30 días tras la siembra.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) con un nivel de significancia del 5%. Además, se procedió a realizar una comparación de medias Duncan con significancia del 0.05%.

Etapa de Enraizamiento

Unidad experimental. Un explante obtenido en la fase de multiplicación sembrado en un tubo de ensayo de vidrio con capacidad de 10 mL y 4 mL de medio de cultivo

Tratamientos. Se trabajó con un total de 3 tratamientos, como se indica en la Tabla 10, y un control.

Tabla 10

Tratamientos de enraizamiento para Draba obovata Benth.

Tratamiento	AIA (mg/L)
E1	0.2
E2	0.5
E3	1

Diseño Experimental. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron un total de 105 explantes, 15 por cada tratamiento. Para el análisis estadístico se realizaron 3 observaciones de 5 explantes por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

Porcentaje de enraizamiento (%). Se contó el número de explantes que presentaron raíces y se comparó con el número total de explantes. La evaluación de los explantes que presentaban raíces se realizó a los 30 días tras la siembra.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) con un nivel de significancia del 5%. Además, se procedió a realizar una comparación de medias Duncan con significancia del 0.05%.

Capítulo IV: Resultados

Etapa de Desinfección del Material Vegetal

Porcentaje de Contaminación

Los tratamientos de desinfección que utilizaban 2.5% y 3.5% de hipoclorito de sodio y 10 minutos de inmersión, fueron los más efectivos para combatir la contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. En estos tratamientos no se observó contaminación en las tres observaciones de 5 semillas realizadas. Mientras que, en los controles, donde no se utilizó hipoclorito de sodio hubo una contaminación cercana al 100%. El tratamiento menos efectivo fue el que utilizaba 0.5% de hipoclorito de sodio y 5 minutos de inmersión, en donde, en las tres observaciones de 5 semillas realizadas, se obtuvo un 86.67% de contaminación (Tabla 11).

Tabla 11

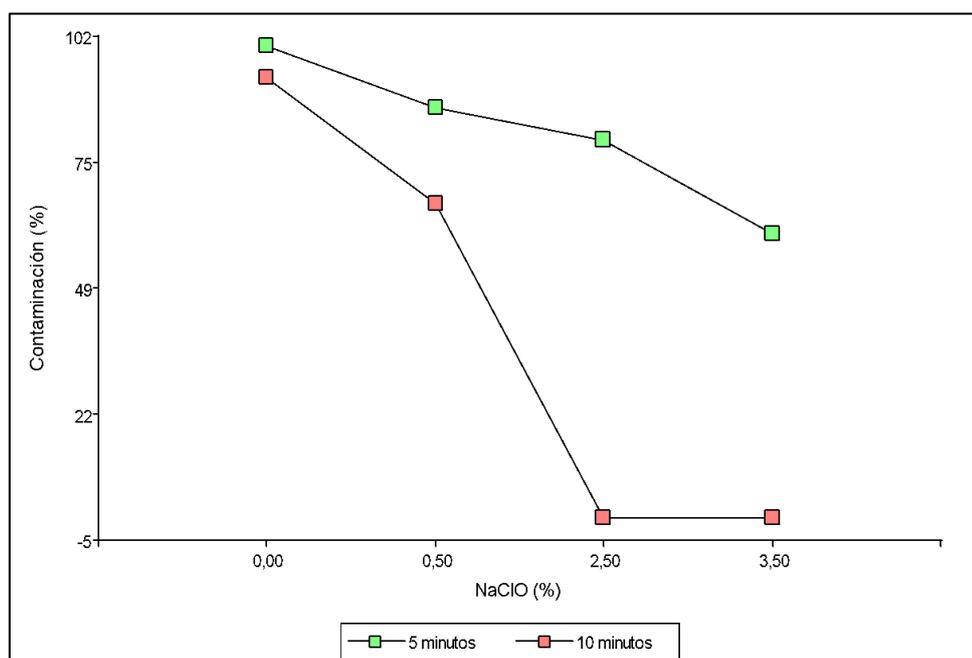
Porcentaje de contaminación en las semillas de Draba obovata Benth. según el tratamiento aplicado

Tratamientos	NaClO (%)	Tiempo (min)	Media de contaminación (%)
C1	0	5	100
T1	0.5	5	86.67
T2	2.5	5	80.00
T3	3.5	5	60.00
C2	0	10	93.33
T4	0.5	10	66.67
T5	2.5	10	0.00
T6	3.5	10	0.00

En la Figura 12, se puede observar el gráfico de interacción entre los factores estudiados con respecto al porcentaje de contaminación. Se evidencia que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión, el porcentaje de contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. disminuye. Observándose que no existe contaminación en los tratamientos con mayor concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión de 10 minutos.

Figura 12

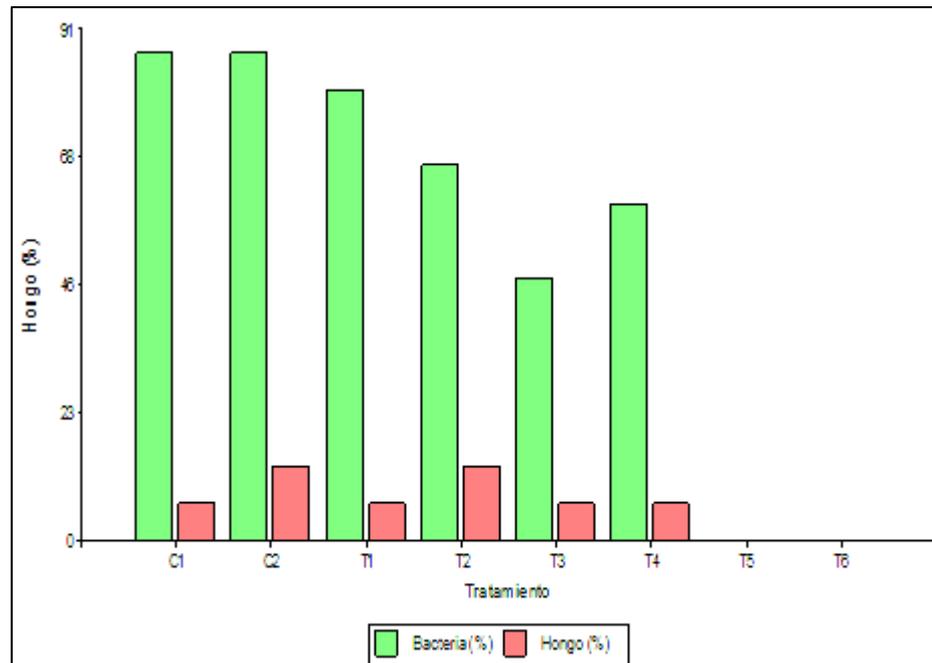
Interacción entre los factores concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo para la variable porcentaje de contaminación



Los datos obtenidos para la variable porcentaje de contaminación indican que en los tratamientos en donde se presentó contaminación, esta podía ser tanto del tipo bacteriana como fúngica, siendo predominante la contaminación bacteriana como se puede evidenciar en la Figura 13.

Figura 13

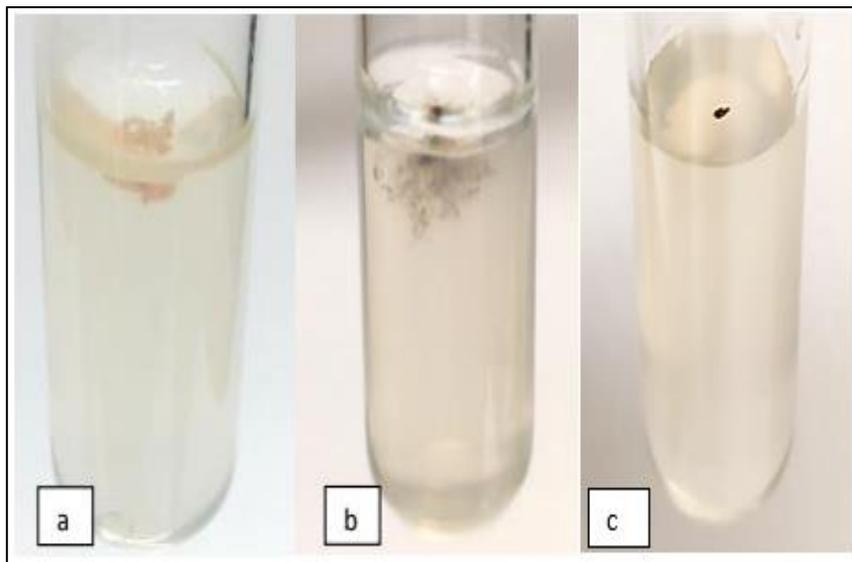
Contaminación por Bacteria y Hongo en las semillas de *Draba obovata* Benth.



En la Figura 14, se puede observar la contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. introducidas. Se evidencia que hubo contaminación tanto por bacteria como por hongo. La bacteria presentaba una coloración blanca, mientras que el hongo presentaba matices negros.

Figura 14

Semillas contaminadas y no contaminadas de *Draba obovata* Benth.



Nota. En la figura se presentan fotografías de la contaminación observada en las semillas de *Draba obovata* Benth., donde, a) Contaminación por bacteria. b) Contaminación por hongo. c) Semilla no contaminada. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022

La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.2772, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA realizado para la comparación de medias de la variable porcentaje de contaminación se puede visualizar en la Tabla 12. El análisis de los factores NaClO (%) y Tiempo (min) por separado, genera valores p de <0.0001 . Los cuales al ser menores a 0.05, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por otro lado, para la interacción NaClO (%) * Tiempo (min) se obtuvo un valor p de 0.0060, el cual indica que la diferencia entre los tratamientos es significativa.

Tabla 12

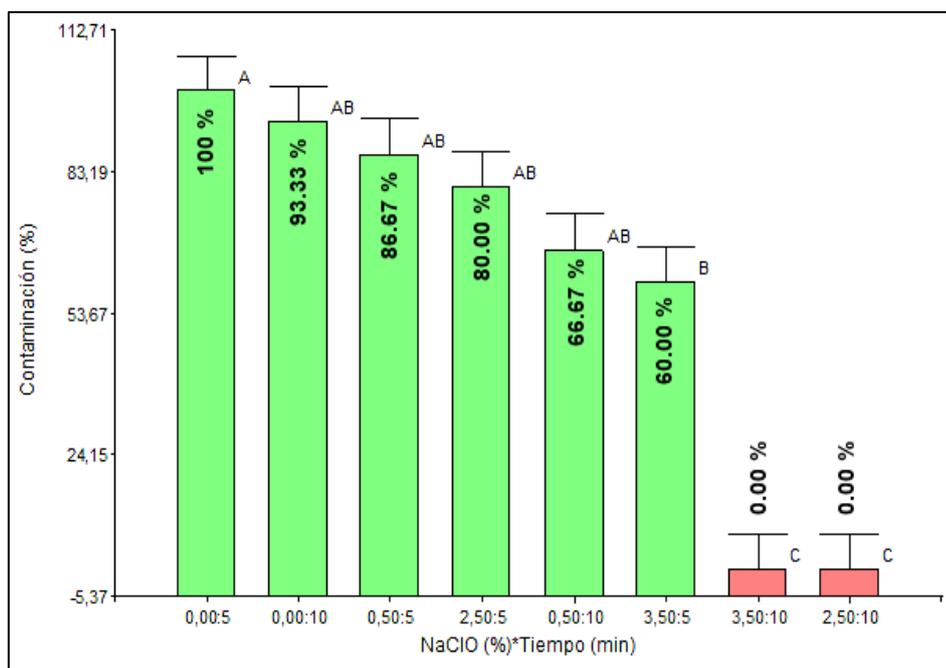
ANOVA para la variable porcentaje de contaminación

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - <i>p</i>
Modelo	34116.67	9	<0.0001
Obs	933.33	2	0.0895
NaClO (%)	17516.67	3	<0.0001
Tiempo (min)	10416.67	1	<0.0001
NaClO (%) *	5250.00	3	0.0060
Tiempo (min)			
Error	2266.67	14	
Total	36383.33	23	

La prueba de Duncan realizada arrojó tres subconjuntos, de los cuales, el subconjunto C, representa a los mejores tratamientos, con menor porcentaje de contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. En estos tratamientos se utilizaron 2.5% y 3.5% de NaClO y 10 minutos de inmersión, como se puede observar en la Figura 15.

Figura 15

Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de contaminación



Porcentaje de Oxidación

El tratamiento en donde se utilizó 3.5% de Hipoclorito de Sodio a un tiempo de inmersión de 10 minutos, fue el que presentó mayor porcentaje de oxidación en las semillas de *Draba obovata* Benth., con valores de 80%, respectivamente. Mientras que, en el resto de tratamientos, incluidos controles, el porcentaje de oxidación fue del 0% (Tabla 13).

Tabla 13

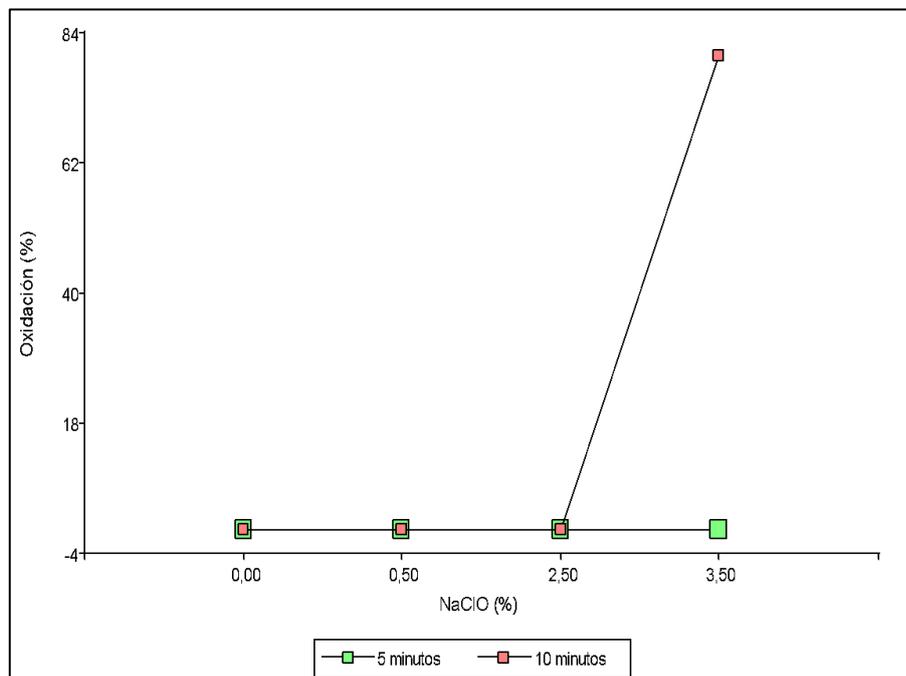
*Porcentaje de oxidación en las semillas de *Draba obovata* Benth. según el tratamiento aplicado*

Tratamientos	NaClO (%)	Tiempo (min)	Media de oxidación (%)
C1	0	5	0.00
T1	0.5	5	0.00
T2	2.5	5	0.00
T3	3.5	5	0.00
C2	0	10	0.00
T4	0.5	10	0.00
T5	2.5	10	0.00
T6	3.5	10	80.00

En la Figura 16, se puede observar el gráfico de interacción entre los factores estudiados con respecto al porcentaje de oxidación. Se evidencia que cuanto mayor es la concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo de inmersión, aumenta el porcentaje de oxidación en las semillas de *Draba obovata* Benth. Obteniéndose, el mayor porcentaje de oxidación a la concentración de 3.5% de Hipoclorito de Sodio y tiempo de inmersión de 10 minutos.

Figura 16

Interacción entre los factores concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo para la variable porcentaje de oxidación



La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.0511, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA realizado para la comparación de medias de la variable porcentaje de oxidación se puede visualizar en la Tabla 14. El análisis de los factores NaClO (%) y Tiempo (min) por separado, genera valores p de 0.0001 y 0.0013, respectivamente. Los cuales al ser menores a 0.05, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por otro lado, para la interacción NaClO (%) * Tiempo (min) se obtuvo un valor p de 0.0001, el cual indica que la diferencia entre los tratamientos es significativa.

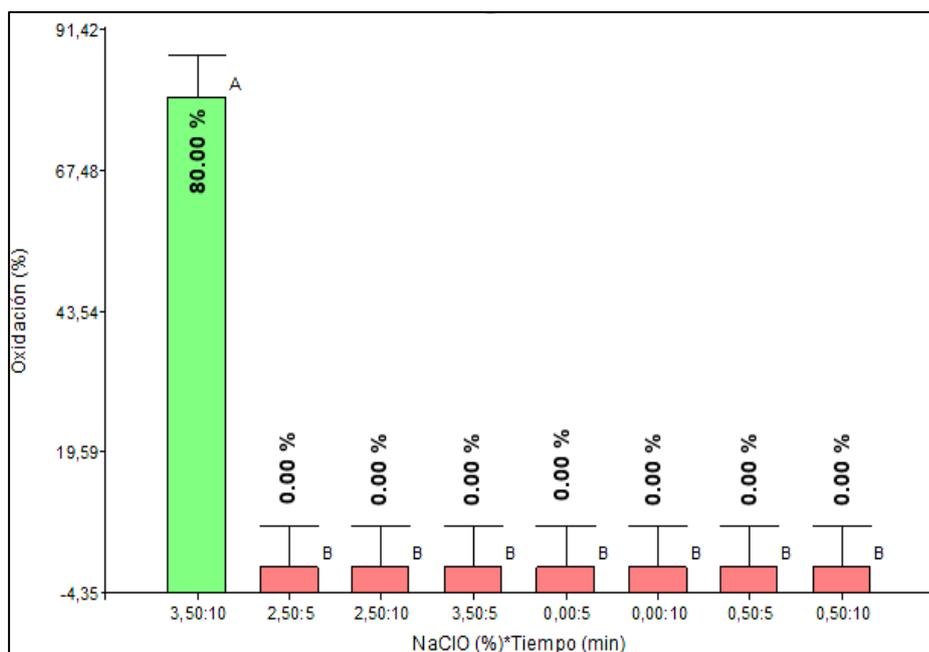
Tabla 14*ANOVA para la variable porcentaje de oxidación*

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - <i>p</i>
Modelo	17100.00	9	<0.0001
Obs	300.00	2	0.3927
NaClO (%)	7200.00	3	0.0001
Tiempo (min)	2400,00	1	0.0013
NaClO (%) * Tiempo (min)	7200.00	3	0.0001
Error	2100.00	14	
Total	19200.00	23	

La prueba de Duncan realizada arrojó dos subconjuntos, de los cuales, el subconjunto B, representa los tratamientos con menor porcentaje de oxidación en las semillas de *Draba obovata* Benth. Mientras que, el subconjunto A, representa el tratamiento con mayor porcentaje de oxidación, en donde se utilizó 3.5% de NaClO a un tiempo de inmersión de 10 minutos, como se puede observar en la Figura 17.

Figura 17

Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de oxidación



Etapa de Germinación de Semillas

Porcentaje de Germinación

La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.7405, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA realizado para la comparación de medias de la variable porcentaje de germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth. se puede visualizar en la Tabla 15. El análisis de los tratamientos genera un valor p de 0.0006. El cual al ser menor a 0.05, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 15

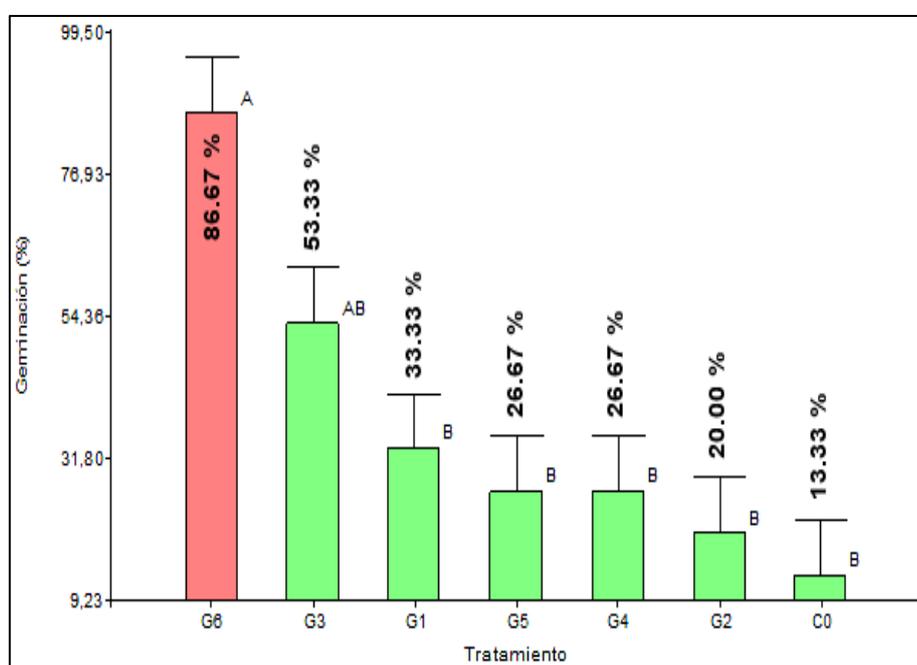
ANOVA para la variable porcentaje de germinación

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - p
Modelo	11428.57	6	0.0006
Tratamiento	11428.57	6	0.0006
Error	3200.00	14	
Total	14628.57	20	

La prueba de Duncan realizada arrojó tres subconjuntos, de los cuales, el subconjunto A, representa el tratamiento con mayor porcentaje de germinación para las semillas de *Draba obovata* Benth., con una media de 86.67%. El cual corresponde al tratamiento suplementado con 100% de MS y 30 g/L de sacarosa, como se puede observar en la Figura 18.

Figura 18

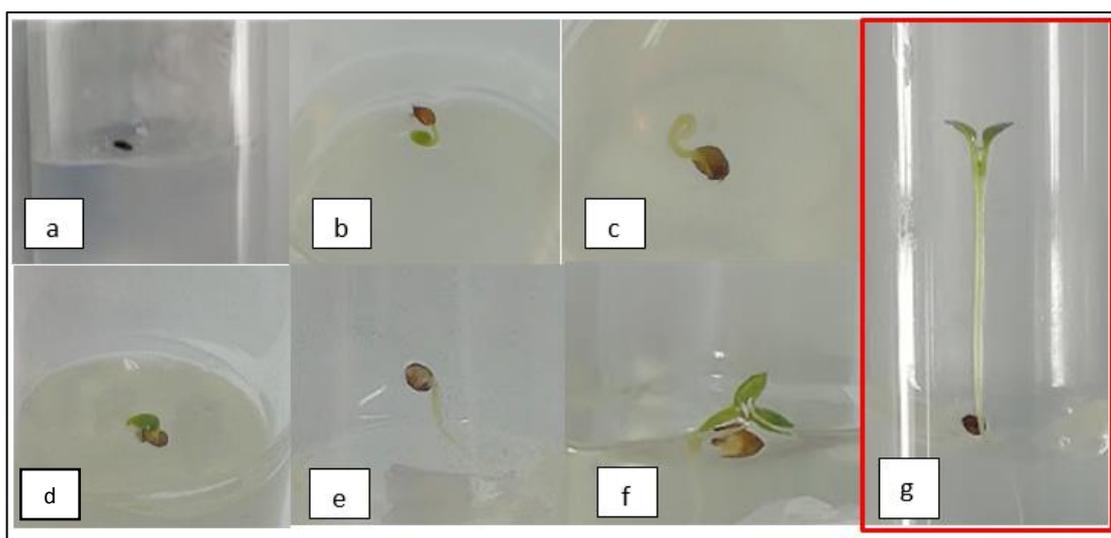
Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de germinación



En la Figura 19, se puede observar la germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth. en función de los diferentes tratamientos aplicados. Se evidencia que la germinación de las semillas varía en función de cada tratamiento aplicado, obteniéndose una semilla completamente germinada en el tratamiento con 100% de MS y 30g/L de sacarosa.

Figura 19

Germinación de semillas de Draba obovata Benth. en cada tratamiento aplicado



Nota. En la figura se presentan fotografías de la germinación de semillas de *Draba obovata* Benth. en función de cada tratamiento aplicado, donde, a) Control. b) Tratamiento G1. c) Tratamiento G2. d) Tratamiento G3. e) Tratamiento G4. f) Tratamiento G5. g) Tratamiento G6. En el recuadro rojo se presenta la fotografía del mejor tratamiento aplicado correspondiente a G6. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Etapas de Multiplicación

Número de brotes

La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.8970, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA

realizado para la comparación de medias de la variable número de brotes en *Draba obovata* Benth. se puede visualizar en la Tabla 16. El análisis de los tratamientos genera un valor p de 0.0055. El cual al ser menor a 0.05, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 16

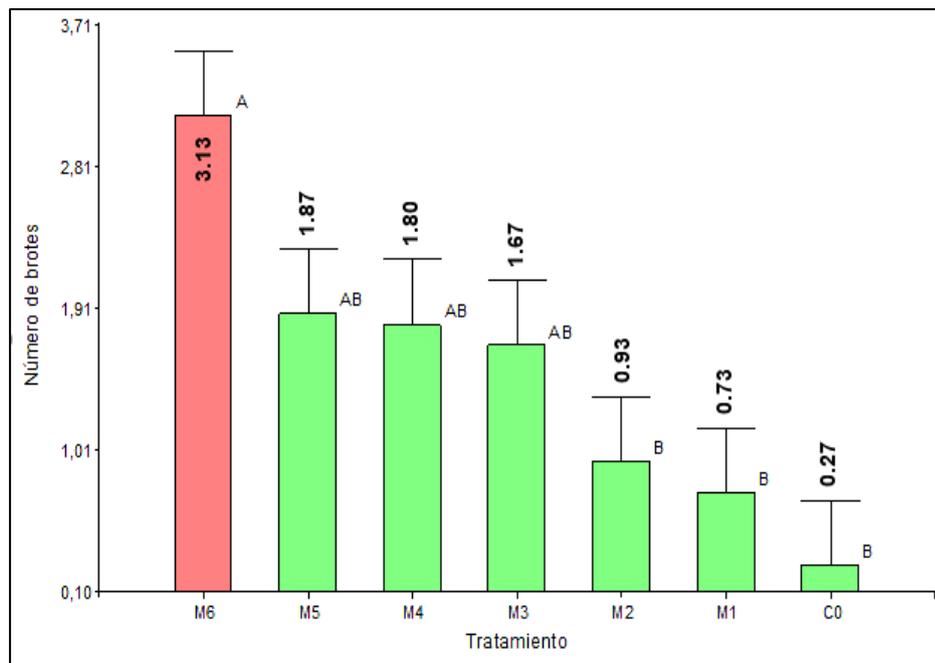
ANOVA para la variable número de brotes

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - p
Modelo	16.05	6	0.0055
Tratamiento	16.05	6	0.0055
Error	7.28	14	
Total	23.33	20	

La prueba de Duncan realizada arrojó tres subconjuntos, de los cuales, el subconjunto A, representa el tratamiento con mayor número de brotes para *Draba obovata* Benth., con una media de 3.13 brotes por explante. El cual corresponde al tratamiento suplementado con 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, como se puede observar en la Figura 20.

Figura 20

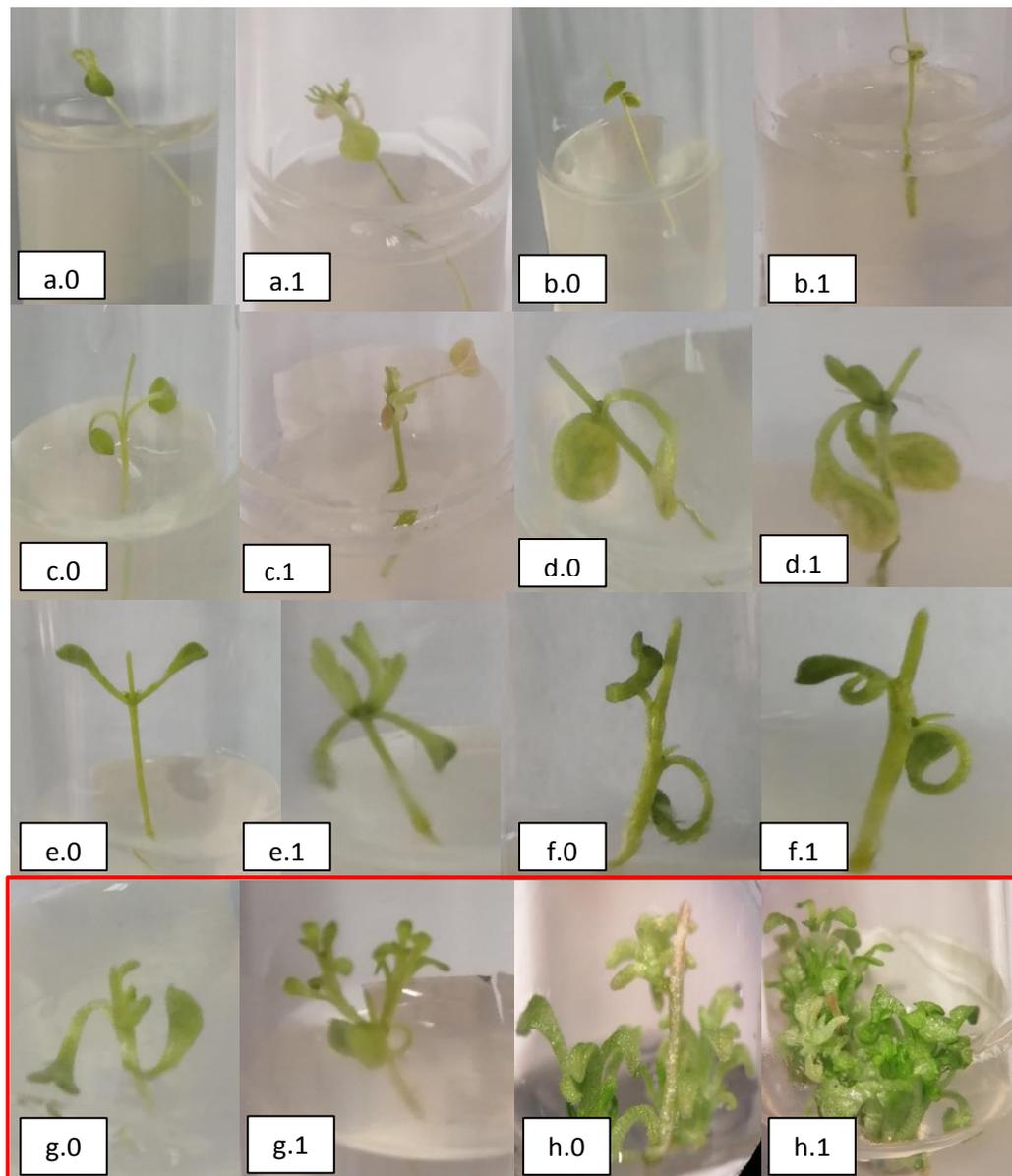
Subconjuntos obtenidos para la variable número de brotes



En la Figura 21, se puede observar los brotes de *Draba obovata* Benth. en función de los diferentes tratamientos aplicados. Se evidencia que el desarrollo de los brotes varía en función de cada tratamiento aplicado, obteniéndose mayor número de brotes luego de 30 días, en el tratamiento que utilizaba un medio suplementado con 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA.

Figura 21

Desarrollo de los brotes de Draba obovata Benth. en cada tratamiento



Nota. En la figura se presentan fotografías del desarrollo de los brotes de *Draba obovata* Benth. en función de cada tratamiento aplicado luego de 30 días, donde, a.0) Control Inicio. a.1) Control Final. b.0) Tratamiento M1 Inicio. b.1) Tratamiento M1 Final. c.0) Tratamiento M2 Inicio. c.1) Tratamiento M2 Final. d.0) Tratamiento M3 Inicio. d.1) Tratamiento M3 Final. e.0) Tratamiento M4 Inicio. e.1) Tratamiento M4 Final. f.0) Tratamiento M5 Inicio. f.1) Tratamiento M5 Final. g.0) Tratamiento M6 Inicio. g.1) Tratamiento M6 Final. h.0) Tratamiento M6 Inicio en estereomicroscopio.

h.1) Tratamiento M6 Final en estereomicroscopio. En el recuadro rojo se presentan las fotografías del mejor tratamiento aplicado correspondientes a M6. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Longitud del tallo

La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.2232, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA realizado para la comparación de medias de la variable longitud del tallo en *Draba obovata* Benth. se puede visualizar en la Tabla 17. El análisis de los tratamientos genera un valor p de 0.0649. El cual al ser mayor a 0.05, indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Es decir, los tratamientos aplicados no influyen en la variable longitud del tallo.

Tabla 17

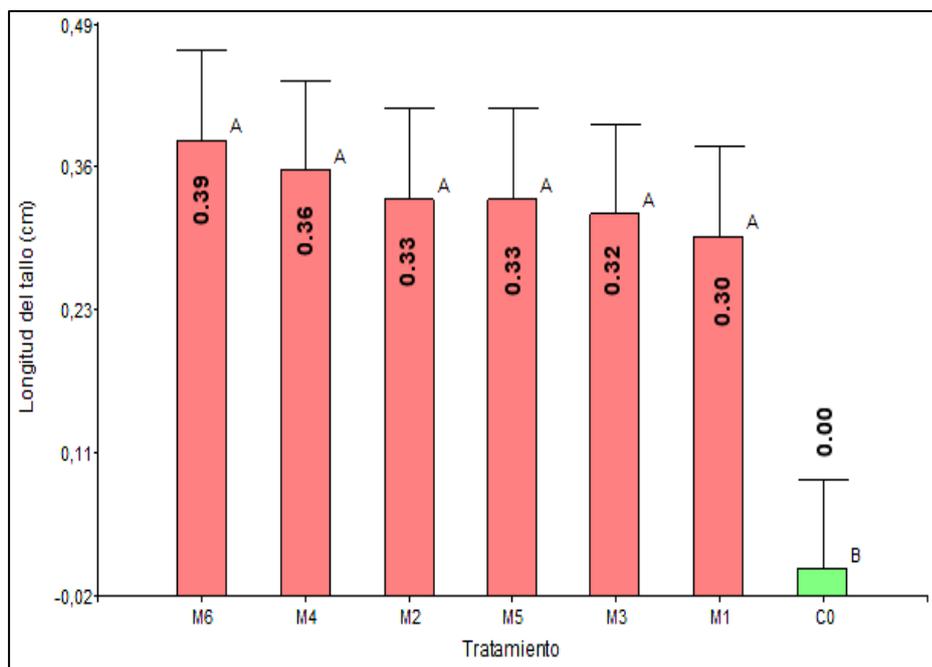
ANOVA para la variable longitud del tallo

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - p
Modelo	0.31	6	0.0649
Tratamiento	0.31	6	0.0649
Error	0.28	14	
Total	0.59	20	

La prueba de Duncan realizada arrojó dos subconjuntos, de los cuales, el subconjunto A indica los tratamientos que fueron efectivos para la longitud de tallo en *Draba obovata* Benth., mientras que el subconjunto B representa el peor tratamiento y corresponde al control donde no se adicionó hormona, como se puede evidenciar en la Figura 22.

Figura 22

Subconjuntos obtenidos para la variable longitud de tallo



Etapas de Enraizamiento

Porcentaje de enraizamiento

La prueba de Normalidad de Shapiro – Wilks proporcionó un valor p de 0.1311, el cual al ser superior a 0.05 indica que los datos siguen una distribución normal. El ANOVA realizado para la comparación de medias de la variable porcentaje de explantes de *Draba obovata* Benth que presentan raíces se puede visualizar en la Tabla 18. El análisis de los tratamientos genera un valor p de 0.0026. El cual al ser menor a 0.05, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 18

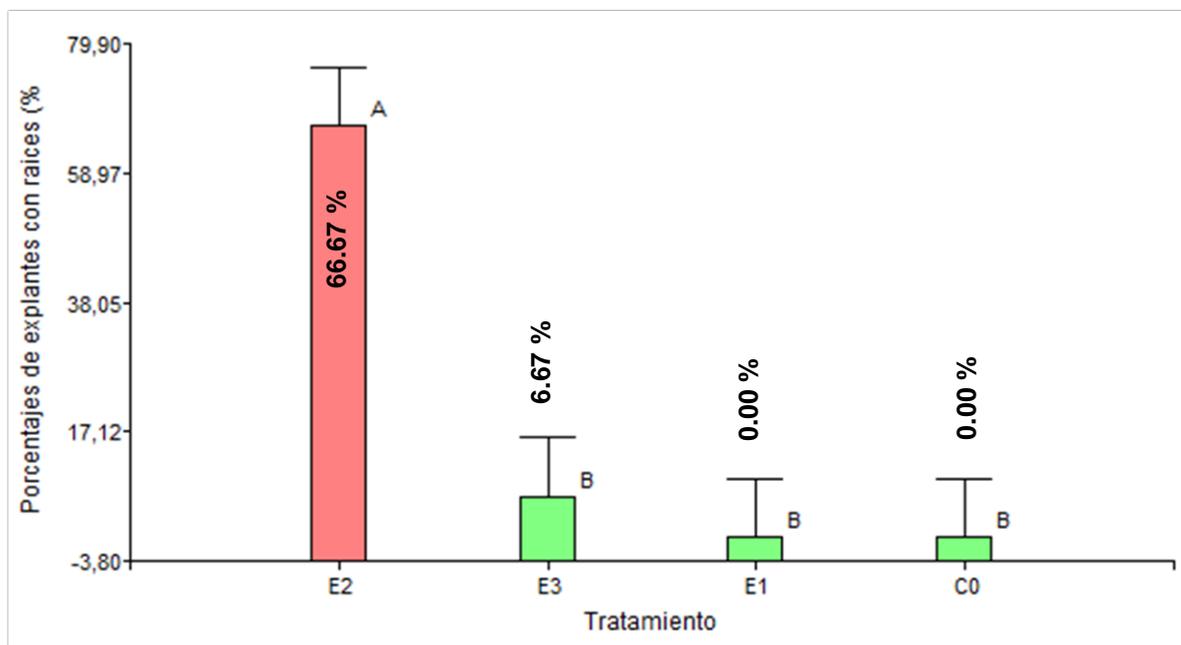
ANOVA para la variable porcentaje de explantes que presentan raíces

Origen	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Valor - p
Modelo	94333.33	3	0.0026
Tratamiento	94333.33	3	0.0026
Error	21333.33	8	
Total	11566.67	11	

La prueba de Duncan realizada arrojó dos subconjuntos, de los cuales, el subconjunto A, representa el tratamiento con mayor porcentaje de explantes de *Draba obovata* Benth. que presentan raíces, con una media de 66.67%. El cual corresponde al tratamiento suplementado con 0.5 mg/L de AIA, como se puede observar en la Figura 23. Estos resultados nos indican que al aumentar la cantidad de AIA se produce un desarrollo de raíces en los explantes de *Draba obovata* Benth., pero al continuar aumentando la concentración de AIA, el desarrollo de raíces disminuye, como sucede en el tratamiento E3 donde se aplicó una concentración de AIA de 1 mg/L y el porcentaje de explantes que desarrollaron raíces disminuyó.

Figura 23

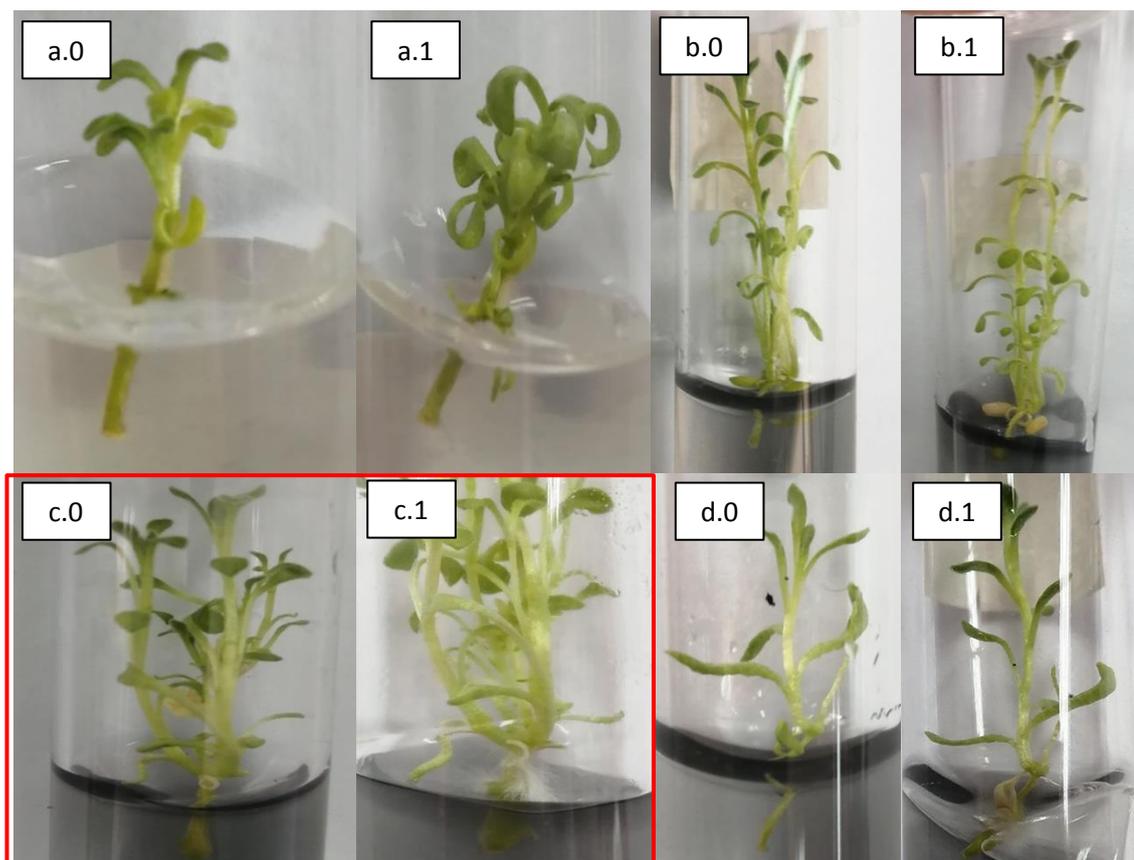
Subconjuntos obtenidos para la variable porcentaje de explantes que presentan raíces



En la Figura 24, se puede observar los explantes de *Draba obovata* Benth. en función de los diferentes tratamientos aplicados para el desarrollo de raíces. Se evidencia que el desarrollo de las raíces a los 30 días, se produce con el tratamiento E2 donde se aplicó 0.5 mg/L de AIA. Mientras que, en el resto de tratamientos no se evidencia el desarrollo de raíces o este se produce en menor proporción. En la Figura 25, se muestran las raíces desarrolladas en el tratamiento E2 observadas en el estereomicroscopio.

Figura 24

Desarrollo de raíces en explantes de Draba obovata Benth. en cada tratamiento



Nota. En la figura se presentan fotografías del desarrollo de raíces en explantes de *Draba obovata* Benth. en función de cada tratamiento aplicado después de 30 días, donde, a.0) Control Inicio. a.1) Control Final. b.0) Tratamiento E1 Inicio. b.1) Tratamiento E1 Final. c.0) Tratamiento E2 Inicio. c.1) Tratamiento E2 Final. d.0) Tratamiento E3 Inicio. d.1) Tratamiento E3 Final. En el recuadro rojo se presentan las fotografías del mejor tratamiento aplicado correspondientes a E2. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Figura 25

Desarrollo de raíces en explantes de *Draba obovata* Benth. aplicando el tratamiento E2



Nota. En la figura se presenta el desarrollo de raíces en el explante de *Draba obovata* Benth. aplicando el tratamiento E2, observado en el estereomicroscopio, lente ocular objetivo 1X. Fotografía propia. Cañadas, A. 2022.

Capítulo V: Discusión

Etapa de Desinfección del Material Vegetal

Draba obovata Benth. es una especie endémica localizada en los páramos y subpáramos del Ecuador. Esta especie está amenazada debido a las acciones antropogénicas que se producen en su hábitat, que incluyen las quemadas y el pastoreo (León et al., 2011). Las técnicas de preservación y restauración de esta especie mediante propagación convencional no son factibles, por lo que el uso del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se convierte en una opción viable para lograr este propósito (Cruz, 2009).

El cultivo *in vitro* de especies vegetales consiste en un conjunto de técnicas que permite regenerar una planta completa a partir de un segmento de esta, en un medio de cultivo aséptico (Bhatia S. , 2015). Para establecer el medio de cultivo aséptico es necesario realizar un proceso de desinfección del explante a utilizar, de tal manera que se elimine la mayor parte de contaminantes (Varela, 2018).

Porcentaje de Contaminación

En el cultivo de tejido vegetales la contaminación es un problema común que implica la introducción de contaminantes como hongos, bacterias, incluso algas, dentro del medio de cultivo (Bhatia S. , 2015). En el presente estudio se obtuvo contaminación tanto bacteriana como fúngica, siendo predominante la del tipo bacteriano, en las semillas de *Draba obovata* Benth., como se puede visualizar en la Figura 13. Esta contaminación disminuía conforme se variaban las concentraciones de Hipoclorito de Sodio y tiempos de inmersión, como se puede visualizar en la Figura 12, en donde, a mayores concentraciones de Hipoclorito de Sodio (2.5% y 3.5%) y mayor tiempo de inmersión (10 minutos), no se evidenció contaminación.

Existen varias técnicas para evitar la contaminación, una de ellas es el uso de agentes desinfectantes. Uno de los más comunes es el Hipoclorito de Sodio, el cual ha demostrado ser efectivo cuando se aplica a concentraciones entre 0.5 al 3%, y tiempos

entre 10 a 20 minutos (Stanisavljevic et al., 2017) . En el presente estudio, se aplicó un protocolo de desinfección utilizando diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio a diferentes tiempos de inmersión, obteniéndose los mejores tratamientos de desinfección para las semillas de *Draba obovata* Benth., con un porcentaje de contaminación del 0%, a una concentración de Hipoclorito de Sodio de 2.5% y 3.5%, con tiempo de inmersión de 10 minutos.

En el estudio realizado por Bhalla & De Weerd (1999) para la desinfección de semillas de la familia Brassicaceae se utilizó un tratamiento que incluía Hipoclorito de Sodio al 3% con un tiempo de inmersión de 10 minutos. Las semillas se sembraron en medio MS suplementado con sacarosa, y el porcentaje de contaminación fue del 0%. De igual manera, en el presente estudio las semillas de *Draba obovata* Benth. desinfectadas con 2.5% y 3.5% de Hipoclorito de Sodio a 10 minutos de inmersión, no presentaron contaminación, como se puede visualizar en la Figura 15. Considerándose tratamientos de desinfección efectivos para las semillas de *Draba obovata* Benth.

Para otras semillas de la familia Brassicaceae se utilizó un protocolo de desinfección con etanol al 70% e Hipoclorito de Sodio al 3% con un tiempo de inmersión de 10 minutos. La aplicación de este tratamiento de desinfección elimina la contaminación en un 100% (Farooq et al., 2019). En el presente estudio, los mejores tratamientos de desinfección aplicados a las semillas de *Draba obovata* Benth. contenían 2.5% y 3.5% de Hipoclorito de Sodio con un tiempo de inmersión de 10 minutos, en combinación con etanol al 70%, como se puede visualizar en la Figura 15. Con estos tratamientos se logró eliminar la contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. en un 100%.

Según Estrela et al. (2002) el Hipoclorito de Sodio debido a su elevado pH actúa interfiriendo con la integridad de la membrana citoplasmática de los microorganismos mediante una inhibición enzimática irreversible, alteraciones biosintéticas y degradación de fosfolípidos, lo que le permite actuar como agente antimicrobiano. Como observamos en el presente estudio a las concentraciones de Hipoclorito de Sodio de 2.5% y 3.5%, no se

evidenció la presencia de ningún tipo de microorganismo, obteniéndose 0% de contaminación en las semillas de *Draba obovata* Benth. lo cual se puede visualizar en la Figura 13.

En el estudio realizado por Rodríguez et al. (2009) se utilizaron diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio entre 1.5% a 2.5% a diferentes tiempos de inmersión entre 5 a 20 minutos, en semillas de *Dioscorea alata* L. perteneciente a la familia Dioscoreaceae. Los resultados demuestran que existe interacción entre la concentración de Hipoclorito de Sodio y tiempo de inmersión, que tiene efecto sobre el porcentaje de contaminación. Conforme aumenta la concentración de Hipoclorito de Sodio y el tiempo de inmersión, la contaminación disminuye. Obteniéndose los mejores tratamientos de desinfección a la concentración de 2.5% de Hipoclorito de Sodio y tiempo de inmersión entre 10 – 20 minutos. Similar a lo obtenido en el presente estudio, donde la contaminación de las semillas de *Draba obovata* Benth. es menor a altas concentraciones de Hipoclorito de Sodio de 2.5 y 3.5%, y tiempo de inmersión de 10 minutos, como se puede visualizar en la Figura 12.

Porcentaje de Oxidación

La oxidación de los tejidos *in vitro* es un problema común que puede deberse a la presencia de radicales libres que desatan la acción de las enzimas oxidasas, una de ellas la enzima polifenol oxidasa (PPO), que conlleva a la producción de quinonas que son especies muy reactivas, capaces de generar daño e incluso muerte celular (Azofeifa, 2009). Cuando los tejidos vegetales se encuentran expuestos a ciertos factores, como sustancias abrasivas utilizadas en la desinfección del tejido, se promueve el desarrollo de los radicales libres (Bhatia & Nanjappa, 2008). El Hipoclorito de Sodio tiene una propiedad oxidativa fuerte que le permite reaccionar fácilmente con ácidos nucleicos, quinonas, aminos y amidas (Yildiz & Er, 2002). En el presente estudio los protocolos de desinfección utilizados incluían la presencia de Hipoclorito de Sodio en diferentes concentraciones, observándose que a concentraciones altas de este y tiempos de inmersión prolongados, la oxidación en las

semillas de *Draba obovata* Benth. era mayor, con un porcentaje de oxidación del 80%, esto puede visualizarse en la Tabla 13.

En el estudio realizado por Handayani et al. (2022) las semillas de *Stelechocarpus burahol*, perteneciente a la familia Annonaceae, fueron sometidas a diferentes tratamientos de desinfección, los cuales involucraban el uso de NaClO. A medida que aumentaba la concentración del Hipoclorito de Sodio (superior al 3%) y con un tiempo de inmersión de 10 minutos, la oxidación del explante aumentaba a porcentajes de oxidación superiores al 77.78%. En el presente estudio, se observó que el tratamiento de desinfección con 3.5% de NaClO y 10 minutos de inmersión, generaba un 80% de oxidación en las semillas de *Draba obovata* Benth. Siendo este el tratamiento con mayor concentración de NaClO y mayor tiempo de inmersión, como se puede visualizar en la Tabla 13.

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de oxidación del 80% en las semillas de *Draba obovata* Benth. sometidas al tratamiento con 3.5% de NaClO y 10 minutos de inmersión. Mientras que, al aplicar el tratamiento con 2.5% de NaClO y 10 minutos de inmersión, el porcentaje de oxidación fue del 0%, como se puede visualizar en la Figura 17. En el estudio realizado por Rodríguez et al. (2009) las semillas de *Dioscorea alata* L., perteneciente a la familia Dioscoreaceae, presentaron porcentajes de oxidación superiores al 60% a concentraciones de Hipoclorito de Sodio de 2.5% y con tiempos de inmersión superiores a 10 minutos.

Borges et al. (2004) realizaron un estudio para probar un protocolo de desinfección en *Guadua angustifolia* Kunth, perteneciente a la familia Poaceae, en el cual se probaron concentraciones de Hipoclorito de Sodio entre 1 a 4% con un tiempo de inmersión de 20 minutos. Observando que, con las concentraciones de Hipoclorito de Sodio superiores al 3% la oxidación de los explantes era mayor, con porcentajes superiores al 86%. De igual manera, en el presente estudio se pudo observar que a la concentración de Hipoclorito de Sodio del 3.5%, la oxidación de las semillas de *Draba obovata* Benth era del 80%, como se puede visualizar en la Figura 17.

Etapa de Germinación de Semillas

Porcentaje de Germinación

Los tratamientos pre germinativos tienen la finalidad de romper la latencia inducida por la testa, al ablandarla, perforarla, rasgarla o abrirla sin dañar el endospermo o el embrión, de tal manera que se vuelva permeable y la germinación sea más rápida. Existen muchos tratamientos pre germinativos y su utilización dependerá de la especie, de tal forma que se logre una germinación rápida y uniforme (Viveros et al., 2015). En el presente estudio las semillas de *Draba obovata* Benth. fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo que consistió en el ablandamiento de la testa con agua caliente (MacDonald & Omoruyi, 2003). Esto facilitó la germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth. *in vitro*. Obteniéndose semillas germinadas a los 15 días tras la siembra.

Las semillas de la especie *Cardaria draba*, perteneciente a la familia Brassicaceae, presentan un porcentaje de germinación *ex vitro* de 94% luego de un año de ser sembradas en tierra y sin la aplicación de un tratamiento pre germinativo (Rezvani & Zaefarian, 2016).

En el presente estudio las semillas de *Draba obovata* Benth. fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo y posteriormente se sembraron *in vitro*, logrando la germinación a los 15 días tras la siembra y con un porcentaje de semillas germinadas de 86.67%. Como se puede observar la aplicación de tratamientos pre germinativos y la siembra *in vitro* de las semillas de *Draba obovata* Benth. reduce el tiempo de germinación, lo cual, es favorable para los objetivos de preservación y restauración ecológica que se tienen a futuro con esta especie.

Por otro lado, las semillas de la especie *Lepidium draba*, perteneciente a la familia Brassicaceae, presentan un porcentaje de germinación *ex vitro* de 86% luego de tres meses tras la siembra y sin la aplicación de un tratamiento pre germinativo (Francis & Warwick, 2008). A diferencia de las semillas de *Draba obovata* Benth. las cuales fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo para luego ser sembradas *in vitro*, obteniéndose un porcentaje de germinación de 86.67% a los 15 días tras las siembras. Al comparar el tiempo

de germinación de otras especies pertenecientes a la misma familia y el tiempo de germinación logrado con las semillas de *Draba obovata* Benth., podemos observar que el uso de tratamientos pre germinativos y la siembra *in vitro*, reducen los tiempos de germinación. Siendo esto favorable para obtener plantas de una manera más rápida.

En el estudio realizado por Kaya et al. (2015) las semillas de la especie *Lepidium draba*, perteneciente a la familia Brassicaceae, fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo, que consistía en su inmersión en agua destilada durante 12 horas para luego ser germinadas en placas de Petri con papel filtro. Las semillas se consideraron germinadas después de 30 días tras la siembra. En el presente estudio, las semillas de *Draba obovata* Benth. fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo similar, dando como resultado semillas germinadas *in vitro* a los 15 días tras la siembra. Como podemos ver el uso de tratamientos pre germinativos favorece la germinación de semillas en especies de la familia Brassicaceae, pero al incluir la siembra *in vitro*, se logra una reducción del tiempo de germinación, como se observó en las semillas de la especie *Draba obovata* Benth.

Las semillas de la familia Brassicaceae fueron sembradas en diferentes medios de cultivo MS a diferentes concentraciones (25, 50 y 100%) y suplementados con 30 g/L de sacarosa, obteniéndose el mayor porcentaje de germinación del 95.75% en el medio MS al 100% y 30 g/L de sacarosa (Masache & Meneses, 2018). De igual manera, en el presente estudio se obtuvo el mayor porcentaje de germinación de 86.67% en el medio MS al 100% y suplementado con 30 g/L de sacarosa. Siendo este el medio óptimo para la germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth.

En el estudio realizado por Zinhari et al. (2017) el medio establecido para la germinación de semillas de *Lepidium draba* L. perteneciente a la familia Brassicaceae consiste en medio MS al 50% con 15 g/L de sacarosa. A diferencia, del presente estudio en donde el medio MS al 50% y 15 g/L de sacarosa, produce el menor porcentaje de germinación en las semillas de *Draba obovata* Benth., con un valor de 20%. Hay que tener

en cuenta, que cada especie reacciona diferente a las condiciones de cultivo que se les proporcionan (Aragón et al., 2009).

Todos los medios de cultivo utilizados en el presente estudio permitieron que las semillas de *Draba obovata* Benth. germinaran, sin embargo, hubo un medio en donde se obtuvo el mayor porcentaje de germinación con un valor de 86.67%, que consistía en 100% de MS y 30 g/L de sacarosa. En estudios realizados en una especie de la familia Brassicaceae, *Draba yukonensis*, se tiene establecido que el medio adecuado para la germinación de semillas está compuesto por 100% de MS y 30 g/L de sacarosa. Sin embargo, los porcentajes de germinación obtenidos para esta especie son menores al 60%. Hay que tener en cuenta que al ser especies diferentes, su adecuación al medio también puede ser diferente (Saxena et al., 2021).

El medio MS es ampliamente utilizado en cultivo de tejidos vegetales para micropropagación, cultivo de callos, suspensiones celulares y cultivo de órganos vegetales. Este medio provee los macroelementos y microelementos necesarios para el desarrollo de una planta. Es uno de los medios más utilizados en distintas especies vegetales, siendo la base para el desarrollo de otros medios (Hameg et al., 2020). Las especies de la familia Brassicaceae no son la excepción, y generalmente para su establecimiento *in vitro* utilizan el medio MS como base, el cual es suplementado con sacarosa y dependiendo del objetivo, puede ser suplementado con diferentes hormonas vegetales (Munshi et al., 2007).

Especies de la familia Brassicaceae como *Brassica oleracea*, cuyas semillas son sembradas en medio MS que contiene 10 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, presentan porcentajes de germinación superiores al 90%. Siendo este el medio idóneo para la germinación de las semillas (Gerszberg et al., 2015). En el presente estudio, el medio MS suplementado con sacarosa, resultó efectivo para la germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth. En dependencia de la concentración de MS y sacarosa, el porcentaje de germinación variaba, obteniéndose el mayor porcentaje (86.67%) a valores de 100% de MS y 30 g/L de sacarosa, como se puede visualizar en la Figura 18.

La sacarosa es esencial en el medio de cultivo de plantas *in vitro* ya que permite el crecimiento heterotrófico de las especies vegetales, teniendo en cuenta que debido a las condiciones donde se mantienen las plantas *in vitro*, se reduce la producción de energía y carbohidratos por medio de la fotosíntesis (Alvarado-Capó et al., 2004). La germinación de las semillas de *Draba obovata* Benth. se produjo en un medio que contenía tanto MS como sacarosa. La variación de sacarosa en el medio de cultivo tuvo efecto en el porcentaje de germinación, como se puede visualizar en la Figura 18.

Etapas de Multiplicación

Número de brotes

La regeneración directa de brotes en *Lepidium draba* L. perteneciente a la familia Brassicaceae se logró gracias a la combinación de los reguladores de crecimiento citoquinina (BAP) y auxina ANA (Ácido Naftalenacético) a diferentes concentraciones. La combinación de 1 mg/L de ANA con 3 mg/L de BAP, generó un total de 2 brotes por cada explante (Zinhari et al., 2017). En el presente estudio la regeneración de un mayor número de brotes en *Draba obovata* Benth. se logró al combinar 3 mg/L de BAP con 1 mg/L de AIA, obteniéndose 3.13 brotes por explante, como se puede visualizar en la Figura 20. El uso de BAP combinado con concentraciones bajas de auxina incrementa el desarrollo de brotes por explante en varias especies vegetales, como es el caso de la especie *Brassica oleracea* (Chen et al., 2006).

En el estudio realizado por Saxena et al. (2021) se utilizaron tres concentraciones de BAP (1, 3 y 5 mg/L) para la regeneración de brotes en la especie *Draba yukonensis*. Los resultados obtenidos indican que a concentraciones de BAP de 3 mg/L se obtiene la mayor cantidad de brotes por explante, con un valor de 4 brotes. Las citoquinas están involucradas en la división celular, crecimiento, morfogénesis y desarrollo de brotes. Se ha demostrado que el uso de altas concentraciones de citoquinina en combinación con bajas concentraciones de auxina promueve el desarrollo de brotes en el explante (Jain et al., 2012). El desarrollo de un mayor número brotes en *Draba obovata* Benth. se logró al

combinar 3 mg/L de BAP y 1mg/L de AIA, lo que dio como resultado un total de 3.13 brotes por explante, como se puede visualizar en la Figura 20. Similar al número de brotes obtenidos en otras especies de la familia Brassicaceae con el uso de BAP en el medio de cultivo.

En el estudio realizado por Eras-Guamán et al. (2019) la combinación de BAP con AIA favorece el desarrollo de brotes en la especie *Cinchona officinalis* L., perteneciente a la familia Rubiaceae, debido a que existe un sinergismo entre las dos hormonas. Bajas concentraciones de auxinas en combinación con una concentración adecuada de citoquininas, desencadena el desarrollo de brotes en las especies vegetales. Como se pudo evidenciar en el presente estudio, *Draba obovata* Benth. reaccionó adecuadamente a la combinación de BAP con AIA en el medio de cultivo, desarrollando brotes en todos los tratamientos. Lo que nos indica que existe sinergia entre las hormonas utilizadas que favorece el desarrollo de brotes en los explantes.

Autores como Shimizu-Sato et al. (2009) aseguran que el número de brotes se encuentra condicionado por la presencia de la citoquinina BAP en el medio de cultivo, y la sinergia que existe con la auxina AIA incrementa la efectividad de la citoquinina. De tal manera, que esto se ve reflejado en el número de brotes por explante que se desarrollan. La combinación de BAP y AIA en *Draba obovata* Benth. resultó efectiva para el desarrollo de brotes en el explante, siendo mayor este número con mayores concentraciones de ambas hormonas, es decir, a 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, como se puede visualizar en la Figura 20.

La proliferación de brotes se consigue al adicionar al medio de cultivo citoquininas, las cuales tienen la propiedad de romper la dormancia apical y estimular la brotación de yemas. La combinación con auxinas es requerida para el crecimiento de los brotes (Aguar et al., 2008). En el presente estudio se utilizó la combinación de la citoquinina BAP con la auxina AIA, a diferentes concentraciones, obteniéndose brotación en cada tratamiento aplicado, como se puede visualizar en la Figura 20. Sin embargo, la concentración de 3

mg/L de BAP con 1 mg/L de AIA, fue efectiva para el desarrollo de un mayor número de brotes por explante, con un total de 3.13 brotes por explante.

En el estudio realizado por Ríos-Ramírez et al. (2017) se observó que la combinación de BAP con AIA tiene un efecto significativo en la brotación del explante. Conforme aumentaba la concentración de BAP y AIA en el medio también aumentaba el número de brotes por explante. En el presente estudio se observó un patrón similar. La combinación de BAP a concentraciones de 0.5 y 3 mg/L, y AIA a concentraciones 0.3, 0.5 y 1 mg/L, favoreció el desarrollo de brotes en *Draba obovata* Benth., obteniéndose el mayor número de brotes (3.13) a las concentraciones más altas de BAP y AIA, como se puede visualizar en la Figura 20.

Longitud del tallo

En el presente estudio la mayor longitud de tallo en *Draba obovata* Benth. fue obtenida con el medio suplementado con 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, con un valor de 0.39 cm. Sin embargo, este valor no difiere significativamente con el resto de tratamientos aplicados, excepto por el control, en donde no se evidenció aumento de la longitud del tallo, como se puede visualizar en la Figura 22. En el estudio realizado por Liu et al. (2022) se utilizó un medio con diferentes concentraciones de BAP (1.1, 2.2 y 4.4 μ M) en explantes de la especie *Draba yukonensis*, y se determinó que la longitud del tallo aumentaba significativamente en los brotes que fueron sembrados en los medios de cultivo suplementados con BAP y se mantenía en valores entre 3 a 5 cm, mientras que, en el control, la longitud del tallo fue de 2 cm. Como se puede ver, estos resultados difieren con lo obtenido en el presente estudio, donde existió aumento en la longitud del tallo, sin embargo, los valores se mantuvieron por debajo de 1 cm y no existieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, esto puede visualizarse en la Figura 22.

En el estudio realizado por Ccuno et al. (2021) se utilizaron medios de cultivo suplementados con BAP y ANA en la especie *Polylepis rugulosa* Bitter. perteneciente a la familia Rosaceae. Sus resultados demuestran que las altas concentraciones de BAP en el

medio desfavorecen el aumento de la longitud de los brotes, asegurando que esto puede deberse a que las citoquininas disminuyen la dominancia apical. Por lo que, para la elongación de brotes es necesario utilizar un medio con bajas concentraciones de citoquininas que favorezca la elongación del tejido por parte de las auxinas. En el presente estudio, se puede observar que la combinación de BAP con AIA en el medio de cultivo favoreció el aumento de la longitud del tallo en *Draba obovata* Benth. con respecto al control. Sin embargo, este aumento no fue significativo entre los tratamientos aplicados, es decir, la combinación de BAP con AIA, no tienen efecto en la longitud del tallo en explantes de *Draba obovata* Benth.

Etapa de Enraizamiento

Porcentaje de enraizamiento

En el presente estudio se utilizó un medio de cultivo con diferentes concentraciones de AIA, una auxina, con el fin de favorecer el desarrollo de raíces en explantes de *Draba obovata* Benth., los resultados obtenidos indican que la presencia de la auxina a una concentración determinada, en este caso 0.5 mg/L de AIA, favorece el desarrollo de raíces en esta especie, como se puede visualizar en la Figura 23. Se sabe que las auxinas son hormonas vegetales con un papel fundamental en la regulación de aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como son la elongación y división celular (Hu et al., 2017).

Se ha observado que las auxinas son esenciales en la regulación del sistema radicular debido a que controlan el alargamiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales (Alarcón et al., 2019).

En la etapa de enraizamiento de la especie *Brassica oleracea* var. *capitata* perteneciente a la familia Brassicaceae, Gerszberg et al. (2015) utilizaron medio MS suplementado con diferentes concentraciones de la auxina AIA (0, 2.68, 5.37 y 8.05 μ M). Sus resultados indican que la presencia de la auxina en el medio de cultivo mejora la cantidad y calidad de las raíces desarrolladas. Sin embargo, en ausencia de auxina, también se desarrollan raíces. A diferencia de lo obtenido en el presente estudio, donde se

puede evidenciar que, en ausencia de la auxina AIA, los explantes de *Draba obovata* Benth. no desarrollaron raíces. Incluso a la concentración más baja aplicada de AIA, los explantes de *Draba obovata* Benth. continúan sin desarrollar raíces, como se puede visualizar en la Figura 23.

En el mismo estudio realizado por Gerszberg et al. (2015) se observa que el porcentaje de explantes que desarrollan raíces en la especie *Brassica oleracea* var. *capitata* aumenta conforme aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo. Sin embargo, este porcentaje disminuye cuando se alcanza la concentración máxima utilizada en el estudio, de 8.05 μ M. En el presente estudio se observó un patrón similar, se aplicaron tres concentraciones de AIA (0.2, 0.5 y 1 mg/L) y se evidenció que el mayor porcentaje de explantes de *Draba obovata* Benth. que presentaban raíces se obtenía con la concentración de 0.5 mg/L de AIA, con un valor de 66.67%. Sin embargo, al aumentar esta concentración a 1 mg/L de AIA, el porcentaje de plantas de *Draba obovata* Benth. que presentaban raíces disminuía a valores de 6.67%, como se puede visualizar en la Figura 23.

Para la etapa de enraizamiento de la especie *Lepidium draba* L., Zinhari et al. (2017) utilizan el medio de cultivo MS suplementado con 0.2 mg/L de ANA. Obteniendo un porcentaje de explantes enraizados cercano al 100%. A diferencia de lo obtenido en el presente estudio, donde el mayor porcentaje de explantes de *Draba obovata* Benth. que presentaban raíces, fue del 66.67%, en el medio de cultivo suplementado con 0.5 mg/L de AIA, ya que, a concentraciones superiores de AIA, el desarrollo de raíces disminuyó a 6.67%, como se puede visualizar en la Figura 23.

En el estudio realizado por Saxena et al. (2021) se probaron dos tipos de auxinas en la etapa de enraizamiento de la especie *Draba yukonensis*., ANA e IBA (Ácido Indol Butírico) a diferentes concentraciones (0, 2, 5, 10 y 20 μ M), Los resultados obtenidos indican que la presencia de ANA en el medio de cultivo desencadenó el desarrollo de callos en el explante, mientras que, la presencia de IBA desencadenó el desarrollo de raíces a las concentraciones más altas utilizadas, 10 y 20 μ M. En el presente estudio, la aplicación de la

auxina AIA para el desarrollo de raíces en *Draba obovata* Benth. no desencadenó la formación de callos a ninguna de las concentraciones utilizadas. Por otro lado, la concentración óptima para el desarrollo de raíces en explantes de *Draba obovata* Benth. fue a 0.5 mg/L de AIA, como se puede visualizar en la Figura 23.

El efecto de la auxina AIA en el enraizamiento de plantas ha sido documentado en otras especies como es el caso de *Gigantochloa atter* (Hassk.) Kurz. perteneciente a la familia Poaceae, cuyos explantes fueron sembrados en medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de AIA (15, 20 y 25 mg/L). Los resultados obtenidos indican que conforme se aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo también aumenta el número de plantas que presentan raíces. Obteniéndose el mayor porcentaje de explantes con raíces, con un valor de 96%, a la concentración de 20 mg/L de AIA. Sin embargo, se puede evidenciar que al aumentar esta cantidad a 25 mg/L, el porcentaje de explantes que presentan raíces disminuye (García et al., 2015). Algo similar se observó en los explantes de *Draba obovata* Benth., en donde el mayor porcentaje de explantes que presentaban raíces, con un valor de 66.67%, se obtuvo a la concentración de 0.5 mg/L de AIA. Sin embargo, al aumentar este valor a 1 mg/L, el porcentaje de explantes con raíces disminuyó a 6.67%, como se puede visualizar en la Figura 23. Esto nos da un indicio de que el uso de auxinas en el medio de cultivo debe darse a una concentración adecuada para lograr el objetivo buscado, en este caso el desarrollo de raíces. Si se tiene una concentración inferior o superior a la adecuada, el desarrollo de raíces se ve afectado.

Otro estudio donde se utiliza la auxina AIA para enraizamiento fue realizado por Jiménez-Mariña et al. (2019) en la especie *Dahlia* sp. perteneciente a la familia Asteraceae. En este estudio se utilizaron tres concentraciones de AIA (0.1, 0.5 y 1 mg/L) y se observó que el mayor porcentaje de explantes enraizados fue a la concentración de 0.5 mg/L de AIA, con un valor de 87.5%. Sin embargo, al aumentar esta concentración a 1 mg/L, el porcentaje de explantes enraizadas disminuyó a un valor de 14.29%. En el presente estudio se obtuvo un resultado similar, el mayor porcentaje de explantes de *Draba obovata* Benth.

que presentaban raíces, con un valor de 66.67%, se logró con la concentración de 0.5 mg/L de AIA. Mientras que, al aumentar la concentración de AIA a 1 mg/L, este porcentaje disminuyó. Además, en el presente estudio en ausencia de la auxina AIA y con la concentración más baja utilizada de AIA (0.2 mg/L) no se obtuvieron explantes de *Draba obovata* Benth. enraizados, como se puede visualizar en la Figura 23. A diferencia de otros estudios, en donde los explantes en ausencia de AIA y con las concentraciones más bajas, desarrollan raíces. Como se sabe en muchas especies vegetales existe la presencia de auxinas endógenas que pueden promover el desarrollo de las raíces en las especies vegetales (García et al., 2015); (Jiménez-Mariña et al., 2019). En el caso de *Draba obovata* Benth. se evidenció que la presencia de la auxina AIA es necesaria para el desarrollo de raíces, ya que, en su ausencia no se evidencia la formación de estas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración de la auxina AIA debe ser adecuada para favorecer el desarrollo de las raíces en *Draba obovata* Benth.

El presente trabajo se convierte en una base para futuros estudios en la especie *Draba obovata* Benth. Mediante este estudio se han desarrollado exitosamente las etapas 0, 1, 2 y 3 del cultivo *in vitro* de especies vegetales. Los resultados obtenidos son favorables para establecer *in vitro* la especie *Draba obovata* Benth., y que a futuro pueda ser utilizada en procesos de restauración ecológica. Como sabemos, la especie se encuentra amenazada y su conservación es importante. Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se podrá introducir *in vitro* la especie *Draba obovata* Benth., para obtener un banco de plantas *in vitro* que puedan ser utilizadas en futuros proyectos.

Capítulo VI: Conclusiones

- El protocolo de desinfección óptimo para las semillas de *Draba obovata* Benth.
consto de detergente al 2% durante 15 minutos, seguido de etanol al 70% durante 1 minuto y una concentración de 2.5 % de hipoclorito de sodio, con un tiempo de inmersión de 10 minutos (tratamiento T5), se obtuvo un porcentaje de contaminación y oxidación del 0%.
- Para la etapa de germinación *in vitro* de las semillas de *Draba obovata* Benth. se estableció el medio de cultivo MS al 100% suplementado con 30 g/L de sacarosa (tratamiento G6), con un porcentaje de germinación del 86.67%.
- En la etapa de multiplicación la mejor combinación de hormonas vegetales fue con una concentración de 3 mg/L BAP y 1 mg/L AIA (tratamiento M6), en donde se obtuvo un promedio de 3.13 brotes por explante.
- El tratamiento E2 con una concentración de 0.5 mg/L de AIA, resultó efectivo para el desarrollo de raíces en explantes de *Draba obovata* Benth. con un porcentaje de enraizamiento de 66.67%.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda el uso de otros agentes desinfectantes como el hipoclorito de calcio que es ampliamente utilizado en ciertas especies de la familia Brassicaceae para el proceso de desinfección de semillas y otros tipos de explantes empleados en el cultivo *in vitro*.
- En el caso de que las semillas presenten latencia se pueden utilizar tratamientos pre germinativos que permiten romper esta latencia. Los cuales pueden ser aplicados antes o después del tratamiento de desinfección y cuyo objetivo principal es mejorar la tasa de germinación de las semillas.
- Para la etapa de multiplicación se recomienda la combinación de BAP con otras auxinas como ANA, que han dado buenos resultados en diferentes especies pertenecientes a la familia Brassicaceae, de tal manera que se pueda establecer nuevas combinaciones para la inducción de brotes y sobretodo en la elongación de tallos en *Draba obovata* Benth.
- Para la etapa de enraizamiento se recomienda utilizar otras auxinas, como ANA, que ha sido utilizada en otras especies de la familia Brassicaceae, obteniendo porcentajes de explantes enraizados cercanos al 100%. De tal manera, que se pueda determinar la auxina óptima que generé mayores porcentajes de explantes enraizados de *Draba obovata* Benth.

Capítulo VIII: Referencias Bibliográficas

Bibliografía

- Afonso, M., Chaminé, H., Marques, J., Carreira, P., Guimaraes, L., Guilhermino, L., Gomes, A., Fonseca, P., Pires, A., & Rocha, F. (2010). Environmental issues in urban groundwater systems: A multidisciplinary study of the Paranhos and Salgueiros spring waters. *Porto(NW Portugal) Environmental earth sciences*, 61(379-392).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12665-009-0351-7>
- Aguir, S., Gavilanes, L., & Chancay, X. (2008). EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA MALANGA (*Xanthosoma sagittifolium* (L) schott). *Ciencia y Tecnología*, 1, 17-21.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18779/cyt.v1i1.66>
- Aguirre, N., Torres, J., & Velasco-Linares, P. (2013). *Guía para la restauración ecológica en los páramos del Antisana*.
- Aires, A. (2015). Chapter 3-Brassica Composition and Food Processing. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 17-25). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00003-2>
- Alarcón, M., Salguero, J., & Lloret, P. (2019). Auxin Modulated Initiation of Lateral Roots Is Linked to Pericycle Cell Length in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 10.
<https://doi.org/https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00011>
- Alegría, I. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg* 16.
- Alvarado-Capó, Y., Capó, Y., Martín, M., González, N., Suárez, M., & Mora, M. (2004). Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar. *Bioteología Vegetal*.
<https://doi.org/https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/409>

- Aragón, C., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2009). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46, 89–94.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Arroyo, M., & Cavieres, L. (2013). High-Elevation Andean Ecosystems. En S.A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (págs. 96-110).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00428-7>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*.
https://www.researchgate.net/publication/41035142_Problemas_de_oxidacion_y_oscurecimiento_de_explantes_cultivados_in_vitro
- Beltrán, K. (2009). *Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador*. Flacso Andes.
<https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/118750-opac>
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2015). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales.
- Bhalla, P., & De Weerd, N. (1999). *In vitro* propagation of cauliflower, Brassica oleracea var. Botrytis for hybrid seed production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56, 89-95.
<https://doi.org/10.1023/A:1006221218191>
- Bhatia, P., & Nanjappa, A. (2008). Improving the Quality of *in vitro* Cultured Shoots of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Red Coat). *Science Alert*.
<https://doi.org/10.3923/biotech.2008.188.193>
- Bhatia, S. (2015). Chapter 2-Plant Tissue Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical*, 31-107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Borges García, M., García, M., Araluce, C., Rubio, Y., Rodríguez, S. M., & Fera, R. V. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro*

- de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología Vegetal*, 4, 4.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/434>
- Buytaert, W., Céleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1), 53-72. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>
- Cáceres, B. (2010). *Actualización del inventario de tres casquetes glaciares del Ecuador*.
- Cardona, A. (2021). *Ecuador: El agua y el cóndor andino convirtieron a Antisana en parque nacional*. Noticias ambientales: <https://es.mongabay.com/2021/08/ecuador-agua-condor-antisana-parque-nacional/>
- Ccuno, C. M., Anco, L. M., & Alvarez, R. B. (2021). Reguladores de Crecimiento (BAP y ANA) en la Propagación in vitro de Queñoa (*Polylepis rugulosa* Bitter). *Manglar*, 18(2), 207-213. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.028>
- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y. A., Huang, S., & Gmitter, F. G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. TAG. *Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 112(7), 1248-1257.
<https://doi.org/10.1007/s00122-006-0226-1>
- Chuncho, G. (2019). *Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión*.
- Coppus, R., Nonhebel, M., Mera, V., León-Yáñez, S., Hofstede, R., Wolf, H. D., Vásconez, P., & Medina, G. (2001). El estado de salud de algunos páramos en el Ecuador: Una metodología de campo. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-conservation-status-of-tussock-grass-páramo-in-Hofstede-Coppus/b30653fff77bb82610914ba46b4a1cf329c252f0>
- Cortes, J. S., Pérez, M. G., & Mora, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1(1). <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Cruz, F. (2012). *Micropropagación (Manual de prácticas)*. Cautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores.

- Cruz, R. (2009). *Gente y ambiente de páramo*. FlacsoAndes.
<https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/112316-opac>
- Curiel, J., Heres, A., Ojeda, G., Paz, A., Pizano, C., García-Angulo, & Lasso, E. (2017). Soil heterotrophic CO₂ emissions from tropical high-elevation ecosystems (Paramos) and their sensitivity to temperature and moisture fluctuations. *Soil Biology and Biochemistry*, 110, 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.016>
- Díaz-Chuquizuta, P., Valdés-Rodríguez, O. A., Tello-Salas, C., & Valdés-Rodríguez, O. A. (2017). Germination responses in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds to pregerminative treatments. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 23(2), 89-96.
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.10.027>
- ECOLAP, & MAE. (2007). *Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador*.
- Encina, C. L., & Padilla, I. M. (1996). A propósito de semillas. Encuentros en la Biología.
- Engler, R., Randin, C. F., Thuiller, W., Dullinger, S., Zimmermann, N. E., Araújo, M. B., Pearman, P. B., Le Lay, G., Piedallu, C., Albert, C. H., Choler, P., Coldea, G., De Lamo, X., Dirnbock, T., Gégout, J. C., Gómez-García, D., Grytnes, J. A., Heegaard, E., Hoistad, F., & Guisan, A. (2011). 21st century climate change threatens mountain flora unequally across Europe. *Global Change Biology*, 17(7), 2330-2341.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02393.x>
- Eras-Guamán, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., & Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona Officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 58-68.
- Espinosa, J., Moreno, J., & Bernal, G. (2018). *The Soils of Ecuador*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-25319-0>
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13(2), 113-117. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402002000200007>
- Estrella, R. (2003). *Biología y Ecología*. Radmaní.

- Farooq, N., Nawaz, M. A., Mukhtar, Z., Ali, I., Hundleby, P., & Ahmad, N. (2019). Investigating the *In Vitro* Regeneration Potential of Commercial Cultivars of Brassica. *8(12)*, 558. <https://doi.org/10.3390/plants8120558>
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *28(1)*, 1- 4. <https://doi.org/10.1007/BF02632183>
- Figueroa, J. A., & Jaksic, F. M. (2004). Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central. *Revista chilena de historia natural*, *77(1)*, 201-215. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100016>
- FONAG. (2008). *Actualización del plan de manejo del Área de Conservación Hídrica Antisana* .
- Francis, A., & Warwick, S. I. (2008). The biology of Canadian weeds. 3. *Lepidium draba* L., *L. chalepense* L., *L. appelianum* Al- Shehbaz. *Canadian Journal of Plant Science*, *88(2)*, 379-401. <https://doi.org/10.4141/CJPS07100>
- García, Y., Freire Seijo, M., & Pérez, B. (2015). Efecto del AIA en el enraizamiento *in vitro* de *Gigantochloa atter* (Hassk.) Kurz. *Biotecnología Vegetal*, *15(3)*, 181-185.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., & Kowalczyk, T. (2015). *In vitro* regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *Capitata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, *51(1)*, 80-87. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9648-7>
- Gómez, E. (2005). *Cambios y transformaciones en el suelo del bioma de páramo por el cambio climático*. https://kipdf.com/cambios-y-transformaciones-en-el-suelo-del-bioma-de-páramo-por-el-cambio-climati_5b0235558ead0ef35d8b45d2.html
- Gómez-Merino, F. C., Vidal-Morales, B., Trejo-Téllez, L. I., & Silva, C. M. (2010). Escarificación y germinación *in vitro* de semillas de heliconias. *Universidad y ciencia*.
- GreenFacts. (2021). *Desertificación: ¿Cómo podemos evitar o revertir la desertificación?* <https://www.greenfacts.org/es/desertificacion/l-2/6-prevencion-sostenibilidad.htm>
- Hameg, R., Arteta, T. A., Landin, M., Gallego, P. P., & Barreal, M. E. (2020). Modeling and Optimizing Culture Medium Mineral Composition for *in vitro* Propagación of *Actinidia*

arguta. *Frontiers in Plant Science*, 11.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.554905>

- Handayani, E., Irsyadi, M. B., Alawiyah, R. L., & Aris, I. (2022). Effect of Explants Sterilization and Plant Growth Regulators on Embryo Culture of Kepel (*Stelechocarpus burahol*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 985(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/985/1/012016>
- Hedberg. (1994). *Features of Afroalpine Plant Ecology*. <https://www.nhbs.com/features-of-afroalpine-plant-ecology-book>
- Hill, K., & Schaller, G. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10). <https://doi.org/10.4161/psb.25709>
- Hofstede, R. (1995). *The effects of grazing and burning on soil and plant nutrient concentrations in Colombian paramo grasslands*. SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00155524>
- Hofstede, R., & Llambí, L. (2019). *Plant Diversity in Parámo-Neotropical High Mountain Humid Grasslands*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11858-5>
- Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., Wang, X., Deng, Z., Xie, S., McAvoy, R. J., & Li, Y. (2017). Endogenous auxin and its manipulation influence in vitro shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. *Horticulture Research*, 4. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.71>
- Hughes, C., & Eastwood, R. (2006). Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10334-10339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601928103>
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50568>

- Jain, P., Kachhwaha, S., & Kothari, S. (2012). Optimization of micronutrients for the improvement of *in vitro* plant regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 486-490.
- Jiménez-Mariña, L., Fonseca-Arias, M., García-Alcántara, A., Infante-Fonseca, S., & Vázquez-Rodríguez, J. (2019). Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de *Dahlia sp.* *Cultivos Tropicales*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=13d19d0a-b8c3-4809-9f4f-ab3e30f25e45>
- Jorgensen, P., & Ulloa, U. (2002). *Seed plants of the high Andes of Ecuador: A checklist*. <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19946797950>
- Kaya, Y., Aksakal, O., Sunar, S., Erturk, F. A., Bozari, S., Agar, G., Erez, M. E., & Battal, P. (2015). Phytotoxic effect of *Lepidium draba* L. extracts on the germination and growth of monocot (*Zea mays* L.) and dicot (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Toxicology and Industrial Health*, 31(3), 247-254. <https://doi.org/10.1177/0748233712471702>
- 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 Paramo catchments. *Journal of Hydrology*, 572, 805-819. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2019.03.050>
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa-Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador*.
- León-Yáñez, S., & Pitman, N. (2003). *IUCN Red List of Threatened Species: Draba obovata*, *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Liu, Z., Bi, W.-L., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2022). *In vitro* Technologies for American Chestnut (*Castanea dentata*(Maeshall) Borkh) Conservation. *Plants*, 11(3), 464. <https://doi.org/10.3390/plants11030464>
- Llambí, L., Soto Werschitz, A., Célleri, R., De Bièvre, B., Ochoa-Tocachi, B., & Borja, P. (2012). *Ecología, Hidrología y Suelos del Páramo*.

- López, S., Wright, C., & Constanza, P. (2017). Environmental change in the equatorial Andes: Linking climate, land use, and land cover transformations. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 8, 291-303.
<https://doi.org/10.1016/j.rsase.2016.11.001>
- MacDonald, I., & Omoruyi, O. (2003). Effect of Seed Pre-treatment on Germination of Two Surface Types of *Dialium guineense*. *Seed Technology*, 25(1), 41- 44.
- Masache, E. N., & Meneses, J. G. (2018). *Evaluación de la eficiencia fotosintética en el cultivo in vitro de Brassica oleracea var. Italica*.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15692>
- Mena, P., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). *Los Páramos del Ecuador: Particularidades, problemas y perspectivas*. Abya Yala/Proyecto Páramo.
- Mena-Vásconez, P., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). Los páramos del Ecuador. Particularidades, problemas y perspectivas. *Mnemosyne*.
- Monsalve, C. (2003). *Taxonomía y Distribución de la Familia Brassicaceae en la provincia de Huaylas, Ancash*.
- Mora, A. (2008). *Acciones para la conservación de plantas: Amenazas, retos y perspectivas*.
<https://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/issue/archive>
- Morocho, C. C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71-83.
- Mosquera, G. M., Segura, C., Vaché, K. B., Windhorst, D., Breuer, L., & Crespo, P. (2016). Insights into the water mean transit time in a high-elevation tropical ecosystem. *Hidrology and Earth System Sciences*, 20(7), 2987-3004.
<https://doi.org/10.5194/hess-20-2987-2016>
- Mroginski, L. A., & Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In *Internacional Center for Tropical Agriculture*.
<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54686>

- Munshi, M., Roy, P., Kabir, M., & Ahmed, G. (2007). In vitro Regeneration of Cabbage (*Brassica oleracea* L var. Capitata) through Hypocotyl and Cotyledon Culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v17i2.3233>
- Murillo-Gómez, P. A., Naranjo, E., Callejas, R., Atehortúa, L., & Urrea, A. (2014). Micropropagación of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. For conservation purposes. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 334-340. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.46809>
- Noboa Silva, V. F. (2011). Efecto de seis tipos de Sustratos y tres dosis de Ácido a Neftalenacético en la propagación vegetativo de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/713>
- Orquera Delgado, G. X. (2013). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de chuquiragua (Chuquiraga jussieu) a partir de yemas apicales y axilares*. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/7167>
- Palacios, W. (2015). Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito. *MECN-INB*.
- Panchev, V., & Ivanova, V. (2018). Vegetative Behaviors of the Linden (*Tilia* spp.) Seedlings. 18, 167. <https://doi.org/10.7251/AGREN1703167P>
- Patiño, C. (2020). *Desarrollo de un protocolo de micropropagación in vitro de Lupinus microphyllus como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana*. <http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/handle/123456789/20884>
- Pérez, S. J., & Valdivieso, C. D. (2007). *Colección y caracterización morfológica in situ del mortiño (Vaccinium floribundum Kunt) en la sierra norte de Ecuador*. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2585>
- Pita, M., & Pérez, F. (2006). *Germinación de semillas*.
- Podwojewski, P., & Poulénard, J. (2006). *Los suelos de los páramos del Ecuador*.
- Poulénard, J., Podwojewski, P., Janeau, J.-L., & Collinet, J. (2001). Runoff and soil erosion under rainfall simulation of Andisols from the Ecuadorian Páramo: Effect of tillage and burning. *CATENA*, 45(3), 185-207. [https://doi.org/10.1016/S0341-8162\(01\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0341-8162(01)00148-5)

- Praveen, S. (2022). *In vitro Conservation of Endangered and Value-Added Plant Species*.
https://www.mdpi.com/journal/plants/special_issues/vitro_conservation_endangered_plant
- Qasem, J. R. (2004). Allelopathic plants:11. *Cardaria draba* (L.) Desy. *Allelopathy Journal*, 13, 165-172.
- Quijala, E., Montalvo, G., & Matos, J. (2004). Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal*, 4(4).
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/426>
- Ramírez-Gill, J. G. (2016). Tratamientos pregerminativos y masa de la semilla como estrategia para mejorar la producción de plántulas de aguacate raza Guatemalteca. *Cultivos Tropicales*, 37(4), 115-125. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31149.28648>
- Rezvani, M., & Zaefarian, F. (2016). Hoary cress (*Cardaria draba* (L.) Desy) seed germination ecology, longevity and seedling emergence. *Plant Species Biology*, 31(4), 280-287. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12113>
- Ribas, L. F., Guerra, M. P., Zanette, F., & Kulchetscki, L. (2000). Somatic Embryogenesis in *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (J. S.M, G. P.k, & N. R.J, Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 6, 509-537. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3030-3_17
- Ríos-Ramirez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Concentración de bencilaminopurina y ácido indolacético en la proliferación *in vitro* de brotes adventicios de *Agave angustifolia*. *Ciencia e investigación agraria*, 44(3). <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>
- Roca, W., Arias, D. I., & Chavez, R. (1991). *Métodos de conservación in vitro del germoplasma*. International Center for Tropical Agriculture.
<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/55096>
- Rodríguez, S., García, M., Abeal, E., & Rodríguez, I. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127-135. <https://doi.org/ISSN1909-8758>

- Román, F. (2013). *Salud Ambiental y Social del Páramo en el Ecuador*.
- Roni, M. z., Islam, M. S., & Shimasaki, K. (2018). *In vitro* seed germination and tracking the seedling growth of eustoma. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 46(3), 224–242. <https://doi.org/10.1080/01140671.2017.1391300>
- Saad, A. I., & Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50569>
- Salgado, S., & Cárete, D. (2010). *Caracterización de la composición y estructura de la vegetación para la provincia de Chimborazo*.
- Samec, D., & Salopeck-Sondi, B. (2019). Chapter 3.11- Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables. (M. N. S, & S. S. A, Eds.) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 195-202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8>
- Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205.
- Saxena, A. W.-L., Shukla, M., Cannings, S., Bennett, B., & Saxena, P. (2021). Micropropagation and Cryopreservation of Yukon Draba (*Draba yukonensis*), a Special Concern Plant Species Endemic to Yukon Territory, Canada. *Plants*, 10, 2093. <https://doi.org/10.3390/plants10102093>
- Shimizu-Sato, S., Tanaka, M., & Mori, H. (2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 429-435. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- Solano Ortiz, K. J. (2021). *Tratamientos pre germinativos en semillas de Legenaria siceraria Molina Standl*. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5819>
- Soliman, A. S. (2019). Plant Growth Hormones. *Cell Growth*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84350>
- Stanisavljevic, A., Bosnjak, D., Ivna, S., Vukovic, R., Kujundzic, T., & Dreanjanecvic, M. (2017). Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6p and

- Gisela 6 cherry rootstock. *Poljoprivreda*, 23, 31-37.
<https://doi.org/10.18047/poljo.23.2.5>
- Suárez, E. (2009). *Foro electrónico: Mejores prácticas en los páramos andinos: Contexto y ordenamiento territorial*.
- Sudhersan, C., AboEl-Nil, M., & Hussain, J. (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *Journal of Arid Environments*, 54(1), 133-147. <https://doi.org/10.1006/jare.2001.0884>
- Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, J., Núñez, A., Acurio, R. D., & Chiluisa-Utreras, V. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación *in vitro* de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento. *Bionatura*, 3(3), 675-664.
<https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.5>
- Varela, F. (2018). *Etapas de micropropagación/ No.124/2018*. TecnoAgro.
<https://tecnoagro.com.mx/no.-124/etapas-de-micropropagacion>
- Vargas, O., & León, O. (2022). *La restauración ecológica en los páramos*.
- Vargas, O., & Velasco, P. (2011). *Reviviendo nuestros páramos*. FlacsoAndes.
- Vargas, O., Reyes, P., Gómez, P., & Díaz, J. (2010). *Guía técnica para la restauración ecológica de ecosistemas*. SINIA Sistema Nacional de Información Ambiental.
<https://sinia.minam.gob.pe/documentos/guia-tecnica-restauracion-ecologica-ecosistemas>
- Vásconez, P. (2011). *Páramo*. FlacsoAndes. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/126185-opac>
- Vasil, I. (2014). A history of plant biotechnology: From the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant Cell. *Teoría de la Evolución, Ideología y Reduccionismo: Un enfoque Dialéctico*.
<https://teoriaevolutiva.wordpress.com/2014/04/10/vasil-i-2008-a-history-of-plant-biotechnology-from-the-cell-theory-of-schleiden-and-schwann-to-biotech-crops-plant-cell-rep-2714231440/>

- Verdezoto, N. E. (2017). Composición florística y diversidad de la ladera norte en el sector arista del Illiniza Sur, reserva ecológica Illinizas .
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/13129>
- Villa, J. A., Mejía, G. M., Velásquez, D., Botero, A., Acosta, S. A., Marulanda, J. M., Osorno, A. M., & Bohrer, G. (2019). Carbon sequestration and methane emissions along a microtopographic gradient in a tropical Andean peatland. *Science of The Total Environment*, 654, 651-661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.109>
- Viveros, H., Hernández Palmeros, J. D., Velasco García, M. V., Robles Silva, R., Ruiz Montiel, C., Aparicio Rentería, A., Martínez Hernández, M., Hernández, V. J., & Hernández, M. L. (2015). Análisis de semilla, tratamientos pre germinativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su crecimiento inicial. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(30), 52-65.
- vonHagen, K. B., & Kadereit, J. W. (2003). The Diversification of *Halenia* (Gentianaceae): Ecological Opportunity Versus Key Innovation. *Evolution*, 57(11), 2507-2518.
- Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2002). Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 103-104.
<https://doi.org/10.1023/A:1012966218478>
- Yáñez, S. (2018). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*.
<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/páramos/>
- Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). 89(6), 259-261.
<https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6>
- Yin, J. H., Xion, Y. J., & Qiu, G. Y. (2017). Effects of land use /land cover and climate changes on surface runoff in a semi-humid and semi-humid and semi-arid transition zone in northwest China. *Hydrology and Earth System Sciences*, 21(1), 183-196.
<https://doi.org/10.5194/hess-21-183-2017>

Zinhari, Z., Pourseyedi, S., & Zolano, J. (2017). A novel *in vitro* transformation of *Lepidium draba* L. using rapid direct shoot regeneration. *Biotech*, 7(5), 284.