



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

“Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en Ecuador”

Jiménez Balarezo, Cinthya Gabriela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Segovia Salcedo, María Claudia

Enero del 2022



Proyecto de titulación Cinthya Jimenez.docx

Scanned on: 0:19 January 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	95
Words with Minor Changes	48
Paraphrased Words	179
Ommited Words	0



Escaneado y verificado por:
MARIA CLAUDIA
REGOVIA
SALCEDO



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, **“Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en Ecuador”** fue realizado por la señorita **Jiménez Balarezo Cinthya Gabriela**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido. Por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de enero del 2021



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

Segovia Salcedo María Claudia, PhD

CI. 1709055998



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Jiménez Balarezo Cinthya Gabriela**, con cédula de ciudadanía N° 1722536982, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación, "**Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en Ecuador**" es de mi autoría y responsabilidad. Por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 24 de febrero del 2022



Jiménez Balarezo, Cinthya Gabriela

CI. 1722536982



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Jiménez Balarezo Cinthya Gabriela**, con cédula de ciudadanía N° 1722536982, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación, "**Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en Ecuador**" en el Repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de febrero del 2022

Jiménez Balarezo, Cinthya Gabriela

CI. 1722536982

Dedicatoria

A mi madre, Alicia, por su amor, trabajo, sacrificio y apoyo incondicional a través de este largo camino de vida que me ha llevado a alcanzar mis metas.

A mi padre, Gilberth, que siempre ha estado presente brindándome su cariño y apoyo para poder culminar mi carrera.

Gracias a mis padres por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, responsabilidad y lucha ante las adversidades.

A toda mi familia que ha estado siempre presente con su apoyo a lo largo de mi vida y carrera universitaria.

A mi fiel compañera Sombra que ha estado en los momentos difíciles y todos los desvelos.

Agradecimiento

Quiero agradecer a mi directora María Claudia Segovia, PhD por su guía profesional, por brindarme siempre su apoyo y por su gran paciencia a lo largo del desarrollo de mi trabajo de investigación.

Gracias a la Ing. Marianela Mariño por su guía y presencia durante el desarrollo del proyecto.

Gracias a mis mejores amigos que han estado siempre presente a lo largo de mi carrera universitaria dándome su apoyo y ayuda incondicional Leo y Zasky.

Me gustaría agradecer a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, al proyecto BIO-GEEC por su apoyo financiero y al Instituto Nacional de Biodiversidad – INABIO por darme la apertura para el uso de sus laboratorios y así lograr concluir mi trabajo de investigación.

Índice de Contenidos

Informe Copyleaks	2
Certificación Docente.....	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Planteamiento del problema	17
Justificación del problema	18
Objetivos	21
<i>Objetivo general</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	21
Capítulo II: Marco Teórico.....	22
Páramos, características generales	22
Importancia de los páramos.....	22
Afecciones de los páramos.....	23
Conservación <i>ex situ</i> de plantas silvestres	24

Germoplasma	24
Bancos de germoplasma de plantas	25
Las semillas y sus partes	25
Germinación	26
Factores externos que afectan la germinación	26
Factores internos que afectan la germinación	27
Germinación mediante cultivo <i>in vitro</i>	29
Desinfección del material vegetal	29
Medio de cultivo y uso de hormonas	30
Prueba de viabilidad mediante tetrazolio (TZ)	31
Descripción de la familia Valerianaceae (actualmente subfamilia Valerianoideae)	31
Fitoquímica e importancia de la familia Valerianaceae	32
Valerianas de estudio	32
<i>Valeriana microphylla</i> Kunth	32
<i>Valeriana adscendens</i> Turcz	34
<i>Valeriana laurifolia</i> Kunth	35
Capítulo III: Metodología	36
Ubicación del trabajo de investigación	36
Recolección del material vegetal	36
Manejo y conservación de las muestras vegetales	37
Identificación de las especies	37
Análisis morfológico del fruto-semilla	37

	10
Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)	38
Desinfección de semillas	39
Germinación	40
Evaluación del efecto del ácido giberélico AG₃	40
Aplicación de tratamientos de fotoperiodo	41
Aplicación de tratamientos de termoperiodo	41
Análisis estadístico de los datos	42
Capítulo IV: Resultados	43
Caracterización morfológica del fruto-semilla	43
<i>Valeriana microphylla</i>	43
<i>Valeriana adscendens</i>	44
<i>Valeriana laurifolia</i>	44
Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)	45
Análisis exploratorio de datos	45
Análisis inferencial	46
Desinfección de semillas	48
Análisis exploratorio de datos	49
Análisis inferencial	52
Germinación	53
Evaluación del efecto del ácido giberélico AG₃	55
Aplicación de tratamientos de fotoperiodo	62
Aplicación de tratamientos de termoperiodo	67
Capítulo V: Discusión	72

Capítulo VI: Conclusiones	83
Capítulo VII: Recomendaciones	84
Referencias	85

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Tratamientos del ensayo de viabilidad mediante la prueba de tetrazolio (TZ)</i>	39
Tabla 2 <i>Tratamientos del ensayo de desinfección mediante el uso de hipoclorito de sodio</i>	40
Tabla 3 <i>Tratamientos sobre el efecto del ácido giberélico en la germinación</i>	41
Tabla 4 <i>Tratamientos sobre el efecto del fotoperiodo en la germinación</i>	41
Tabla 5 <i>Tratamientos sobre el efecto del termoperiodo en la germinación</i>	41
Tabla 6 <i>Porcentaje de embriones viables respecto a los tratamientos en la prueba de tetrazolio (TZ)</i>	46
Tabla 7 <i>Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de viabilidad</i>	47
Tabla 8 <i>Análisis de datos sobre el ensayo de desinfección mediante el uso de hipoclorito de sodio</i>	50
Tabla 9 <i>Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de desinfección</i>	53
Tabla 10 <i>Análisis de datos sobre germinación respecto a la concentración de AG₃</i>	56
Tabla 11 <i>Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de germinación respecto a la concentración de AG₃</i>	61
Tabla 12 <i>Análisis de datos sobre germinación respecto a la aplicación de fotoperiodo</i>	62
Tabla 13 <i>Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de fotoperiodo</i>	67
Tabla 14 <i>Análisis de datos sobre germinación respecto a la aplicación de termoperiodo en Valeriana laurifolia</i>	68
Tabla 15 <i>Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de termoperiodo en Valeriana laurifolia</i>	71

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Estructura morfológica de Valeriana microphylla</i>	33
Figura 2 <i>Estructura morfológica de Valeriana adscendens</i>	34
Figura 3 <i>Estructura morfológica de Valeriana laurifolia</i>	35
Figura 4 <i>Mapa de la ubicación de los tres puntos de muestreo</i>	36
Figura 5 <i>Análisis morfológico del fruto-semilla de especies del género Valeriana</i> ...	38
Figura 6 <i>Fruto-semilla de Valeriana microphylla</i>	43
Figura 7 <i>Fruto-semilla de Valeriana adscendens</i>	44
Figura 8 <i>Fruto-semilla de Valeriana laurifolia</i>	44
Figura 9 <i>Embriones del género Valeriana en la prueba de tetrazolio</i>	45
Figura 10 <i>Porcentaje de embriones viables respecto a los tratamientos en la prueba de tetrazolio</i>	46
Figura 11 <i>Semillas contaminadas del género Valeriana</i>	48
Figura 12 <i>Registro de temperatura ambiente (mínima, máxima y promedio) en laboratorio durante el proceso de desinfección</i>	49
Figura 13 <i>Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en Valeriana microphylla</i>	50
Figura 14 <i>Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en Valeriana adscendens</i>	51
Figura 15 <i>Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en Valeriana laurifolia</i>	52
Figura 16 <i>Semillas germinadas y desarrollo de plántulas del género Valeriana</i>	54
Figura 17 <i>Registro de temperatura ambiente (mínima, máxima y promedio) en laboratorio durante el proceso de germinación</i>	55
Figura 18 <i>Capacidad germinativa (CG) respecto a la concentración de AG₃</i>	56
Figura 19 <i>Tiempo de latencia (TL) respecto a la concentración de AG₃</i>	57
Figura 20 <i>Velocidad de germinación (VG) respecto a la concentración de AG₃</i>	58

Figura 21 Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG ₃ para <i>Valeriana microphylla</i>	58
Figura 22 Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG ₃ para <i>Valeriana adscendens</i>	59
Figura 23 Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG ₃ para <i>Valeriana laurifolia</i>	60
Figura 24 Capacidad germinativa (CG) respecto a la aplicación de fotoperiodo	63
Figura 25 Tiempo de latencia (TL) respecto a la aplicación de fotoperiodo	63
Figura 26 Velocidad de germinación (VG) respecto a la aplicación de fotoperiodo	64
Figura 27 Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para <i>Valeriana microphylla</i>	65
Figura 28 Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para <i>Valeriana adscendens</i>	65
Figura 29 Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para <i>Valeriana laurifolia</i>	66
Figura 30 Capacidad germinativa (CG) respecto a la aplicación de termoperiodo para <i>Valeriana laurifolia</i>	69
Figura 31 Tiempo de latencia (TL) respecto a la aplicación de termoperiodo para <i>Valeriana laurifolia</i>	69
Figura 32 Velocidad de germinación (VG) respecto a la aplicación de termoperiodo para <i>Valeriana laurifolia</i>	70
Figura 33 Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de termoperiodo para <i>Valeriana laurifolia</i>	70

Resumen

El páramo es considerado único gracias a su gran diversidad y endemismo. En los páramos ecuatorianos se encuentra el 15% de toda la flora endémica del país. Sin embargo, se encuentra potencialmente amenazado. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos realizar análisis morfológicos, de viabilidad y de germinación de *Valeriana microphylla* Kunth, *Valeriana adscendens* Turcz. y *Valeriana laurifolia* Kunth. Se inició con la colecta del material vegetal en el Parque Nacional Cayambe – Coca. La morfología del fruto-semilla se describió en cuanto a tamaño, peso, estructura, forma y color. Se analizaron dos tiempos de tinción en la prueba de tetrazolio, concentración y tiempos de inmersión de NaClO óptimos para desinfección. En la germinación se probaron tres concentraciones de ácido giberélico (AG₃), fotoperiodo y termoperiodo. Las semillas de las tres especies son aquenios coronados por un vilano (6-13 filamentos), su tamaño es de 1.1 a 1.8±0.1 mm en largo y de 0.8 a 0.9±0.1 mm en ancho y su peso es de 23±1 a 27±4 mg (100 semillas). En las tres especies de estudio, el tiempo de 6 horas de inmersión en tetrazolio presentó el mayor número de embriones viables y la presencia de luz fue un factor indispensable para su germinación. El mejor tratamiento de desinfección se encuentra en un rango de concentración de NaClO de 1-2% y tiempo de inmersión de 5-10 minutos. Y un rango de concentración de AG₃ entre 2-3 mg/L estimuló la germinación. La información resultante es importante como base para el establecimiento de programas de conservación.

Palabras clave:

- **MORFOLOGÍA**
- **VIABILIDAD**
- **DESINFECCIÓN**
- **GERMINACIÓN**

Abstract

The paramo is considered unique thanks to its great diversity and endemism. In the Ecuadorian paramos, 15% of all the country's endemic flora is found. However, it is potentially threatened. The present research work had as objectives to carry out morphological, viability and germination analyzes of *Valeriana microphylla* Kunth, *Valeriana adscendens* Turcz. and *Valeriana laurifolia* Kunth. It began with the collection of plant material in the Cayambe - Coca National Park. The morphology of the fruit-seed was described in terms of size, weight, structure, shape and color. Staining two times in the tetrazolium test, optimal NaClO concentration and immersion times for disinfection were analyzed. In germination, three concentrations of gibberellic acid (GA₃), photoperiod and thermoperiod were tested. The seeds of the three species are achenes crowned by a vilane (6-13 filaments), their size is 1.1 to 1.8±0.1 mm in length and 0.8 to 0.9±0.1 mm in width and their weight is 23±1 to 27±4 mg (100 seeds). In the three study species, the 6-hour immersion time in tetrazolium presented the highest number of viable embryos and the presence of light was an essential factor for their germination. The best disinfection treatment is found in a NaClO concentration range of 1-2% and an immersion time of 5-10 minutes. And a concentration range of GA₃ between 2-3 mg/L stimulated germination. The resulting information is important as a basis for establishing conservation programs.

Key words:

- **MORPHOLOGY**
- **VIABILITY**
- **DISINFECTION**
- **GERMINATION**

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Durante el período entre 1996 y 2004 la biodiversidad mundial ha disminuido a gran velocidad. Un total de 8.321 especies vegetales se han incorporado a la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y ha habido un aumento de más del 60% en el número de plantas consideradas en peligro crítico (Bacchetta et al., 2008).

El páramo es uno de los ecosistemas más ricos del mundo, gracias a su gran diversidad y endemismo. Presenta especies adaptadas que no se encuentran en otro lugar, razón por la que es un ambiente sumamente frágil y único (MECN - INM, 2015). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha destruido y alterado la flora y la vegetación nativa, llegando a causar la extinción de especies vegetales. La actividad humana sin una adecuada planeación, como la ganadería extensiva, la agricultura, las quemadas asociadas a actividades productivas, la minería y la forestación son las causas principales de su deterioro (Vargas & Pérez, 2014).

En respuesta a la amenaza global de pérdida de diversidad biológica. En los últimos 50 años se ha generado conocimiento importante sobre su conservación y su objetivo de llegar a un desarrollo sostenible. Así ha surgido una disciplina conocida como biología de la conservación (Heywood & Iriondo, 2003). Con ello se han desarrollado técnicas *ex situ* de conservación como herramientas esenciales para proteger y custodiar especies en peligro, una de ellas es la implementación de bancos de germoplasma para conservar semillas de especies silvestres (Bacchetta et al., 2008).

En el Ecuador los páramos alcanzan una extensión de 12.500 km², de los cuales 8.000 km² sobre los 3.000 m de altura, se encuentran transformados en áreas agrícolas o degradados principalmente a causa de la actividad humana (Hofstede et al., 2002). Las principales amenazas a los páramos ecuatorianos son:

el cambio climático, la erosión del suelo, la minería, la quema y el pastoreo. Por esta razón, es esencial iniciar con planes de conservación y restauración dentro de estos ecosistemas (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019).

La vegetación de los páramos ecuatorianos se caracteriza por la ausencia de árboles y presencia de vegetación herbácea, dominada principalmente por pastos, cojines, rosetas y pequeños arbustos (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). La familia Valerianaceae (actualmente subfamilia Valerianoideae perteneciente a la familia Caprifoliaceae) (APG III, 2009) se encuentra entre la vegetación de estos ecosistemas y presenta gran importancia medicinal y ornamental. Esto se observa principalmente en el género *Valeriana*, el más diversificado en el Ecuador, representado por 35 especies de las cuales 8 son endémicas (Kutschker, 2011). La mayoría son hierbas o pequeños arbustos que crecen en los páramos y unas pocas también en el bosque andino alto (León-Yáñez & Montúfar, 2017).

El presente estudio busca establecer las bases en el desarrollo de un banco de semillas de páramo (HANS-BANK) dentro del proyecto BIO-GEEC: Consorcio alemán – ecuatoriano sobre biodiversidad: “Establecimiento de un flujo de trabajo y plataforma para el uso de códigos de barras genéticos en sistemas biológicos de relevancia pública y económica”, al proveer información relevante acerca de la morfología, viabilidad y germinación de tres especies de la familia Valerianaceae, de importancia ecológica y medicinal.

Justificación del problema

Los páramos presentan diversas funciones de gran importancia, entre ellas almacenar carbono, lo cual ayuda de manera pasiva pero importante a disminuir el efecto invernadero. Son uno de los almacenamientos de agua más importantes, debido a la acumulación de materia orgánica en sus suelos y la morfología de las especies presentes, las cuales actúan como reservorios que absorben y retienen agua. Los páramos proporcionan un enorme servicio ambiental al ser los grandes

abastecedores de agua para consumo en las comunidades localizadas a sus alrededores y en ciudades como Quito y Cuenca (MECN - INM, 2015). Cuando los suelos del páramo llegan a ser afectados, dañan el servicio hidrológico y liberan dióxido de carbono a la atmósfera, lo cual causa un aumento en la concentración de gases de efecto invernadero (Hofstede et al., 2003).

Entre las actividades más importantes y comunes que causan daños en el ecosistema páramo se encuentran, la agricultura, la ganadería y la quema de pajonales. Cerca del 40% de los páramos ecuatorianos han sido transformados en cultivos, pastos sembrados o tierras erosionadas. La mayor amenaza para la biodiversidad es la quema de grandes cantidades de páramo para abastecer al ganado con alimento fresco (Hofstede et al., 2003). Directamente el ganado introducido causa compactación del suelo provocando bajo contenido de materia orgánica y baja capacidad de retención de agua y por tanto humedad, perdiendo capacidad de infiltración (Cachiguango, 2019). La recolección de leña, hierbas medicinales y minería de la tierra, son actividades de menor frecuencia, pero de igual impacto en los páramos (Hofstede et al., 2003). Como consecuencia de toda esta actividad humana, las especies características de este ecosistema se han visto gravemente afectadas ya que presentan una limitada capacidad de regeneración natural (Cárdenas, 2013).

A pesar de que la mejor opción para proteger especies es conservar el hábitat en el que viven (*in situ*), es de suma importancia disponer de herramientas complementarias de conservación *ex situ*, con el fin de asegurar a largo plazo y en situaciones de elevada amenaza o peligro de extinción, la conservación de las especies vegetales. Para ello, los programas de conservación almacenan a largo plazo germoplasma vegetal, siendo las semillas el material más factible para la recolección, transporte, almacenamiento, reproducción y cultivo, debido a que constituyen un estadio del ciclo vital compacto, pequeño, resistente y longevo (Ortiz,

2015). Para que estos programas de conservación tengan éxito, es necesario seleccionar, tanto especies vegetales que sean de importancia para la dinámica del ecosistema como aquellas que se encuentran amenazadas (Vargas & Pérez, 2014).

La familia Valerianaceae (actualmente subfamilia Valerianoideae) ha sido utilizada activamente en la medicina, ya que presenta compuestos y metabolitos secundarios importantes como los sesquiterpenos, flavonoides, ésteres y diversos alcaloides. Algunas especies poseen ácido valeriánico y esencia de valeriana, los cuales forman parte de muchos medicamentos debido a sus propiedades tónicas y antiespasmódicas (Novara, 2012). Las propiedades curativas que se confieren a esta familia, principalmente efectos sedantes, se deben a un grupo específico y desconocido de sustancias iridoides llamadas valeriana-epoxi-triésteres (valepotriatos) (Kadereit & Bittrinch, 2016). Se han detectado usos potenciales de los valepotriatos en la medicina moderna que incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y el cáncer al inhibir la síntesis de ADN (Backlund & Moritz, 1998).

Valeriana microphylla Kunth es una especie utilizada como fármaco antiespasmolítico, reductor del estrés y sedante (Bach et al., 1993). Tradicionalmente es utilizada para tratar problemas del sistema nervioso y digestivo, dolencias reumáticas y curar el sarpullido (Romoleroux et al., 2019a). *Valeriana adscendens* Turcz. es una planta psicoactiva, puede inducir una reducción significativa de la actividad locomotora, la coordinación motora y el comportamiento estereotipado además de aumentar el sueño inducido por pentobarbital (Nencini et al., 2006). *Valeriana laurifolia* Kunth (Sin. *Valeriana pavonii* Opep.& Ende) es una planta que se ha estudiado como una alternativa terapéutica natural para atenuar los trastornos epilépticos, por lo tanto tiene efectos anticonvulsivos (Giraldo et al., 2010), y presenta también efectos de tipo sedativo y antidepresivo (Celis et al., 2007).

Objetivos

Objetivo general

Describir la morfología del fruto-semilla y determinar el porcentaje de germinación bajo condiciones controladas de las semillas de tres especies del género *Valeriana*.

Objetivos específicos

Evaluar parámetros morfológicos como tamaño (largo y ancho), peso, estructura, forma y color del fruto-semilla de *Valeriana microphylla* Kunth, *Valeriana adscendens* Turcz. y *Valeriana laurifolia* Kunth.

Ajustar el tiempo de tinción de la solución de tetrazolio para evaluar la viabilidad de las semillas del género *Valeriana* mediante esta prueba.

Determinar la influencia del hipoclorito de sodio en dos concentraciones y dos tiempos de remojo en la desinfección de semillas del género *Valeriana* mediante el porcentaje de contaminación.

Analizar el efecto sobre la tasa de germinación de las semillas bajo condiciones de fotoperiodo y termoperiodo.

Evaluar el efecto del ácido giberélico en la tasa de germinación de las semillas.

Capítulo II: Marco Teórico

Páramos, características generales

El páramo es un ecosistema neotropical, el cual se encuentra ubicado entre el límite del bosque cerrado y las nieves perpetuas, y recorre a lo largo de las cordilleras (Mena et al., 2011). Los páramos sudamericanos se encuentran distribuidos en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú, contribuyendo de forma importante a la biodiversidad de estos países. En el Ecuador, los páramos cubren aproximadamente un 6% del territorio nacional, siendo así el país con la mayor cantidad de páramos en relación a su extensión total. Debido a condiciones geológicas, climáticas y antrópicas, los páramos ecuatorianos se pueden encontrar a altitudes que van desde los 2.800 m al sur del país, hasta por sobre los 4.000 m donde se encuentran bosques cerrados (Mena & Hofstede, 2006).

Durante todo el año, el clima es estable, generalmente frío y húmedo, sin embargo, presenta cambios extremos durante el día, especialmente con una diferencia marcada entre la mañana y la noche. A una altura de 3.900 m la temperatura puede variar desde 30°C hasta 0°C (Mena et al., 2011). Las condiciones climáticas extremas, la gran altitud, así como la incidencia de neblina e irradiación solar, han generado una gran biodiversidad paramera especialmente en plantas (Mena & Hofstede, 2006). En los páramos de Ecuador existen 1.500 especies de plantas vasculares de las cuales 628 son endémicas, es decir el 15% de toda la flora endémica del país (Mena et al., 2011).

Importancia de los páramos

La importancia del páramo se puede evidenciar en las diversas funciones que cumple en el medio (Camacho, 2013). En primer lugar, este ecosistema tiene un importante valor científico y ecológico, gracias a la presencia de seres vivos excepcionales y singulares, que se han adecuado a las condiciones físico-químicas y climáticas del páramo a través de adaptaciones morfológicas. Esta preparación

evolutiva ha resultado en que una gran cantidad de sus especies no se puedan encontrar en ningún otro ecosistema en el mundo (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019), debido a ello, los páramos actúan como grandes bancos genéticos de plantas andinas (MECN - INM, 2015). Adicionalmente, la mayoría de especies faunísticas, en particular mamíferos y aves, aprovechan el páramo como un corredor biológico para desempeñar sus actividades en otras zonas de vida (Hofstede et al., 2003).

Los páramos presentan una gran cantidad de servicios ambientales, entre ellos destacan la regulación de las cuencas hidrológicas y el suministro de agua potable (Cárdenas, 2013). El páramo tiene la capacidad de almacenar y regular el agua que recibe tanto de las precipitaciones como del descongelamiento de la nieve y el hielo (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Esta propiedad es resultado de dos puntos importantes, primero la estructura de la vegetación que permite la captación de agua y su conducción al suelo y segundo el carácter humífero del suelo gracias a la acumulación de materia orgánica, causado por las bajas temperaturas y ceniza volcánica, convirtiéndose en esponjas naturales con la capacidad de acumular hasta dos veces su peso seco en agua (Hofstede et al., 2003). Los páramos son los sumideros más importantes de carbono, su gran capacidad para almacenarlo, ayuda a regular el clima, a retener el agua y a controlar el calentamiento global (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019).

Afecciones de los páramos

A lo largo de los años, los páramos ecuatorianos se han enfrentado a varias amenazas que provocan la erosión de sus suelos, causando modificaciones en sus funciones y capacidades. Entre ellas, está el cambio de uso del suelo para generar sistemas agrícolas, lo que causa, disminución de la capacidad de retención del agua, disminución de la cantidad total del agua disponible y pérdida de la capacidad de regulación del agua en las cuencas de los páramos. Adicionalmente, enfrentan un aumento de escorrentía y erosión, disminución de conductividad hidráulica y

formación de agregados de suelo hidrofóbicos, debido a la quema y pastoreo intensivo (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019).

Una amenaza inminente en el Ecuador es la minería, debido a que se encuentra en proceso de consolidarse como país minero. Cerca de un 28% de los páramos podrían estar afectados si se consideran los proyectos mineros en proceso de trámite (Kuhn, 2011). Finalmente, el cambio climático con el aumento de la temperatura media anual y el cambio en la intensidad y frecuencia de las precipitaciones, es otra amenaza para la capacidad de los páramos de retener y almacenar carbono, así como la capacidad de los glaciares para mantener el suministro de agua, especialmente en los páramos más secos (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019).

Conservación *ex situ* de plantas silvestres

La conservación de la biodiversidad vegetal, nace con la práctica de recolección, almacenamiento y uso de semillas. Al observarse el problema creciente de pérdida de biodiversidad de plantas silvestres, se estableció la necesidad de crear bancos de germoplasma para su conservación. De esa manera, la conservación *ex situ* nos permite proteger y custodiar una gran cantidad de especies endémicas, en peligro de extinción y de importancia biológica, morfológica o medicinal, evitando su desaparición (Bacchetta et al., 2008).

Germoplasma

Puede definirse como cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra. Representa el fundamento de la transmisión genética, en donde se encuentra la suma de los genes que rigen la herencia. En cuanto al germoplasma vegetal, se pueden mencionar distintas estructuras como esporas, tejidos o partes de plantas, incluyendo células y especialmente semillas ya que es la principal estructura evolucionada de las plantas superiores para su perpetuación (Bacchetta et al., 2008).

Bancos de germoplasma de plantas

Los bancos de germoplasma son centros encargados de la conservación de la biodiversidad genética de especies de uso alimenticio e industrial y actualmente de plantas silvestres que se encuentran amenazadas. Dentro de estos centros, se busca conocer y caracterizar el germoplasma en diversos aspectos, para garantizar su conservación y uso futuro en proyectos de recuperación (Bacchetta et al., 2008).

El material colectado que ingresa al banco de germoplasma para su conservación recibe el nombre de accesión, siendo un lote de germoplasma obtenido en una única recolección, de una unidad taxonómica específica y una población biológica definida. Para el ingreso de nuevos lotes de material vegetal a un banco de germoplasma se necesitan realizar pruebas iniciales de valoración como viabilidad, cantidad y peso inicial, humedad interna, germinación, entre otras. De esa manera, se recopilan datos necesarios para determinar el destino del lote, los parámetros para realizar las pruebas y monitorizar la productividad de la población (Bacchetta et al., 2008).

Las semillas y sus partes

Las semillas de plantas vasculares resultantes de la reproducción sexual, son óvulos maduros que contienen un embrión y almacenan los nutrientes dentro de una cubierta protectora, siendo consideradas como la unidad de dispersión total. Las semillas mantienen la variación de la progenie como resultado de la mezcla entre individuos, permitiendo aumentar la adaptabilidad ecológica. Son más resistentes al daño y estrés ambiental, así pueden ser almacenadas por periodos largos de tiempo en condiciones frías y cálidas, lo cual permite la conservación *ex situ* de plantas (Vargas & Pérez, 2014).

Las semillas pueden tener una gran variedad de formas, tamaños, pesos y colores en función de la diversidad de medios en los que se dispersan, sobreviven y germinan. Constan principalmente de un embrión constituido por un eje embrionario

(radícula, hipocótilo y plúmula) y uno, dos o varios cotiledones, el endospermo o albumen especializado en almacenar sustancias de reserva nutritiva, y las cubiertas seminales (testa y tegmen) las cuales recubren y protegen (Pérez, 2003).

Germinación

La germinación es un proceso que inicia con la entrada de agua a la semilla, lo que ayuda a la recuperación de la integridad de las membranas y la activación del metabolismo que se encontraba detenido debido al bajo contenido hídrico que presentan los tejidos al formarse y madurar (Pérez, 2003). A continuación, se produce la elongación del eje embrionario especialmente la radícula que atraviesa la cubierta seminal la cual dará lugar a una plántula (Osuna et al., 2017). Para que la semilla logre germinar necesita las condiciones adecuadas de temperatura, humedad, oxígeno e iluminación. Mientras las condiciones no sean adecuadas, la semilla podrá mantenerse latente por un periodo de tiempo, sin embargo, llegado un momento perderá su capacidad germinativa (Pérez, 2003). La germinación es un proceso irreversible, por lo tanto, una vez ha iniciado, la semilla germina o muere (Bacchetta et al., 2008).

Los ensayos de germinación, en el contexto de los bancos de germoplasma, son necesarios para una correcta gestión de las accesiones. Primero, permiten establecer un protocolo eficaz de conservación para cada taxón, que facilitará el cultivo de la planta dentro y fuera del laboratorio. Segundo, son esenciales para controlar la calidad de los lotes de semillas, ya que brindan información sobre la viabilidad de las semillas a lo largo de los periodos de conservación (Bacchetta et al., 2008).

Factores externos que afectan la germinación

Los factores externos determinantes para la germinación son agua, oxígeno, temperatura y luz (Osuna et al., 2017).

El agua es el factor que ejerce mayor influencia durante el proceso de germinación. Los tejidos de la semilla se rehidratan al estar en contacto con el agua, permitiendo el incremento de la respiración y la activación del metabolismo (Osuna et al., 2017), proporcionando los nutrientes necesarios al embrión para su crecimiento, hasta que la plántula tenga capacidad fotosintética (Bacchetta et al., 2008). Para que ocurra la germinación, es necesario que la semilla tenga la energía suficiente para degradar las sustancias de reserva, esto ocurre mediante la respiración, por lo tanto, la presencia de oxígeno es fundamental. Sin embargo, la mayoría de especies no requieren más de un 10% de concentración de oxígeno para germinar, el cual se encuentra disuelto en el agua de imbibición (Osuna et al., 2017).

Cada especie tiene un intervalo de temperatura óptimo al cual ocurre el máximo de germinación en el menor tiempo posible. Sin embargo, un gran número de especies reaccionan favorablemente a una alternancia de temperatura ya que logran estimular tanto la fase de germinación como las fases de crecimiento (Osuna et al., 2017). Se ha clasificado a las semillas en tres grupos según sus necesidades de luz para germinar, semillas con fotosensibilidad positiva (germinan preferentemente bajo condiciones de iluminación), semillas con fotosensibilidad negativa (germinan preferentemente en oscuridad) y semillas no fotosensibles (indiferentes a las condiciones de iluminación) (Pérez, 2003).

Factores internos que afectan la germinación

La viabilidad y longevidad de las semillas son los factores internos principales que determinan su germinación (Osuna et al., 2017). Sin embargo, a pesar de que las semillas se encuentren maduras y viables y en condiciones aparentemente favorables, la germinación se puede ver afectada por la latencia e impermeabilidad de las cubiertas de la semilla (Pérez, 2003).

La viabilidad de las semillas es la capacidad que tienen de germinar y producir plántulas normales bajo condiciones favorables y puede ser determinada mediante pruebas químicas como la prueba de tetrazolio (TZ) (Vargas & Pérez, 2014). Por otra parte, la longevidad es el tiempo que la semilla puede permanecer viable y se ve afectada por la interacción entre factores genéticos y factores ambientales (Osuna et al., 2017).

Por otro lado, la dormancia o latencia es la incapacidad de una semilla viable de germinar bajo condiciones favorables, sin embargo, existen factores ambientales específicos que pueden liberar a la semilla de la dormancia. De acuerdo a ello, existen diferentes tipos de dormancia, que permiten identificar los requerimientos específicos de las semillas (Vargas & Pérez, 2014), estos son:

- **Termodormancia:** las semillas no germinan a menos que se aplique un pretratamiento con la temperatura adecuada. Además, se consigue un efecto positivo al aplicar una temperatura alternante diaria.
- **Fotodormancia:** existe un requerimiento de luz para la germinación, junto a la interacción con otros factores ambientales.
- **Dormancia exógena:** puede ser de tres tipos, física, mecánica y química:

Física: es causada porque el fruto o la testa son impermeables al agua o tienen un intercambio de gases limitado. Se puede realizar un pretratamiento de escarificación para eliminar la dormancia.

Mecánica: está dada por la resistencia del pericarpo o la testa al crecimiento del embrión. La remoción del tegumento es una opción para permitir el crecimiento a la radícula.

Química: se da cuando existe la presencia de factores inhibidores

(fisiológicos o químicos) en el pericarpo o el exterior del fruto. Esta dormancia se rompe por estratificación fría o cálida (Vargas & Pérez, 2014).

- **Dormancia endógena:** puede ser de dos tipos fisiológica y morfológica.

Fisiológica: cuando existe un desarrollo reducido del embrión y no logra rebasar el impedimento mecánico de las cubiertas de la semilla. Se puede romper con la aplicación de giberelinas, y/o la aplicación de periodos de vernalización.

Morfológica: cuando el embrión es pequeño diferenciado (poco desarrollado) o indiferenciado. Se aplica un pretratamiento de estivación o maduración tardía (Bacchetta et al., 2008).

Germinación mediante cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) como semillas, embriones, órganos, tejidos, células, protoplastos y proporcionar artificialmente condiciones tanto físicas como químicas apropiadas para que las células expresen su potencial. Dentro de esta técnica es importante aplicar métodos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana y fúngica (Roca & Mroginski, 1993). Por lo tanto, el cultivo *in vitro* permite potenciar la capacidad germinativa de las semillas especialmente en aquellas que presentan dormancia, además de obtener plántulas asépticas y libres de patógenos que a futuro pueden usarse como fuente de explantes (Bueno et al., 2009).

Desinfección del material vegetal

Uno de los principales requisitos para tener éxito en el cultivo *in vitro*, es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes (Roca & Mroginski, 1993). Los contaminantes más frecuentes son los hongos, las bacterias y las levaduras, los cuales llegan a ser dañinos para el cultivo, ya

que compiten con el explante por nutrientes y le producen daños directos e indirectos al colonizar sus tejidos y liberar al medio metabolitos tóxicos (Hernández & González, 2010).

Durante el proceso de desinfección superficial de los explantes, es importante eliminar la mayor cantidad de microorganismos, pero a la vez debe causar el menor daño posible al tejido (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994). Los compuestos desinfectantes más usados son el hipoclorito de sodio (NaClO) de tipo comercial al 1-2% durante 5-10 minutos (Bacchetta et al., 2008), el etanol al 70% y un detergente para ayudar a la ruptura de la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con los químicos desinfectantes (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

Medio de cultivo y uso de hormonas

El medio de cultivo es seleccionado en dependencia de los objetivos de estudio para el explante usado (Roca & Mroginski, 1993). En un análisis inicial en el cual no se tiene un conocimiento previo de la especie de estudio se recomienda el uso de un medio de cultivo estándar agar al 0,5-1% (Bacchetta et al., 2008).

Las semillas de plantas silvestres, en general, presentan una germinación irregular y relativamente baja, a causa principalmente de la dormancia (Besnier, 1976). Además de los factores externos como agua, temperatura y luz, la aplicación de la hormona ácido giberélico en el medio de cultivo puede ayudar a levantar la dormancia (ENSCONET, 2009), ya que estimula la germinación, ayudando a la maduración del embrión (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

Prueba de viabilidad mediante tetrazolio (TZ)

Las pruebas de viabilidad brindan una estimación de la calidad de las semillas, indicando, en términos generales si está “viva” o no (Bacchetta et al., 2008). Se realizan para evaluar la cantidad de semillas con potencial para germinar, lo cual depende del momento de dispersión y de la planta madre (Vargas & Pérez, 2014).

La prueba de tetrazolio es un ensayo bioquímico que permite evaluar de forma rápida la viabilidad de las semillas (ISTA, 2016). Es una prueba colorimétrica que utiliza como indicador, una solución al 1% de 2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro o bromuro a pH 6.5 – 7.5, fotosensible, transparente y soluble en agua (Bacchetta et al., 2008). Las semillas a evaluar son remojadas en agua durante 24 horas antes del ensayo, se exponen sus tejidos esenciales, y se sumergen en la solución de tetrazolio en incubación a 30°C en completa oscuridad. El tiempo de incubación dependerá de cada especie de estudio (ISTA, 2016). La solución de tetrazolio detecta la actividad mitocondrial de la semilla. Las enzimas deshidrogenasas que se encuentran activas en la mitocondria de los embriones “vivos”, reducen las sales incoloras del tetrazolio a formosán que presenta un color rosa-rojizo. De esta forma los tejidos viables se teñirán, mientras que los tejidos muertos mantendrán su color original (Bacchetta et al., 2008). Por lo tanto, se toma como semilla viable, aquella teñida de color rojo o rosado intenso, en su totalidad o parcialmente, acorde a los delineamientos para cada especie, que indican la viabilidad de estructuras esenciales (ISTA, 2016).

Descripción de la familia Valerianaceae (actualmente subfamilia Valerianoideae)

Las plantas pertenecientes a la familia Valerianaceae son características por presentar un fuerte olor debido al ácido valeriánico y sus derivados. Son plantas herbáceas anuales o perennes, raramente arbustivas, generalmente rizomatosas, a

veces estoloníferas, de tallos erectos y ramificados. Sus hojas son simples, opuestas, a veces en rosetas basales, enteras, con frecuencia pinnatífidas o pinnatisectas, sin estípulas y con base abrazadora. Tienen inflorescencias terminales y cimosas, compuestas con numerosas flores pequeñas bisexuales o unisexuales por aborto. Sus frutos son aquenios secos e indehiscentes, generalmente coronados por un cáliz que se transforma en un vilano (Sánchez, 2020).

Es una familia cosmopolita distribuida en casi todo el mundo, comprende de 10 a 15 géneros y de 300 a 500 especies (Novara, 2012). En el sistema de clasificación de angiospermas más reciente, basado en criterios filogenéticos, la familia Valerianaceae es integrada como subfamilia Valerianoideae de la familia Caprifoliaceae, pertenecientes al Orden Dipsacales (APG III, 2009).

Fitoquímica e importancia de la familia Valerianaceae

Dentro de la familia Valerianaceae se ha encontrado un grupo específico y desconocido de sustancias iridoides llamadas valeriana-epoxi-triésteres abreviados como valepotriatos, a los cuales se les confiere las propiedades curativas y efectos sedantes principalmente. Ya que los valepotriatos han sido encontrados únicamente en la familia Valerianaceae se ha sugerido su singularidad. Además de los valepotriatos, otros compuestos que muestran propiedades farmacológicas en esta familia son, alcaloides similares a los iridoides, varios sesquiterpenos y monoterpenos. Desde la antigüedad se han utilizado tanto las raíces como los rizomas de valeriana para fines sedantes y se han estudiado sus aceites esenciales para la preparación de perfumes (Kadereit & Bittrinch, 2016).

Valerianas de estudio

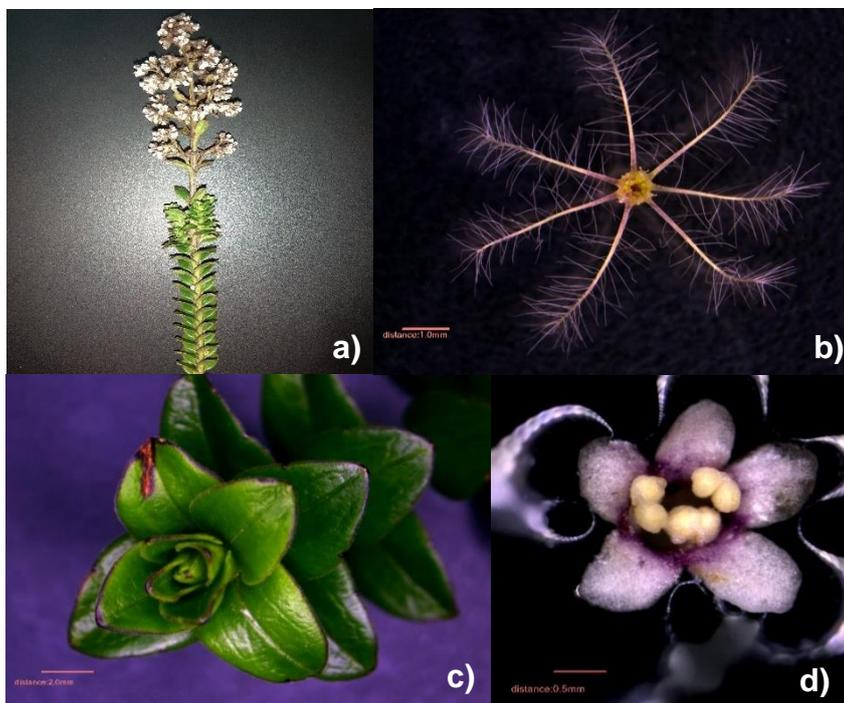
***Valeriana microphylla* Kunth**

Es una especie que se encuentra comúnmente en los bosques, presenta variaciones notorias en su morfología como el tamaño de las hojas,

el largo de los entrenudos foliares y el largo del raquis de la inflorescencia. Es un arbusto ascendente, presenta tallos teretes, erectos, hirsutos a glabrescentes; estípulas ausentes; hojas opuestas, simples, separadas por internudos de 2-10 mm de largo; pecíolo de 0.5-4mm de largo; lámina elíptica a oblanceolada de 6-16 x 2-6 mm; vena media conspicua en el haz y el envés; inflorescencia en panículas terminales, flores numerosas, ginodioicas; fruto aquenio elíptico, glabro, coronado por el papus persistente. En Ecuador se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Tungurahua, Zamora Chinchipe, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha y Sucumbíos, en los Andes a una altura de 2000-4500 m.s.n.m. (Romoleroux et al., 2019a).

Figura 1

Estructura morfológica de *Valeriana microphylla*



Nota. a) Inflorescencia, b) Semilla, c) Hojas, d) Flor

***Valeriana adscendens* Turcz**

Es una especie que se distribuye en zonas húmedas de turberas y en pantanos, existe en suelos permanentes húmedos. Hierba terrestre, aromática; tallos ramificados desde la base; raíces axonomorfas; estípulas ausentes; hojas arregladas en una roseta basal, simples; pecíolo ensanchado hacia la base de 16-66 mm de largo; lámina elíptica de 30-84 x 8-25 mm; vena media pilosa; venación reticular marcada en el envés; inflorescencia en corimbos terminales dispuestos en un eje de la inflorescencia con 1-3 pares de hojas sésiles, flores ginodioicas; fruto aquenio elíptico, glabro. En Ecuador se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Pichincha, Tungurahua, Morona Santiago, Napo, Carchi, Cotopaxi e Imbabura, en los Andes a una altura de 2500-4500 m.s.n.m. (Romoleroux et al., 2019b).

Figura 2

Estructura morfológica de Valeriana adscendens



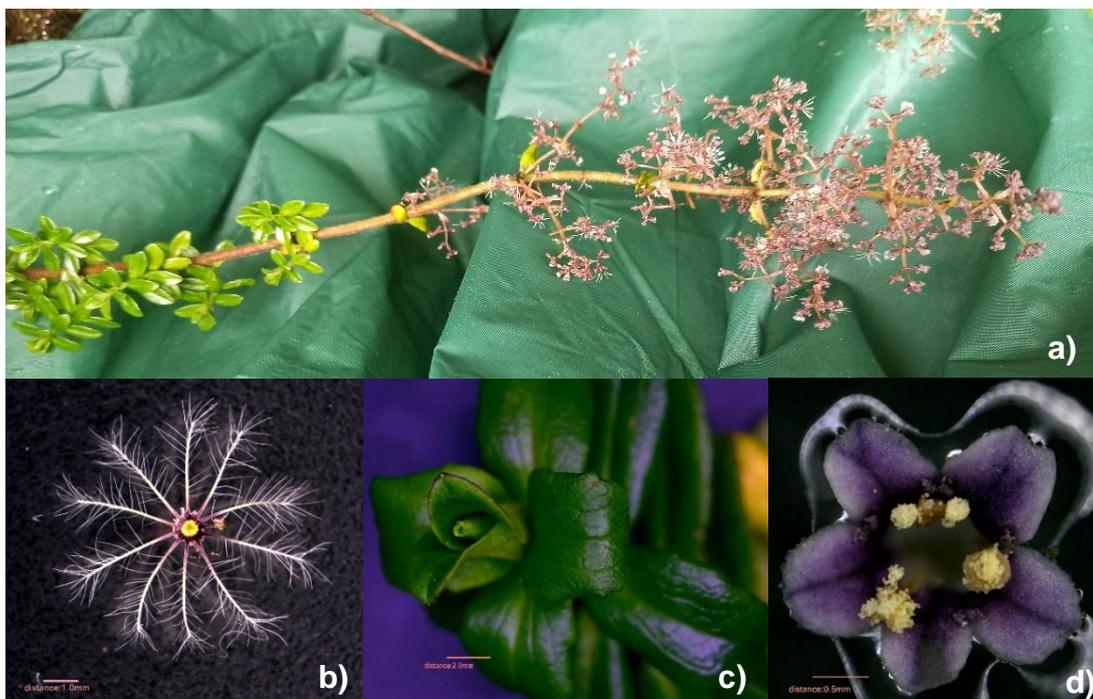
Nota. a) Inflorescencia, b) Semilla, c) Hoja, d) Flor

***Valeriana laurifolia* Kunth**

Esta especie es aromática cuando se encuentra en flor, crece como un arbusto trepador enroscado en los troncos y ramas de los árboles, es común en donde hay cobertura vegetal densa. Tallos teretes, jóvenes pilosos, maduros glabrescentes a glabros; raíces delgadas, axonomorfas; estípulas ausentes; hojas opuestas, simples; pecíolo de 14-23 mm de largo; lámina ovada a elíptica 31-70 x 13-30 mm; venación curvada desde la base, difuminándose hacia el ápice, inflorescencia en panículas en eje tetragonal, raquis y nudos hirsutos, flores ginodioicas; fruto aquenio ovado, piloso, papus persistente. En Ecuador se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Sucumbíos y Zamora Chinchipe, en los Andes a una altura de 2000-4000 m.s.n.m. (Romoleroux et al., 2019c).

Figura 3

Estructura morfológica de Valeriana laurifolia



Nota. a) Inflorescencia, b) Semilla, c) Hojas, d) Flor

Capítulo III: Metodología

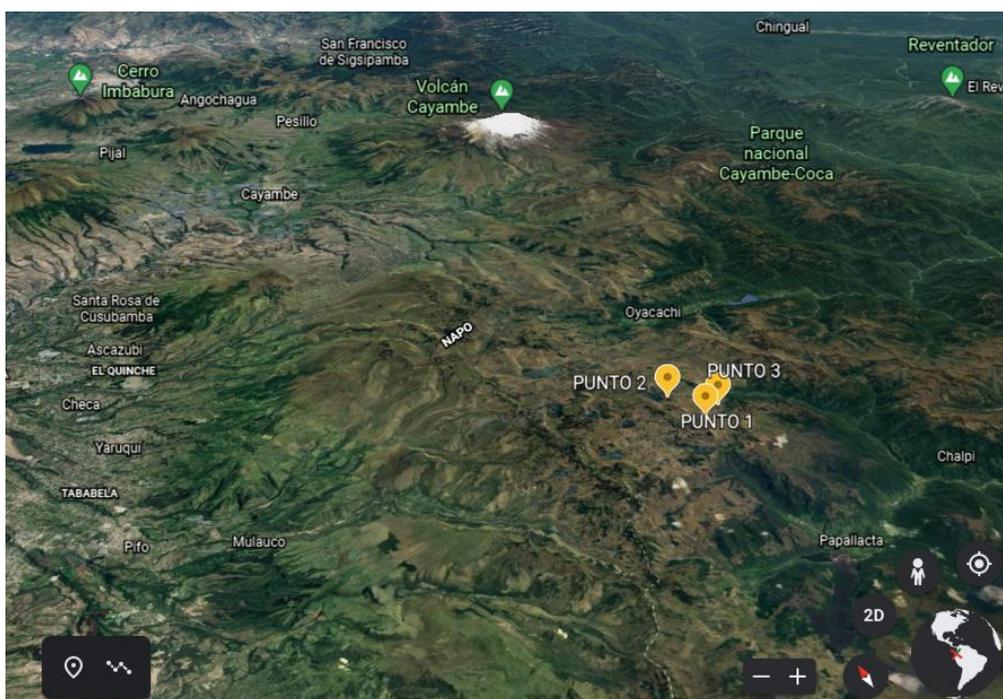
Ubicación del trabajo de investigación

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Instituto Nacional de Biodiversidad – INABIO siendo este un socio estratégico del proyecto BIO-GEEC.

Las muestras vegetales fueron recolectadas en el Parque Nacional Cayambe – Coca, en tres puntos diferentes (cuadrantes delimitados de 20x20m): Ladera (Punto 1) (-820350,-9967260), Laguna (Punto 2) (-818733,-9968756), Parche de Polylepis (Punto 3) (-819056,-9966764).

Figura 4

Mapa de la ubicación de los tres puntos de muestreo



Nota. Ladera (Punto 1) (-820350,-9967260), Laguna (Punto 2) (-818733,-9968756), Parche de Polylepis (Punto 3) (-819056,-9966764)

Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado durante los meses de noviembre del 2020 a julio del 2021. Se colectaron inflorescencias maduras, es decir cuando la mayoría

de vilanos en las semillas se encontraban extendidos, fueron cortadas y almacenadas en tubos falcon de 50 ml para realizar análisis morfológicos y en fundas de papel para realizar análisis germinativos. Cada muestra tiene un código de accesión (recolección), fotografías y fichas descriptivas propias de la especie.

Manejo y conservación de las muestras vegetales

Las muestras colectadas para morfología fueron transferidas a nuevos tubos falcon de 50 ml para mantener la humedad. Las muestras colectadas para germinación fueron secadas en fundas de papel dentro de fundas ziploc doble cierre con sílica gel a temperatura ambiente y oscuridad durante 3 días, a continuación, se almacenaron en frascos de vidrio a 5°C en oscuridad. Para aplicar los diferentes tratamientos, las semillas fueron extraídas de las flores y se almacenaron en tubos eppendorf, se seleccionaron semillas con vilano abierto y que no se encontraban comprimidas (Vargas & Pérez, 2014).

Identificación de las especies

Para la identificación de las especies vegetales se contó con la colaboración del Herbario Nacional del Ecuador.

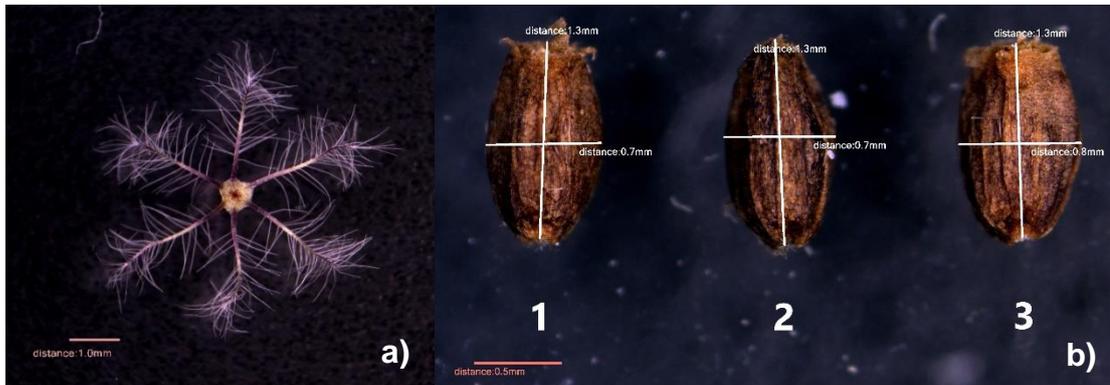
Análisis morfológico del fruto-semilla

Para el análisis morfológico se consideraron las siguientes características: tamaño (largo y ancho), peso, estructura, forma y color. Para el análisis de la estructura se utilizaron 50 semillas de las cuales se tomaron fotografías individuales del vilano en un estereomicroscopio mediante el programa MShot Image para realizar un conteo del número de filamentos que lo componen. En cuanto al tamaño, se utilizaron 100 semillas, a las cuales se les extrajo el vilano, se tomaron fotografías en un estereomicroscopio y se midieron las dimensiones de largo y ancho utilizando el programa MShot Image y se determinó la forma y color del fruto-semilla. Para determinar el peso se utilizaron 5 lotes de 100 semillas con vilano abierto y se pesaron en una balanza de precisión. Debido a que se tiene una menor

disponibilidad de muestra vegetal para la especie *V. laurifolia* se tomaron 3 lotes de 100 semillas.

Figura 5

Análisis morfológico del fruto-semilla de especies del género Valeriana



Nota. a) Estructura (número de filamentos que componen el vilano), b) Dimensionamiento (largo y ancho)

Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)

Se seleccionaron 75 semillas por tratamiento divididas en tres réplicas de 25 semillas cada una (para *V. laurifolia* se usaron 60 semillas en tres réplicas de 20 semillas) empleando un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA) (Tabla 1). Se extrajo el vilano y fueron hidratadas durante 24 horas. Con la ayuda de un estereomicroscopio se extrajeron los embriones completos. A continuación, fueron sumergidos en una solución de TZ al 1% en oscuridad a 30°C y se probaron dos tiempos de inmersión (4 y 6 horas). Se realizó el conteo del número de embriones viables (teñidos) y no viables. Se consideró semilla viable aquella teñida de rojo o rosado intenso completamente y hasta 1/3 sin teñir radícula o cotiledones (ISTA, 2016).

Tabla 1

Tratamientos del ensayo de viabilidad mediante la prueba de tetrazolio (TZ)

Tratamiento	Código
Embriones con 4 horas de inmersión en TZ al 1%	TA1
Embriones con 6 horas de inmersión en TZ al 1%	TA2

Desinfección de semillas

Como primer paso, se extrajo el vilano a las semillas utilizadas. A continuación, fueron lavadas con agua corriente para eliminar la mayoría de impurezas, se introdujeron en una solución de detergente a una concentración del 1% por 10 minutos en agitación continua y se realizaron tres lavados con agua estéril. Fueron sumergidas en una solución de alcohol al 70% por 1 minuto y se realizaron tres lavados con agua estéril. Se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (1 y 2%) y dos tiempos de inmersión (5 y 10 min), en la cámara de flujo laminar se realizaron tres lavados con agua estéril previo a la siembra y se tuvo un control sin aplicar hipoclorito de sodio. Se sembraron 20 semillas por caja Petri en medio agar al 1% a temperatura ambiente selladas con Parafilm y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento (para *V. laurifolia* se realizaron 3 réplicas) empleando un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA) (Tabla 2). El conteo de semillas contaminadas y germinadas se realizó a los 29 días después de la siembra. Se consideró semilla contaminada aquella con presencia de hongo o bacteria (Figura 11) y semilla germinada aquella con la radícula expuesta mayor a 1mm (Figura 16). Se midió la temperatura ambiental durante el tiempo que duró el proceso.

Tabla 2

Tratamientos del ensayo de desinfección mediante el uso de hipoclorito de sodio

Tratamiento	Código
Control sin NaClO	TB0
1% de NaClO y remojo por 5 min	TB1
2% de NaClO y remojo por 5 min	TB2
1% de NaClO y remojo por 10 min	TB3
2% de NaClO y remojo por 10 min	TB4

Germinación

Todos los tratamientos de germinación fueron realizados en medio agar al 1% en cajas Petri de vidrio selladas con Parafilm para mantener la humedad. En cámara de flujo laminar se sembraron 20 semillas por caja Petri en 4 réplicas (para *V. laurifolia* se realizaron 3 réplicas) para cada tratamiento, empleando un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA). Se consideró semilla germinada aquella con la radícula expuesta mayor a 1mm (Figura 16). El conteo de semillas germinadas se realizó dos veces por semana durante 59 días. Se analizó la capacidad germinativa (porcentaje final de semillas germinadas), germinación acumulativa (porcentaje de semillas germinadas a lo largo del tiempo, se observa la uniformidad de los datos y el pico de germinación), el tiempo de latencia (tiempo necesario para el inicio de la germinación, rompimiento de la latencia) y la velocidad de germinación (número de semillas germinadas con respecto al tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla).

Evaluación del efecto del ácido giberélico AG₃

El medio de cultivo (agar 1%) fue suplementado con AG₃, se evaluaron 3 concentraciones (1, 2 y 3 mg/L) y se tuvo un control sin hormona (Tabla 3). Se midió la temperatura ambiental durante el tiempo que duró el proceso.

Tabla 3

Tratamientos sobre el efecto del ácido giberélico en la germinación

Tratamiento	Código
Control sin hormona	TC0
1 mg/L de AG ₃	TC1
2 mg/L de AG ₃	TC2
3 mg/L de AG ₃	TC3

Aplicación de tratamientos de fotoperiodo

Se realizaron dos tratamientos. Un tratamiento en oscuridad en el cual las cajas Petri fueron cubiertas con papel aluminio y un tratamiento con exposición indirecta a luz y oscuridad natural (Tabla 4). Se midió la temperatura ambiental durante el tiempo que duró el proceso.

Tabla 4

Tratamientos sobre el efecto del fotoperiodo en la germinación

Tratamiento	Código
Exposición indirecta a luz y oscuridad natural	TD1
Oscuridad total	TD2

Aplicación de tratamientos de termoperiodo

Para este parámetro se probaron tres temperaturas en condiciones de oscuridad, para ello las cajas Petri fueron colocadas en una incubadora a 20°C, en una refrigeradora a 5°C y a temperatura ambiente para lo cual se midió la temperatura mediante el uso de un termohigrómetro (Tabla 5).

Tabla 5

Tratamientos sobre el efecto del termoperiodo en la germinación

Tratamiento	Código
Temperatura ambiental	TE1
20°C	TE2
5°C	TE3

Análisis estadístico de los datos

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos siguen una distribución normal. A continuación, se aplicó un análisis de varianza ANOVA para los datos que siguen una distribución normal y una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los datos que no siguen una distribución normal. Por último, la comparación de las medias de los resultados obtenidos se realizó mediante el Test de Duncan ($p < 0,05$). El procesamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico R versión 4.1.1.

Capítulo IV: Resultados

Caracterización morfológica del fruto-semilla

Al realizar la caracterización morfológica del fruto-semilla de las tres especies de estudio, estas presentaron un número diferente de filamentos que conforman el vilano. La especie *V. laurifolia* presenta el número mayor de filamentos (11-13) y la especie *V. adscendens* el menor (6). El tamaño de la semilla varía entre 1.1 a 1.8 ± 0.1 mm en largo y entre 0.8 a 0.9 ± 0.1 mm en ancho. Y su peso fluctúa entre 23 ± 1 a 27 ± 4 mg (100 semillas). Cabe recalcar que la especie *V. laurifolia* presenta semillas más grandes, sin embargo, *V. microphylla* presenta semillas más pesadas.

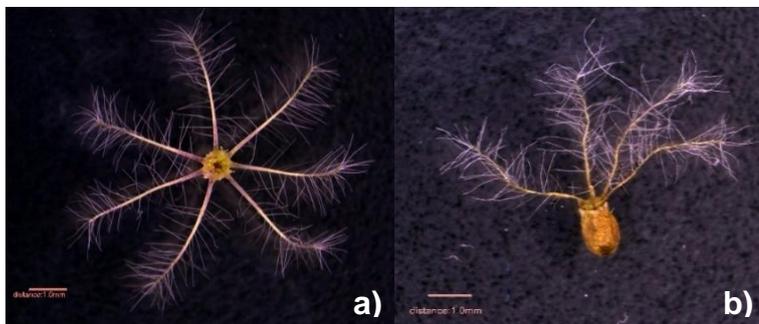
A continuación, se muestran los resultados específicos obtenidos para cada especie:

Valeriana microphylla

Su fruto-semilla es un aquenio coronado por un vilano conformado por 6 – 8 (6, 56%; 7, 38%; 8, 6%) filamentos. Su semilla presenta forma elipsoide, con una cubierta rugosa glabra a ligeramente hirsuta de color café claro (Figura 6), sus dimensiones de largo son 1.1 ± 0.1 mm y de ancho 0.8 ± 0.1 mm, y su peso es 27 ± 4 mg.

Figura 6

Fruto-semilla de *Valeriana microphylla*



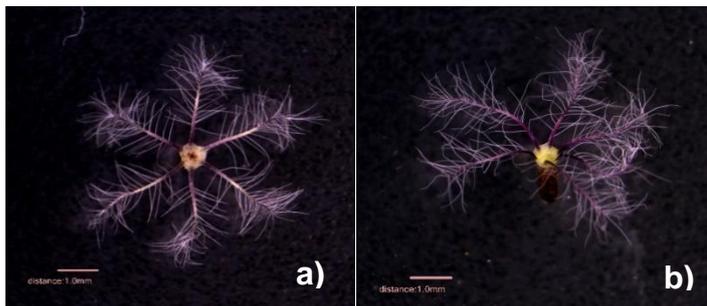
Nota. a) Vista superior (vilano), b) Vista lateral

Valeriana adscendens

Su fruto-semilla es un aquenio coronado por un vilano conformado por 6 (6, 96%; 5, 2%; 7, 2%) filamentos. Su semilla presenta forma elipsoide, con una cubierta lisa glabra de color café oscuro (Figura 7), sus dimensiones de largo son 1.3 ± 0.1 mm y de ancho 0.8 ± 0.1 mm, y su peso es de 23 ± 1 mg.

Figura 7

Fruto-semilla de Valeriana adscendens



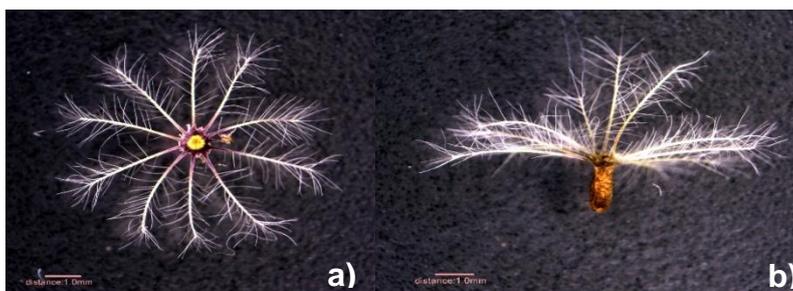
Nota. a) Vista superior (vilano), b) Vista lateral

Valeriana laurifolia

Su fruto-semilla es un aquenio coronado por un vilano conformado por 11-13 (12, 56%; 11, 28%; 13, 12%; 10, 2%; 14, 2%) filamentos. Su semilla presenta forma ovoide, con una cubierta rugosa glabra a ligeramente hirsuta de color café amarillento (Figura 8), sus dimensiones de largo son 1.8 ± 0.1 mm y de ancho 0.9 ± 0.1 mm, y su peso es de 24.6 ± 0.4 mg.

Figura 8

Fruto-semilla de Valeriana laurifolia



Nota. a) Vista superior (vilano), b) Vista lateral

Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)

La viabilidad de las semillas es un parámetro importante para definir la estrategia reproductiva de las especies y al mismo tiempo establecer los lineamientos para su conservación.

En la prueba de tetrazolio (TZ) se evaluó la variable viabilidad (embrión viable aquel coloreado de rojo o rosado intenso completamente y hasta 1/3 sin teñir radícula o cotiledones) (Figura 9). Se probaron dos tiempos de inmersión (4 y 6 horas) en tetrazolio al 1% a 30°C en oscuridad (Tabla 1), los resultados se detallan a continuación.

Figura 9

Embriones del género *Valeriana* en la prueba de tetrazolio



Nota. a) Embrión viable de *V. adscendens* (teñido de rojo), b) Embrión no viable de *V. laurifolia* (sin tinción), c) Embrión no viable de *V. adscendens* (1/2 sin teñir radícula).

Análisis exploratorio de datos

En la tabla 6, se muestra un resumen de las tres especies de estudio con los datos del porcentaje de embriones viables con respecto al tiempo de inmersión en solución de tetrazolio al 1%. El tiempo de inmersión de 6 horas (TA2) generó el mayor porcentaje de embriones viables, para *V. microphylla* (97%), *V. adscendens* (95%) y *V. laurifolia* (72%) (Figura 10).

Tabla 6

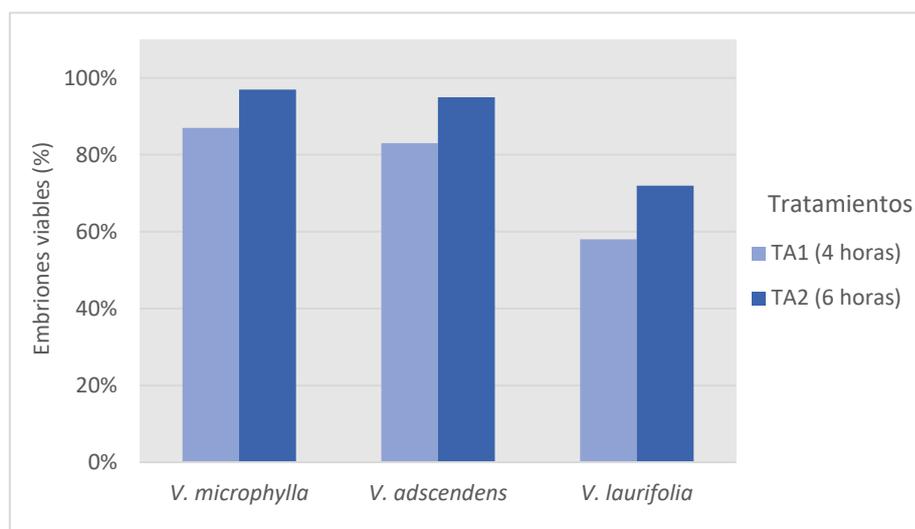
Porcentaje de embriones viables respecto a los tratamientos en la prueba de tetrazolio (TZ)

Especies	Tratamientos	
	TA1	TA2
<i>V. microphylla</i>	87%	97%
<i>V. adscendens</i>	83%	95%
<i>V. laurifolia</i>	52%	72%

Nota. TA1: 4 horas de inmersión en TZ 1%, TA2: 6 horas de inmersión en TZ 1%

Figura 10

Porcentaje de embriones viables respecto a los tratamientos en la prueba de tetrazolio



Análisis inferencial

Los datos obtenidos para la viabilidad de las tres especies de estudio siguen una distribución normal, es decir son paramétricos, lo cual se obtuvo mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Anexos, Tabla 16). Por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a cada una de las especies de estudio, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Finalmente se aplicó la prueba de Duncan para

conocer si existen diferencias entre las medias de cada tratamiento. El análisis se realizó de forma individual para cada especie estudiada.

Para *V. microphylla* en la prueba ANOVA se obtuvo un p-valor (0.02322) menor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. La prueba de Duncan mostró dos grupos, en donde el tratamiento TA2 (6 horas de inmersión) perteneciente al grupo a, presentó la media más alta (24.33) (Tabla 7).

En *V. adscendens* y *V. laurifolia* la prueba ANOVA obtuvo un p-valor (0.07393, 0.1917 respectivamente) mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Esto se corroboró mediante la prueba de Duncan, tanto para *V. adscendens* como para *V. laurifolia*, se formó un solo grupo con los dos tratamientos, sin embargo, el tratamiento TA2 (6 horas de inmersión) presentó la media más alta (23.67, 14.33 respectivamente) (Tabla 7).

Para las tres especies de estudio se determinó que el tratamiento más adecuado para realizar el análisis de viabilidad en embriones es el TA2 (6 horas de inmersión).

Tabla 7

Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de viabilidad

Especie	p-valor	Tratamientos	
		TA1	TA2
<i>V. microphylla</i>	0.02322*	21.66667 b	24.33333 a
<i>V. adscendens</i>	0.07393	20.66667 a	23.66667 a
<i>V. laurifolia</i>	0.1917	11.66667 a	14.33333 a

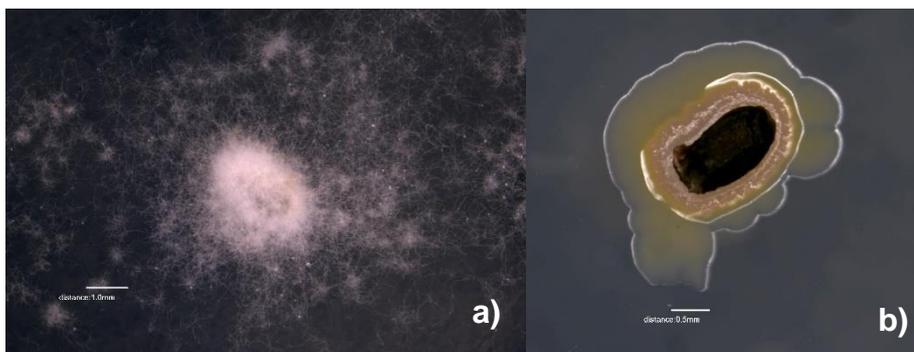
Nota. Pruebas de ANOVA y test de Duncan. TA1: 4 horas de inmersión en TZ 1%, TA2: 6 horas de inmersión en TZ 1%.

Desinfección de semillas

En el proceso de desinfección de semillas se evaluó la variable contaminación (hongos y bacterias presentes en cada semilla) (Figura 11) y se tomó en cuenta la variable germinación (semilla germinada aquella con radícula expuesta mayor a 1mm) (Figura 16). Se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (1 y 2%), dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) y un control sin hipoclorito de sodio (Tabla 2), se realizó un control de la temperatura ambiental dentro del laboratorio. Los resultados se detallan a continuación.

Figura 11

Semillas contaminadas del género Valeriana

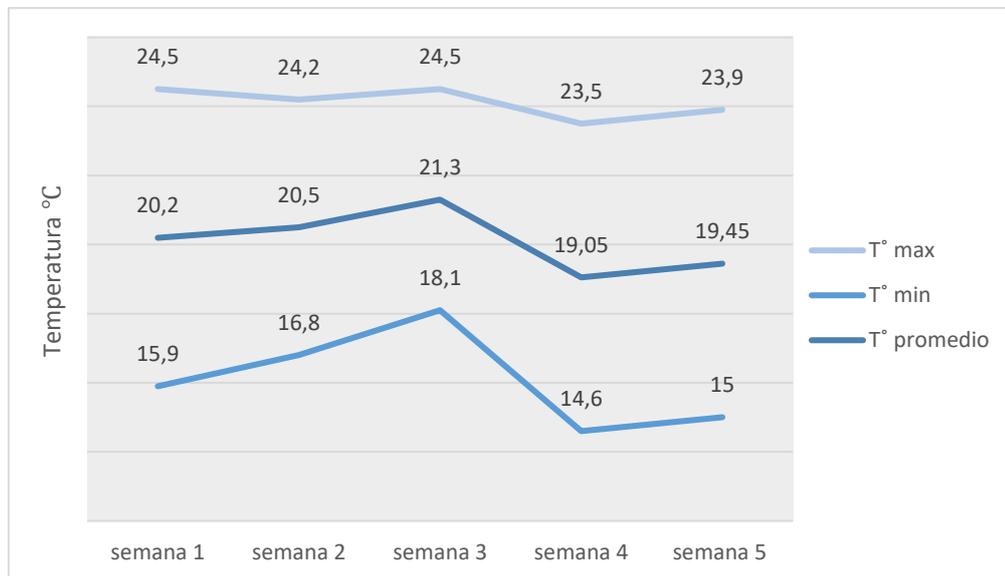


Nota. a) Semilla contaminada por hongo de *V. laurifolia*, b) Semilla contaminada por bacteria de *V. microphylla*

En la figura 12, se muestra la temperatura ambiental (máxima, mínima y promedio) dentro del laboratorio durante el desarrollo de la etapa de desinfección por un periodo de 5 semanas, mostrando un pico máximo de 24.5°C y un pico mínimo de 14.6°C. Estos datos muestran las condiciones en las que se desarrolló el ensayo y son de utilidad como datos informativos.

Figura 12

Registro de temperatura ambiente (mínima, máxima y promedio) en laboratorio durante el proceso de desinfección



Análisis exploratorio de datos

En la tabla 8, se muestra un resumen de los resultados del porcentaje de semillas no contaminadas y el porcentaje de semillas germinadas, con respecto a la concentración y al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, evaluado a los 29 días de siembra en las tres especies de estudio. Se consideró semilla contaminada aquella con presencia de bacterias y hongos (Figura 11) y semilla germinada aquella con radícula expuesta mayor a 1mm (Figura 16).

Tabla 8

Análisis de datos sobre el ensayo de desinfección mediante el uso de hipoclorito de sodio

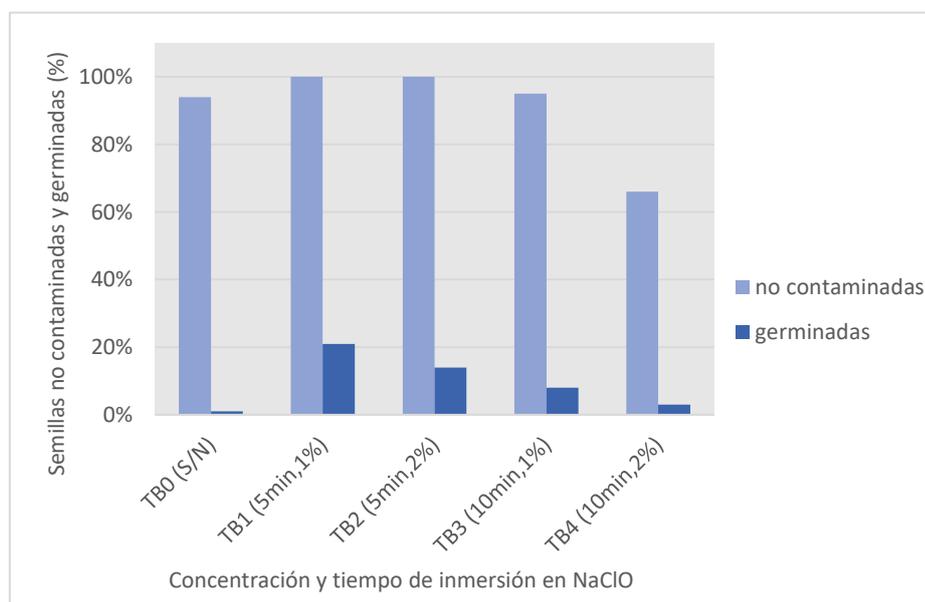
Tratamientos	Especies					
	<i>V. microphylla</i>		<i>V. adscendens</i>		<i>V. laurifolia</i>	
	NC	G	NC	G	NC	G
TB0	94%	1%	90%	33%	65%	2%
TB1	100%	21%	98%	68%	77%	30%
TB2	100%	14%	99%	73%	98%	35%
TB3	95%	8%	91%	45%	100%	20%
TB4	66%	3%	96%	76%	100%	25%

Nota. Porcentaje de semillas no contaminadas (NC) y germinadas (G); TB0: Control sin NaClO, TB1: 1% de NaClO y remojo por 5 min, TB2: 2% de NaClO y remojo por 5 min, TB3: 1% de NaClO y remojo por 10 min, TB4: 2% de NaClO y remojo por 10 min

Para *V. microphylla*, el tiempo de 5 minutos a una concentración de 1% (TB1) generó uno de los porcentajes más altos de semillas no contaminadas (100%) junto con el mayor porcentaje de semillas germinadas (21%) (Figura 13).

Figura 13

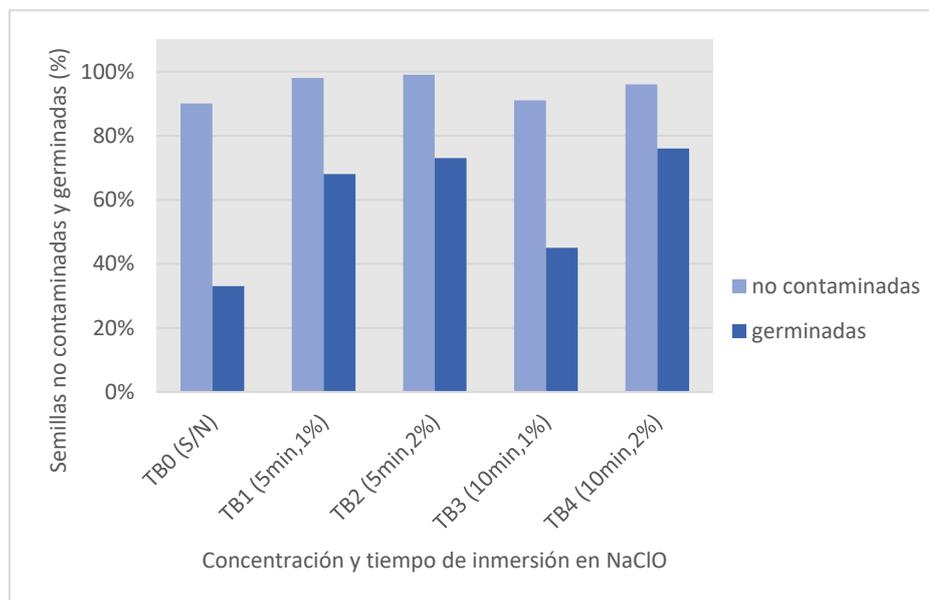
Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en Valeriana microphylla



En el caso de *V. adscendens*, el tiempo de 5 minutos a una concentración de 2% (TB2) generó el mayor porcentaje de semillas no contaminadas (99%) con un porcentaje alto de semillas germinadas (73%) (Figura 14).

Figura 14

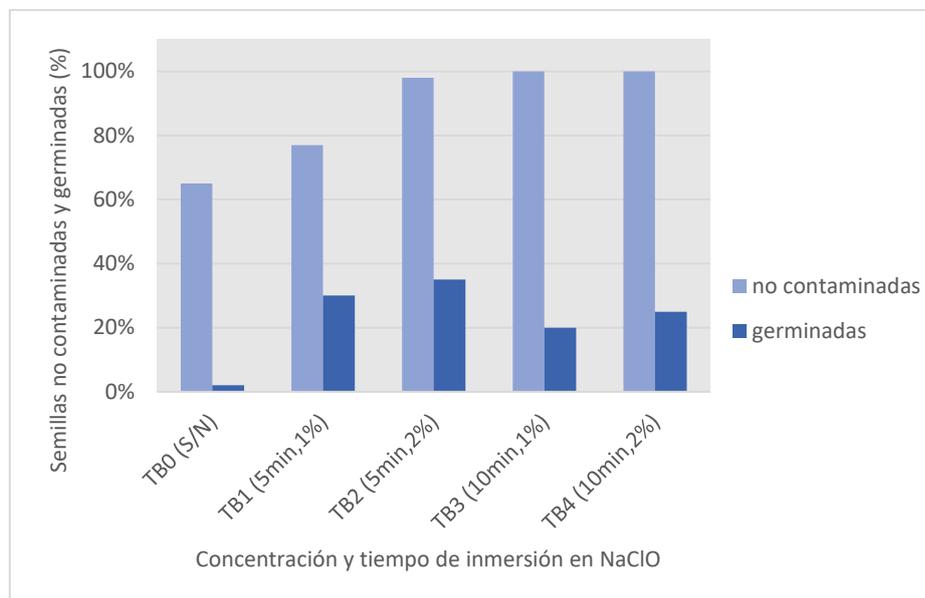
Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en *Valeriana adscendens*



Por otro lado, para *V. laurifolia* en el tiempo de 10 minutos a una concentración de 2% (TB4) se obtuvo uno de los mayores porcentajes de semillas no contaminadas (100%) junto con uno de los mayores porcentajes de semillas germinadas (25%) (Figura 15).

Figura 15

Porcentaje de semillas no contaminadas y germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección en *Valeriana laurifolia*



Análisis inferencial

Los datos obtenidos para la desinfección, de las especies *V. microphylla* y *V. laurifolia* no siguen una distribución normal es decir no son paramétricos, mostrado mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Anexos, Tabla 17), por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de *V. adscendens* los datos obtenidos siguen una distribución normal es decir son paramétricos, lo cual se obtuvo mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Anexos, Tabla 17), por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente se aplicó la prueba de Duncan para conocer si existen diferencias entre las medias de cada tratamiento. El análisis se realizó de forma individual para cada especie estudiada.

Para *V. microphylla* y *V. laurifolia*, en la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo un p-valor (0.003053, 0.04797 respectivamente) menor al estadístico

de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. En la prueba de Duncan, para *V. microphylla* se formaron dos grupos, en donde los tratamientos TB1 y TB2 pertenecientes al grupo a, presentaron la media más alta (20.00). En *V. laurifolia* se formaron dos grupos, en donde los tratamientos TB3 y TB4 mostraron la media más alta (20.00) en el grupo a, en contraste con el tratamiento control TB0 (13.00) en el grupo b (Tabla 9).

En el caso de *V. adscendens* la prueba ANOVA obtuvo un p-valor (0.5624) mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Esto se corroboró mediante la prueba de Duncan, formándose un grupo a, sin embargo, el tratamiento TB2 presentó la mayor media (19.75) (Tabla 9).

Tabla 9

Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de desinfección

Especie	p-valor	Tratamientos				
		TB0	TB1	TB2	TB3	TB4
<i>V. microphylla</i>	0.003053	18.75 a	20.00 a	20.00 a	19.00 a	13.25 b
<i>V. adscendens</i>	0.5624	18.00 a	19.50 a	19.75 a	18.50 a	19.25 a
<i>V. laurifolia</i>	0.04797	13.00 b	15.33 ab	19.67 a	20.00 a	20.00 a

Nota. Kruskal-Wallis (*V. microphylla* y *V. laurifolia*), ANOVA (*V. adscendens*) y test

de Duncan. TB0: Control sin NaClO, TB1: 1% de NaClO y remojo por 5 min, TB2: 2% de NaClO y remojo por 5 min, TB3: 1% de NaClO y remojo por 10 min, TB4: 2% de NaClO y remojo por 10 min

Germinación

Una vez determinados los mejores protocolos de desinfección para cada especie, estos fueron aplicados previo a la siembra de semillas para el análisis de germinación. Para la etapa de germinación se analizaron los siguientes parámetros: ácido giberélico (1, 2 y 3 mg/L), fotoperiodo (oscuridad, luz/oscuridad natural) y

termoperiodo (temperatura ambiente, 20°C y 5°C). Se evaluó la capacidad germinativa, el tiempo de latencia, la velocidad de germinación y la germinación acumulativa (considerando como semilla germinada aquella con radícula expuesta mayor a 1mm) (Figura 16), durante 59 días después de la siembra. Y se realizó el control de la temperatura ambiental dentro del laboratorio para los tratamientos que lo ameriten.

Figura 16

Semillas germinadas y desarrollo de plántulas del género Valeriana

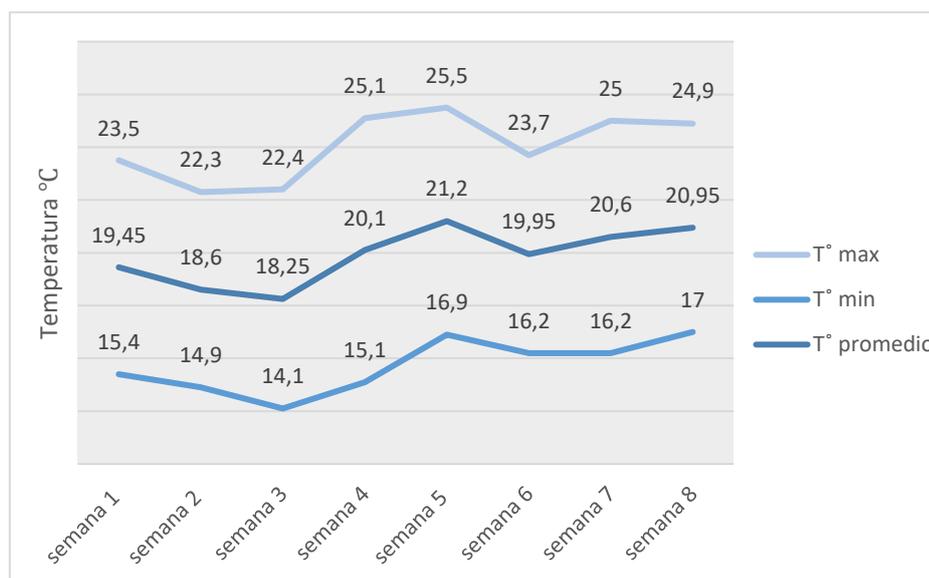


Nota. *V. microphylla*: a.1) Semilla con radícula expuesta, a.2) Plántula a los 29 días de siembra, a.3) Plántula a los 2 meses de siembra. *V. adscendens*: b.1) Semilla con radícula expuesta, b.2) Plántula a los 29 días de siembra, b.3) Plántula a los 2 meses de siembra. *V. laurifolia*: c.1) Semilla con radícula expuesta, c.2) Plántula a los 29 días de siembra, c.3) Plántula de a los 2 meses de siembra.

En la figura 17, se muestra la temperatura ambiental (máxima, mínima y promedio) dentro del laboratorio durante el desarrollo de la etapa de germinación por un periodo de 8 semanas, mostrando un pico máximo de 25.5°C y un pico mínimo de 14.1°C.

Figura 17

Registro de temperatura ambiente (mínima, máxima y promedio) en laboratorio durante el proceso de germinación



Evaluación del efecto del ácido giberélico AG₃

Para la aplicación de AG₃ en la germinación, se evaluaron tres concentraciones 1, 2 y 3 mg/L y un control sin hormona (Tabla 3). Los resultados se detallan a continuación.

Análisis exploratorio de datos

En la tabla 10, se muestra un resumen de los resultados de la capacidad germinativa (CG), el tiempo de latencia (TL) y la velocidad de germinación (VG) en relación a la concentración de AG₃.

Tabla 10

Análisis de datos sobre germinación respecto a la concentración de AG₃

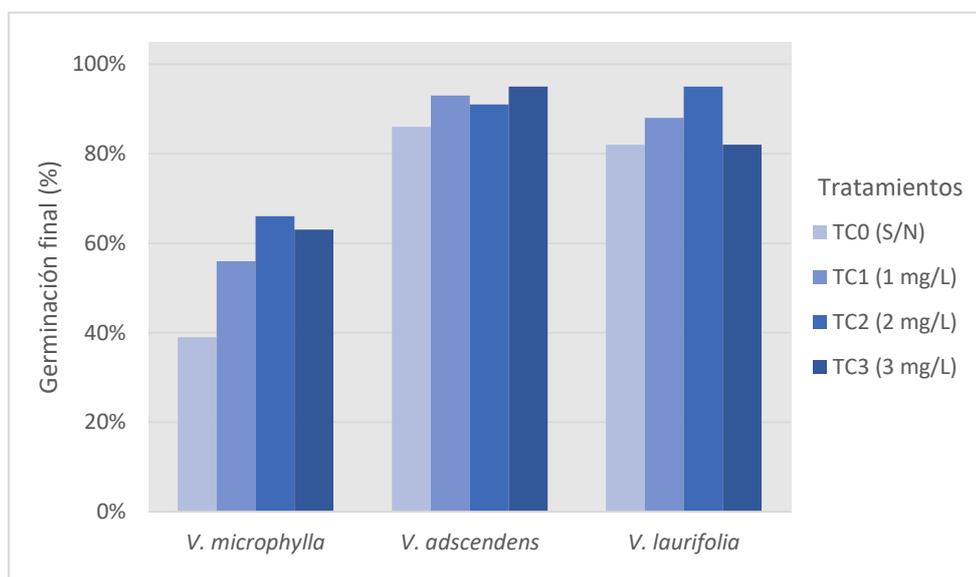
Tratamientos	Especies								
	<i>V. microphylla</i>			<i>V. adscendens</i>			<i>V. laurifolia</i>		
	CG (%)	TL (dd)	VG	CG (%)	TL (dd)	VG	CG (%)	TL (dd)	VG
TC0	39	24	2.61	86	14	11.32	82	14	9.73
TC1	56	21	4.61	93	9	13.64	88	14	11.12
TC2	66	24	5.93	91	9	13.97	95	14	12.49
TC3	63	24	5.64	95	14	14.97	82	9	10.44

Nota. Capacidad germinativa (CG), tiempo de latencia (TL) y velocidad de germinación (VG). TC0: Control sin hormona, TC1: 1 mg/L de AG₃, TC2: 2 mg/L de AG₃, TC3: 3 mg/L de AG₃.

En la figura 18, se presenta la capacidad germinativa (CG) sobre las tres especies de estudio. Con lo cual se determinó que, para *V. microphylla* y *V. laurifolia* el tratamiento TC2 (2 mg/L AG₃) presentó el mejor porcentaje final de germinación (66%, 95% respectivamente), en el caso de *V. adscendens* el mejor porcentaje final de germinación (95%) se dio con el tratamiento TC3 (3 mg/L AG₃).

Figura 18

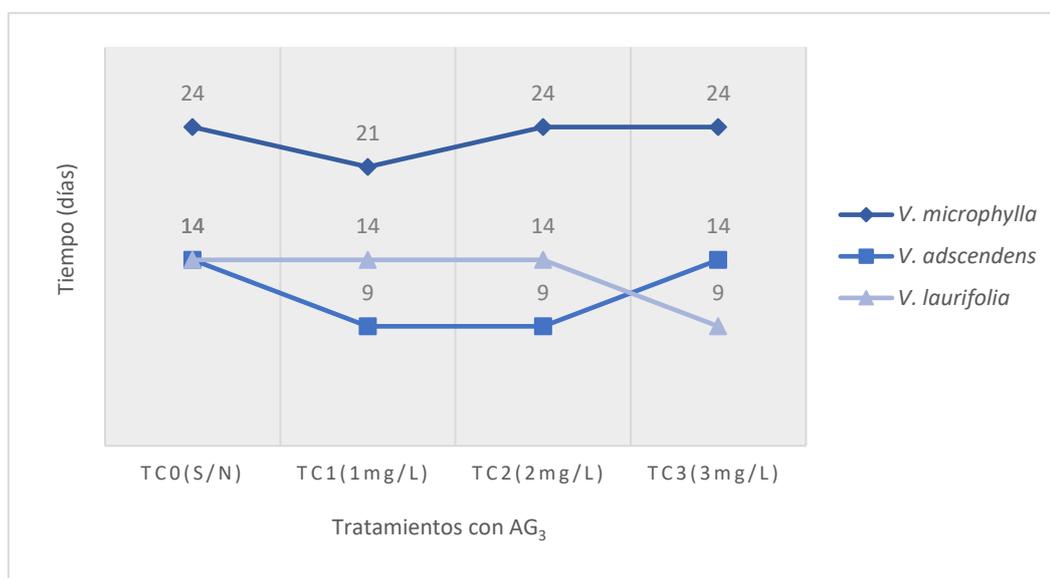
Capacidad germinativa (CG) respecto a la concentración de AG₃



En la figura 19, se muestra el tiempo de latencia (TL) sobre las tres especies de estudio. En *V. microphylla* el tratamiento TC1 (1 mg/L AG_3) presentó la primera semilla germinada (día 21), para *V. adscendens* en los tratamientos TC1 (1 mg/L AG_3) y TC2 (2 mg/L AG_3) se observaron las primeras semillas germinadas (día 9), finalmente para *V. laurifolia* en el tratamiento TC3 (3 mg/L AG_3) germinaron las primeras semillas (día 9).

Figura 19

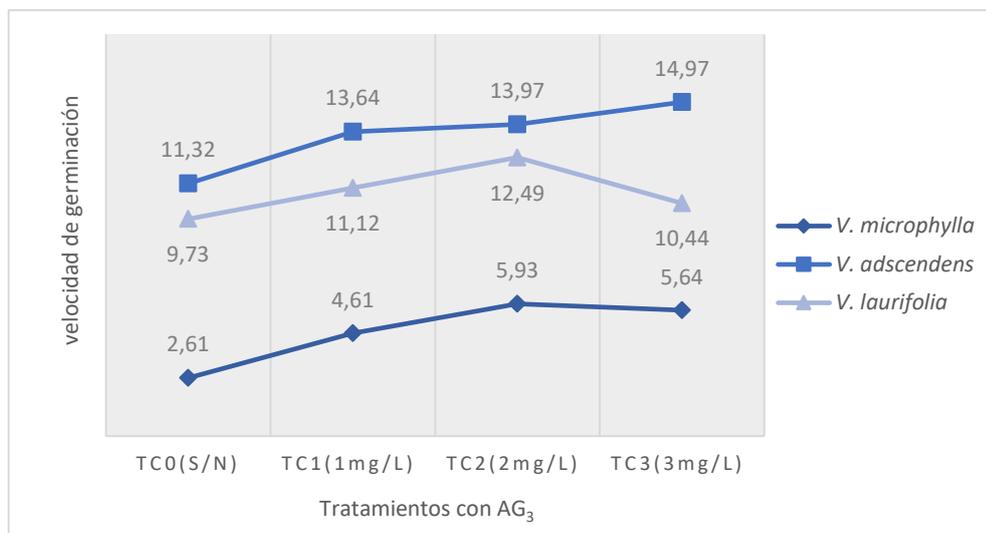
Tiempo de latencia (TL) respecto a la concentración de AG_3



En la figura 20, se presenta la velocidad de germinación (VG) obtenida para cada especie de estudio. Para *V. microphylla* y *V. laurifolia* el tratamiento TC2 presentó el valor más alto (5.93, 12.49 respectivamente) por lo que se determinó que la concentración de 2 mg/L de AG_3 genera mayores tasas de germinación, en el caso de *V. adscendens* el tratamiento TC3 presentó el valor más alto (14.97) por lo que se estableció que la concentración de 3 mg/L de AG_3 genera mayores tasas de germinación.

Figura 20

Velocidad de germinación (VG) respecto a la concentración de AG₃

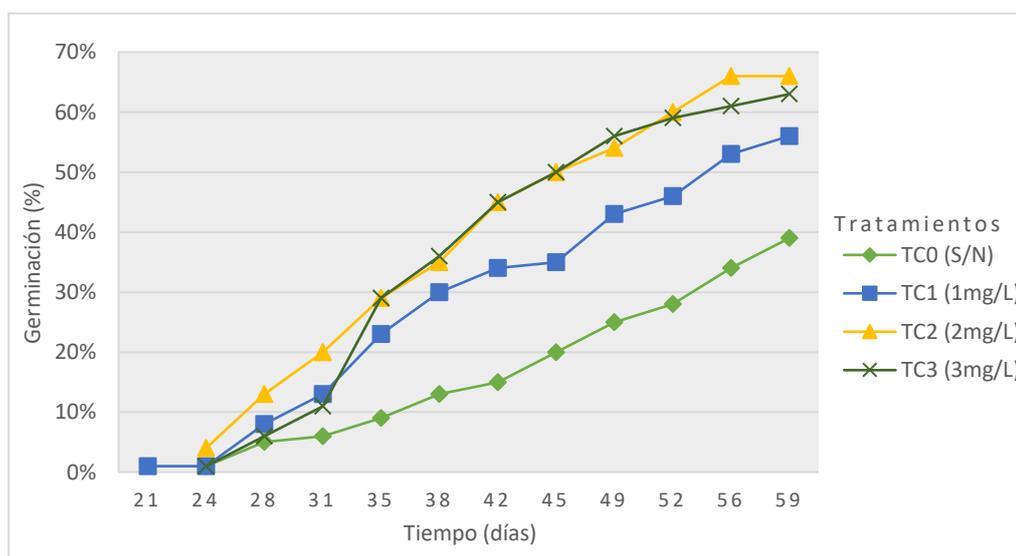


En las figuras 21, 22 y 23 se presenta la germinación acumulativa (GA) para las diferentes especies de estudio (*V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* respectivamente).

Para *V. microphylla*, el tratamiento TC2 en el día 56 de siembra ha alcanzado un porcentaje de germinación estable (66%) en contraste con los tratamientos TC0, TC1 y TC3 que al día 59 han mantenido una germinación progresiva en el tiempo (Figura 21).

Figura 21

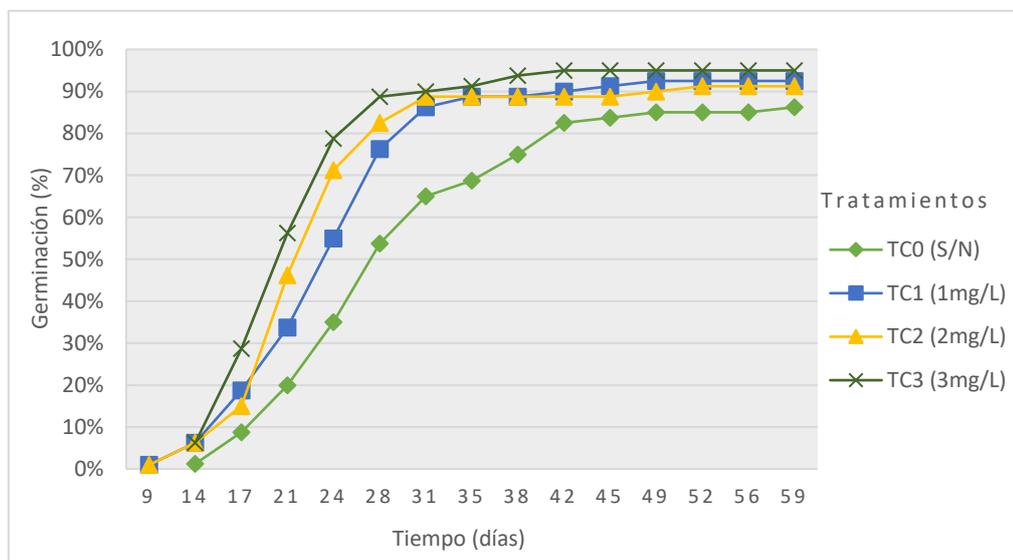
Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG₃ para Valeriana microphylla



En el caso de *V. adscendens*, el tratamiento TC3 alcanzó su máxima capacidad germinativa (95%) el día 42 de siembra siendo el más rápido, en contraste con el tratamiento control TC0 que al día 59 ha mantenido una germinación progresiva en el tiempo (Figura 22).

Figura 22

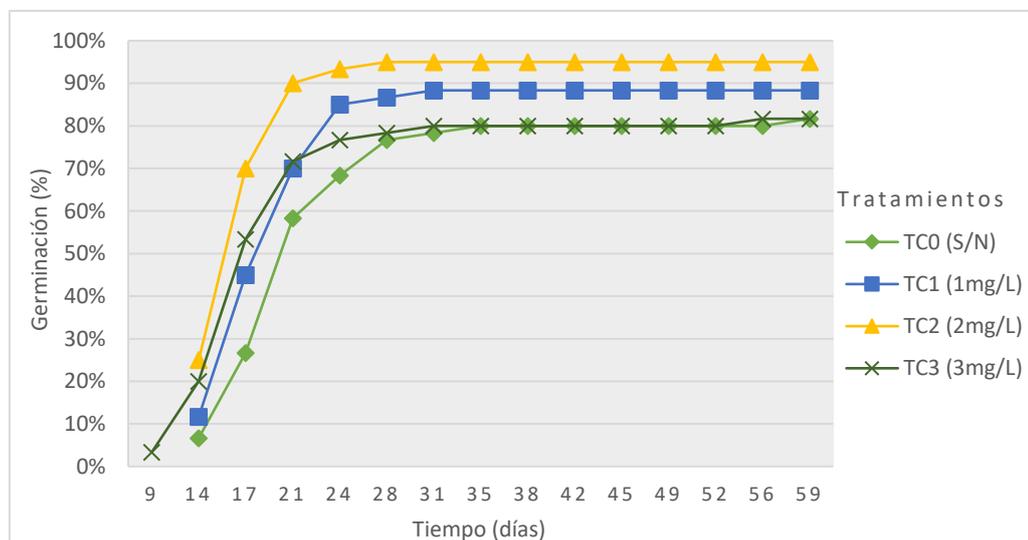
Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG₃ para Valeriana adscendens



Para *V. laurifolia* el tratamiento TC2 alcanzó su máxima capacidad germinativa (95%) el día 28 de siembra siendo el más rápido en contraste con el tratamiento control TC0 que alcanzó un primer porcentaje de germinación estable (80%) el día 35 (Figura 23).

Figura 23

Germinación acumulativa (GA) respecto a la concentración de AG₃ para Valeriana laurifolia



Análisis inferencial

Los datos obtenidos para la germinación con la aplicación de ácido giberélico, de las especies *V. microphylla* y *V. adscendens* siguen una distribución normal es decir son paramétricos, mostrado mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Anexos, Tabla 18), por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de *V. laurifolia* los datos obtenidos no siguen una distribución normal es decir no son paramétricos, lo cual se obtuvo mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Anexos, Tabla 18), por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por último, se aplicó la prueba de Duncan para conocer si existen diferencias entre las medias de cada tratamiento. El análisis se realizó de forma individual para cada especie estudiada.

De los análisis de varianza para cada especie se obtuvo, para *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* un p-valor (0.1039, 0.1114, 0.1741 respectivamente) mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Tabla 11).

En la prueba de Duncan, para *V. microphylla* se formaron dos grupos, en donde el tratamiento TC2 perteneciente al grupo a, presentó la media más alta (13.25), en contraste con el tratamiento control TC0 (7.75) perteneciente al grupo b. En el caso de *V. adscendens* se formaron dos grupos, en donde el tratamiento TC3 perteneciente al grupo a, presentó la mayor media (19.00), en contraste con el tratamiento control TC0 (17.25) perteneciente al grupo b. Finalmente, en *V. laurifolia* se formó un solo grupo a, sin embargo, el tratamiento TC2 presentó la media más alta (19.00) (Tabla 11).

Tabla 11

Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de germinación respecto a la concentración de AG₃

Especie	p-valor	Tratamientos			
		TC0	TC1	TC2	TC3
<i>V. microphylla</i>	0.1039	7.75 b	11.25 ab	13.25 a	12.50 ab
<i>V. adscendens</i>	0.1114	17.25 b	18.50 ab	18.25 ab	19.00 a
<i>V. laurifolia</i>	0.1741	16.33 a	17.67 a	19.00 a	16.33 a

Nota. Pruebas de ANOVA (*V. microphylla* y *V. adscendens*), Kruskal-Wallis (*V.*

laurifolia) y test de Duncan. TC0: Control sin hormona, TC1: 1 mg/L de AG₃, TC2: 2 mg/L de AG₃, TC3: 3 mg/L de AG₃.

Aplicación de tratamientos de fotoperiodo

Durante la aplicación de fotoperiodo en la germinación, se realizó un tratamiento de completa oscuridad y un tratamiento de exposición indirecta a la luz y oscuridad natural (Tabla 4). Los resultados se detallan a continuación.

Análisis exploratorio de datos

En la tabla 12, se muestra un resumen de los resultados de la capacidad germinativa (CG), el tiempo de latencia (TL) y la velocidad de germinación (VG) en relación a los tratamientos de fotoperiodo.

Tabla 12

Análisis de datos sobre germinación respecto a la aplicación de fotoperiodo

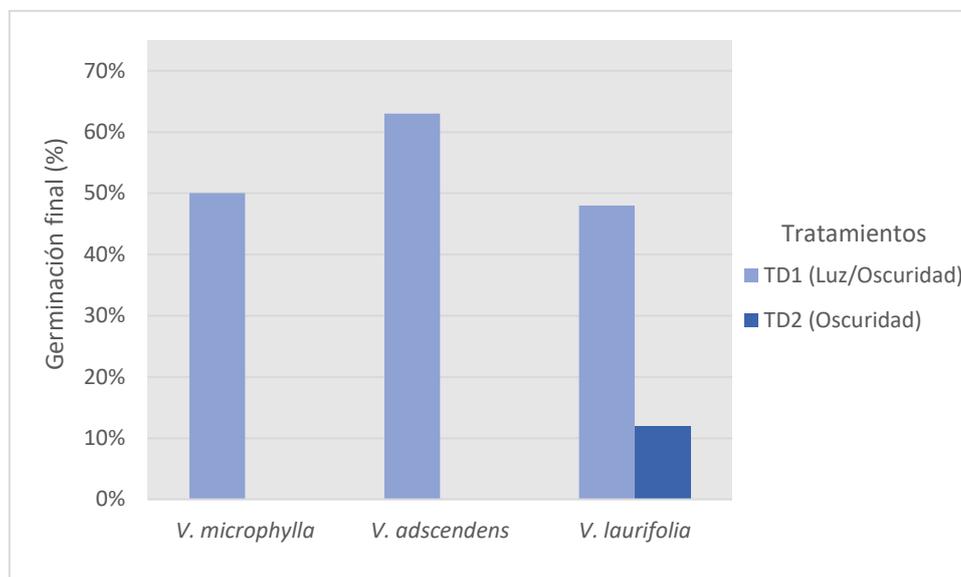
Tratamientos	Especies								
	<i>V. microphylla</i>			<i>V. adscendens</i>			<i>V. laurifolia</i>		
	CG (%)	TL (dd)	VG	CG (%)	TL (dd)	VG	CG (%)	TL (dd)	VG
TD1	50	23	4.05	63	13	8.53	48	13	5.98
TD2	0	-	-	0	-	-	12	27	0.66

Nota. Capacidad germinativa (CG), tiempo de latencia (TL) y velocidad de germinación (VG). TD1: tratamiento luz/oscuridad natural, TD2: tratamiento oscuridad total.

El tratamiento TD2 (Oscuridad) no presentó germinación para *V. microphylla* y *V. adscendens*, en el caso de *V. laurifolia* presentó un porcentaje bajo (12%). Para *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) generó el mayor porcentaje final de germinación (50%, 63% y 48% respectivamente) (Figura 24).

Figura 24

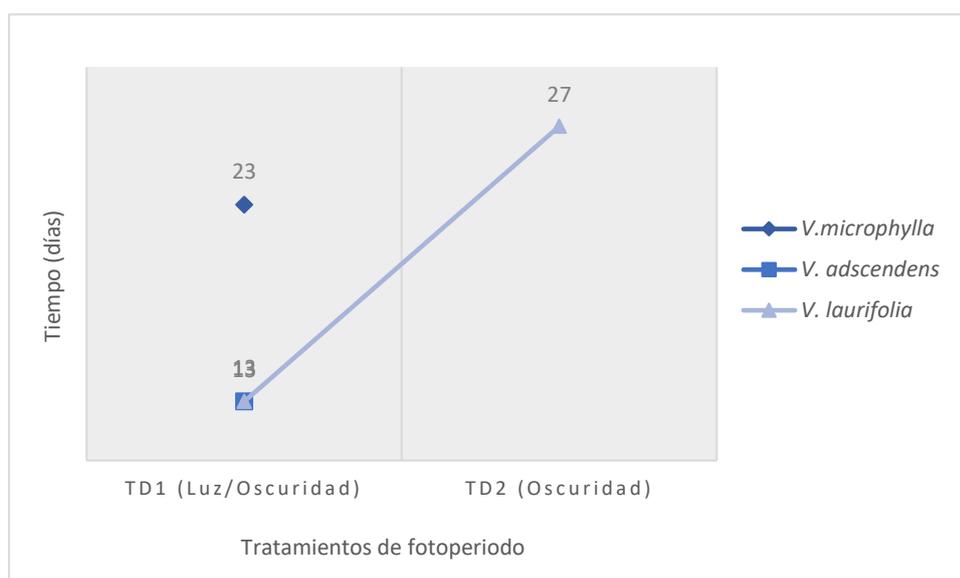
Capacidad germinativa (CG) respecto a la aplicación de fotoperiodo



El tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) presentó las primeras semillas germinadas en *V. microphylla* el día 23 y en *V. adscendens* el día 13. En el caso de *V. laurifolia* el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) presentó las primeras semillas germinadas el día 13, en contraste con el tratamiento TD2 (Oscuridad) que se dio el día 27 (Figura 25).

Figura 25

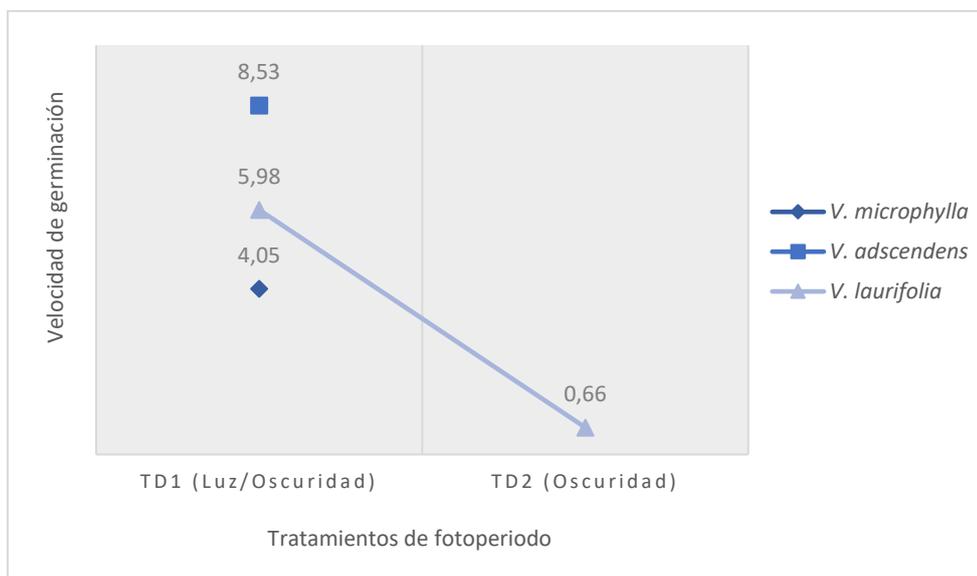
Tiempo de latencia (TL) respecto a la aplicación de fotoperiodo



El tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) presentó una velocidad de germinación de 4.05 en *V. microphylla* y de 8.53 en *V. adscendens*. En cuanto a *V. laurifolia* el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) presentó una velocidad de germinación de 5.98 mayor al tratamiento TD2 (Oscuridad) que fue de 0.66 (Figura 26).

Figura 26

Velocidad de germinación (VG) respecto a la aplicación de fotoperiodo

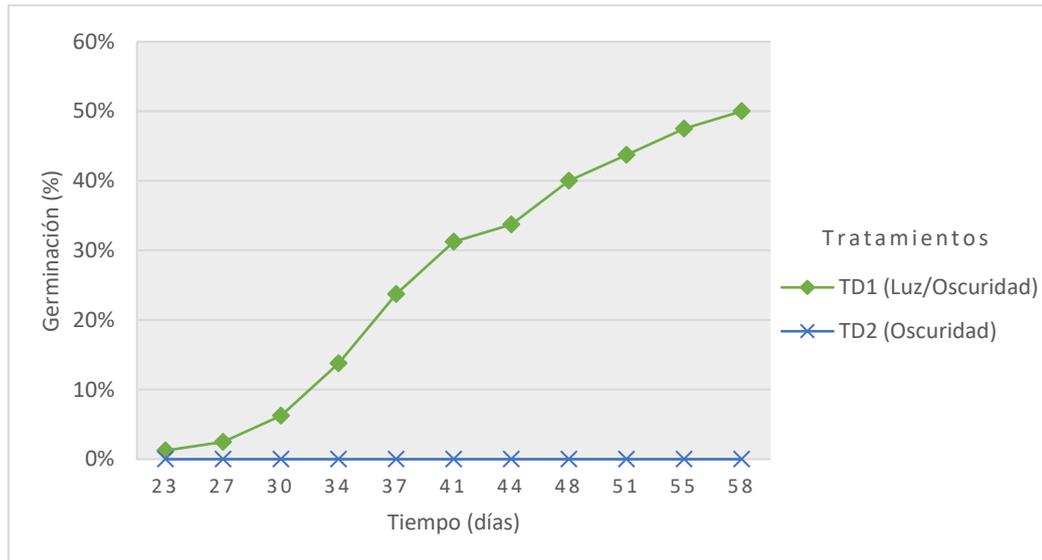


En las figuras 27, 28 y 29 se presenta la germinación acumulativa (GA) para las diferentes especies de estudio (*V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* respectivamente).

Para *V. microphylla*, el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) ha mantenido una germinación progresiva en el tiempo al día 58 de siembra (Figura 27).

Figura 27

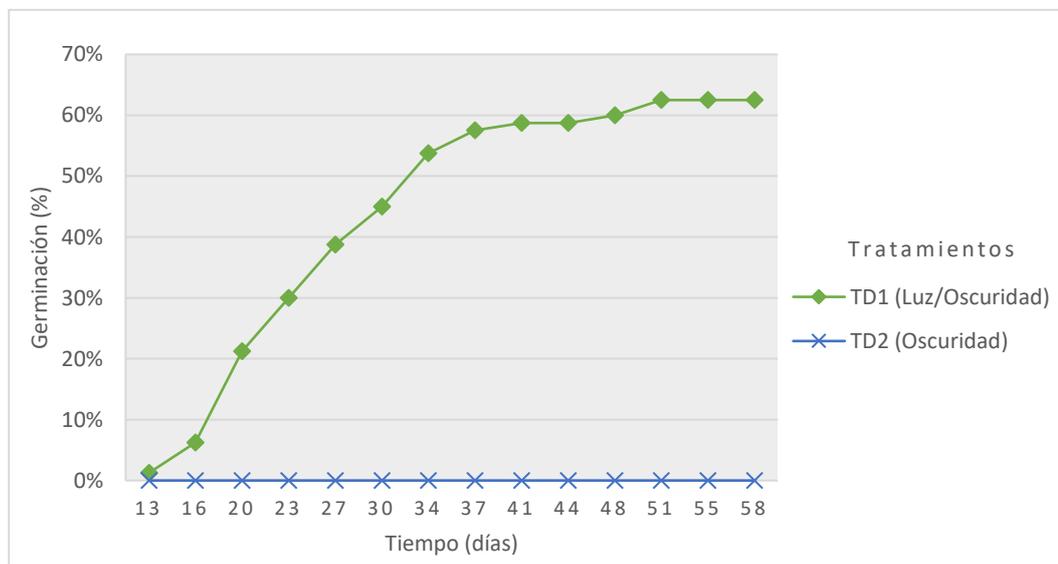
*Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para
Valeriana microphylla*



En *V. adscendens*, el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) alcanzó su máxima capacidad germinativa (63%) el día 51 de siembra (Figura 28).

Figura 28

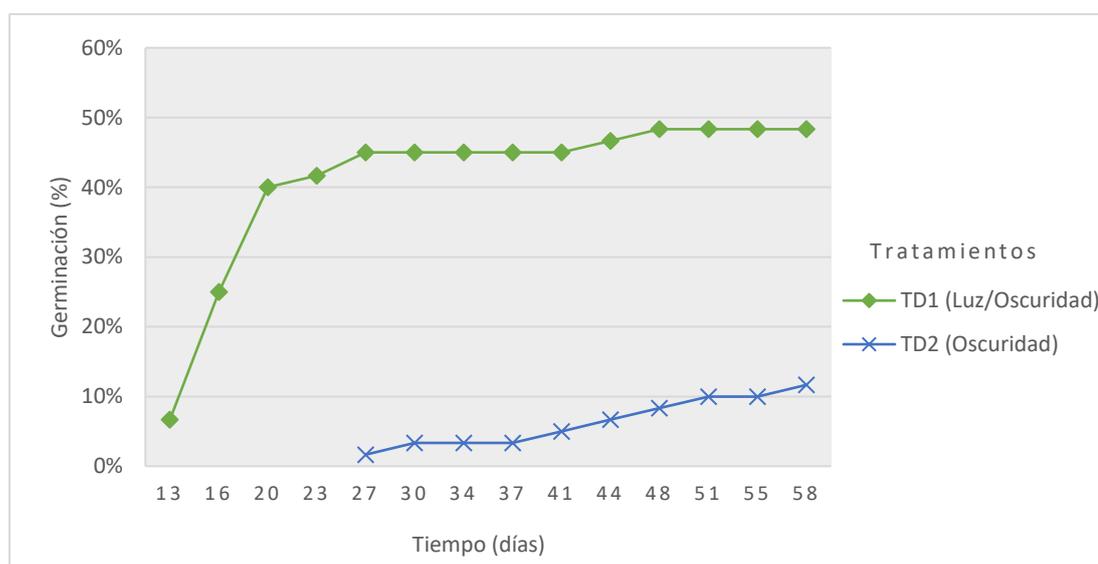
*Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para
Valeriana adscendens*



En el caso de *V. laurifolia*, el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) alcanzó su máxima capacidad germinativa (48%) el día 48 de siembra, en contraste con el tratamiento TD2 (Oscuridad) que ha mantenido una germinación progresiva en el tiempo (Figura 29).

Figura 29

Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de fotoperiodo para Valeriana laurifolia



Análisis inferencial

Los datos obtenidos para la germinación con la aplicación de fotoperiodo en las tres especies de estudio siguen una distribución normal, es decir son paramétricos, lo cual se obtuvo mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Anexos, Tabla 19). Por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a cada una de las especies de estudio para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Finalmente se aplicó la prueba de Duncan para conocer si existen diferencias entre las medias de cada tratamiento. El análisis se realizó de forma individual para cada especie estudiada.

Del análisis de varianza se obtuvo, para *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* un p-valor (3.436e-05, 0.0005104 y 0.001473 respectivamente) menor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$) por lo que se determinó que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Tabla 13).

En la prueba de Duncan, para *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* se formaron dos grupos, en donde el tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) perteneciente al grupo a, presenta la mayor media (10.00, 12.50, 9.67 respectivamente) (Tabla 13).

El tratamiento más adecuado para obtener un mayor número de semillas germinadas es el TD1 (Luz/Oscuridad).

Tabla 13

Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de fotoperiodo

Especie	p-valor	Tratamientos	
		TD1	TD2
<i>V. microphylla</i>	3.436e-05***	10.00 a	00.00 b
<i>V. adscendens</i>	0.0005104***	12.50 a	00.00 b
<i>V. laurifolia</i>	0.001473**	9.67 a	2.33 b

Nota. Pruebas de ANOVA y test de Duncan. TD1: tratamiento luz/oscuridad natural, TD2: tratamiento oscuridad total.

Aplicación de tratamientos de termoperiodo

Durante la aplicación de termoperiodo en la germinación, se realizaron tres tratamientos en los que se probaron temperatura ambiente (Figura 17), 20°C y 5°C (Tabla 5). Los resultados se detallan a continuación.

Análisis exploratorio de datos

En las especies *V. microphylla* y *V. adscendens* no se presentó germinación en ninguno de los tratamientos para termoperiodo.

En la tabla 14, se muestra un resumen sobre la capacidad germinativa (CG), el tiempo de latencia (TL) y la velocidad de germinación (VG) en relación a los tratamientos de termoperiodo para *V. laurifolia*.

Tabla 14

Análisis de datos sobre germinación respecto a la aplicación de termoperiodo en Valeriana laurifolia

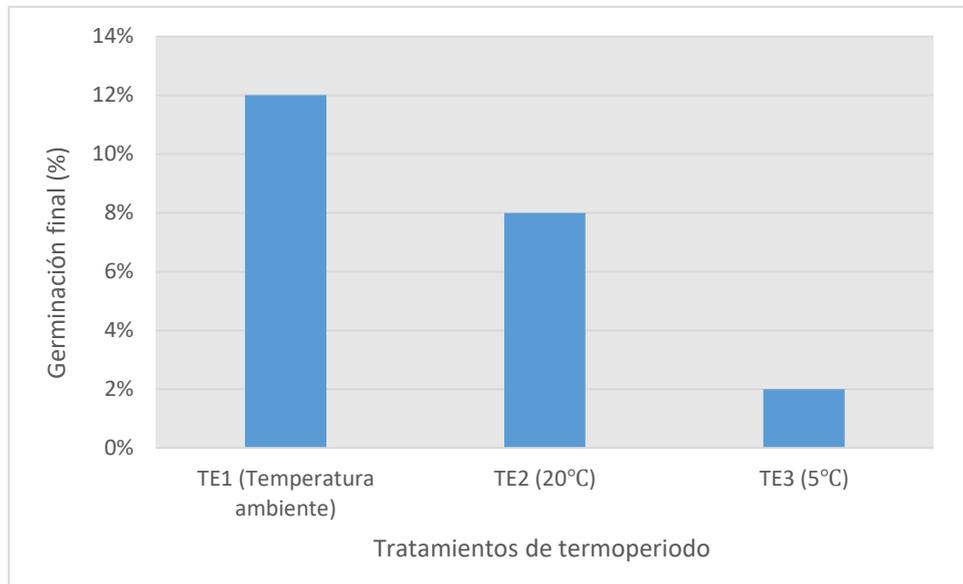
Tratamientos	Parámetros		
	CG (%)	TL (dd)	VG
TE1	12	27	0.66
TE2	8	27	0.67
TE3	2	51	0.05

Nota. Capacidad germinativa (CG), tiempo de latencia (TL) y velocidad de germinación (VG).

El tratamiento TE1 (Temperatura ambiente) generó el mayor porcentaje final de germinación (12%), en contraste con el tratamiento TE3 (5°C) (2%) (Figura 30).

Figura 30

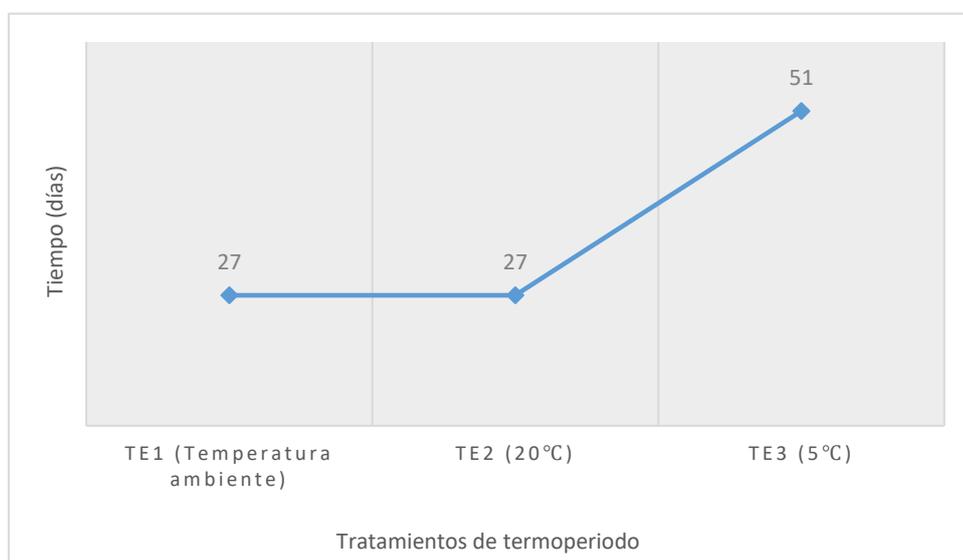
Capacidad germinativa (CG) respecto a la aplicación de termoperiodo para Valeriana laurifolia



Los tratamientos TE1 (temperatura ambiente) y TE2 (20°C) presentaron las primeras semillas germinadas en el día 27 (Figura 31).

Figura 31

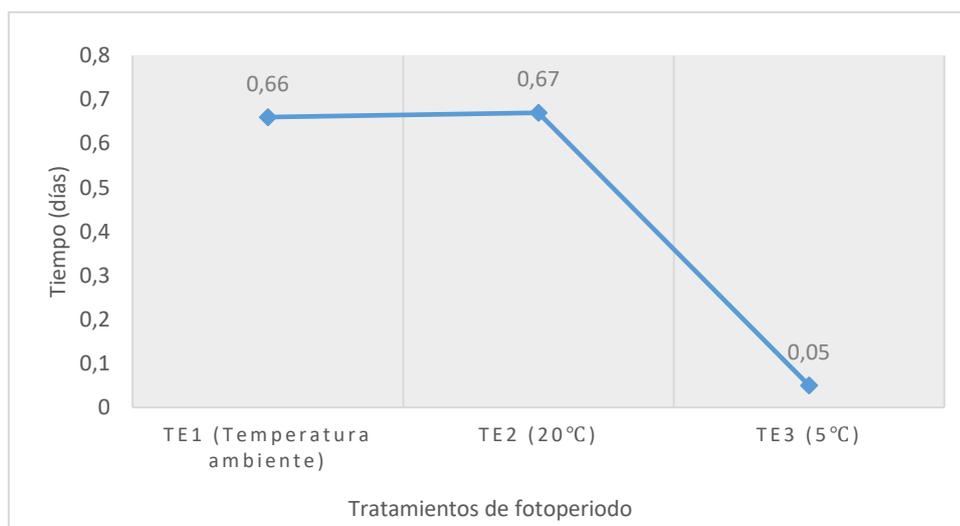
Tiempo de latencia (TL) respecto a la aplicación de termoperiodo para Valeriana laurifolia



Los tratamientos TE1 (temperatura ambiente) y TE2 (20°C) presentaron las velocidades de germinación más altas (0.66 y 0.67 respectivamente) (Figura 32).

Figura 32

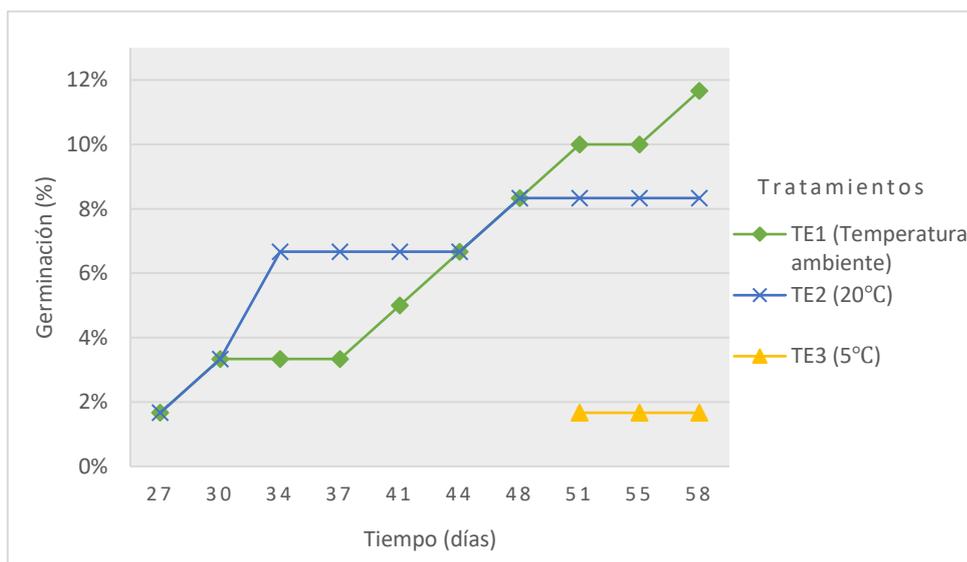
Velocidad de germinación (VG) respecto a la aplicación de termoperiodo para Valeriana laurifolia



Los tratamientos TE1 (temperatura ambiente) y TE2 (20°C) han mantenido una germinación lenta en el tiempo sin alcanzar una germinación máxima (Figura 33).

Figura 33

Germinación acumulativa (GA) respecto a la aplicación de termoperiodo para Valeriana laurifolia



Análisis inferencial

Los datos obtenidos para la germinación con la aplicación de termoperiodo de *V. laurifolia* siguen una distribución normal, es decir son paramétricos, lo cual se obtuvo mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Anexos, Tabla 20). Por lo tanto, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por último, la prueba de Duncan para conocer si existen diferencias entre las medias de cada tratamiento.

Se obtuvo un p-valor (0.05992) mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$), por lo que se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Sin embargo, mediante la prueba de Duncan, se establecieron dos grupos, en donde el tratamiento TE1 (temperatura ambiente) perteneciente al grupo a presenta la media más alta (2.33) (Tabla 15).

Tabla 15

Valores obtenidos en las pruebas estadísticas para los tratamientos de termoperiodo en Valeriana laurifolia

Especie	p-valor	Tratamientos		
		TE1	TE2	TE3
<i>V. laurifolia</i>	0.05992	2.33 a	1.67 ab	0.33 b

Nota. Pruebas de ANOVA y test de Duncan. TE1: temperatura ambiente, TE2: 20°C, TE3: 5°C.

Capítulo V: Discusión

El páramo es uno de los ecosistemas más ricos del mundo gracias a su gran diversidad y endemismo. En los páramos ecuatorianos vive el 15% de toda la flora endémica del país (Mena et al., 2011). Sin embargo, la ley de Biodiversidad del Ecuador, considera a los páramos como ecosistemas frágiles, a causa de los daños que han sufrido a lo largo del tiempo (Mena et al., 2001). Por ello, la implementación de estrategias de conservación de material genético, es clave para perpetuar las especies vegetales y restaurar el ecosistema.

Dentro de la vegetación de los páramos ecuatorianos se encuentra la familia Valerianaceae, la cual presenta gran importancia medicinal y ornamental (Kutschker, 2011). Las poblaciones rurales que habitan estos ecosistemas, utilizan estos recursos de forma natural, como parte de la medicina tradicional (Mena et al., 2011). Las principales estructuras medicinales en valeriana son las raíces y rizomas, ya que en ellas se encuentran sus principios activos. Por lo tanto, la planta es extraída en su totalidad para su uso, causando un problema mayor en su vulnerabilidad (Kadereit & Bittrinch, 2016). A pesar de ello, el Ecuador no cuenta con programas de gestión basados en el aprovechamiento sostenible y la conservación de especies de páramo, manteniéndose como un campo poco estudiado e investigado. Por esta razón, es de especial importancia establecer una base para la implementación de estrategias de conservación (Mena et al., 2011).

Una de las mejores estrategias de conservación *ex situ* de plantas silvestres, es el establecimiento de bancos de germoplasma, ya que permiten proteger y preservar las especies amenazadas evitando su desaparición (Bacchetta et al., 2008). De esa forma se logran ejecutar planes de restauración y recuperación de poblaciones (Ortiz, 2015).

Para el desarrollo de bancos de germoplasma, es importante tener conocimiento principalmente de la viabilidad y capacidad germinativa (ENSCONET,

2009), así como de la morfología de las semillas que van a ser almacenadas, ya que de esto dependerá la longevidad del lote (Romero & Pérez, 2016). En base a ello, el presente estudio comprende la descripción de la estructura morfológica de las semillas de las especies silvestres *Valeriana microphylla* Kunth, *Valeriana adscendens* Turz. y *Valeriana laurifolia* Kunth. Y la estandarización de protocolos para los ensayos de viabilidad, desinfección y germinación de sus semillas.

La observación del fruto-semilla de las especies de estudio a través de estereomicroscopía permitió definir sus principales características, lo cual es importante para su correcta separación e identificación de los diferentes taxones, además de ayudar a distinguir las diferentes especies más allá de las características relacionadas con hojas, flores y forma de crecimiento (Kutschker, 2008). Según la clasificación de Kutschker (2008) para la morfología del fruto-semilla del género *Valeriana*, *V. adscendens* pertenece al grupo III (fruto con presencia de cáliz desarrollado en papus plumoso y glabro en toda la superficie). En el caso de *V. microphylla* y *V. laurifolia* pertenecen al grupo IV (fruto con cáliz desarrollado en papus y superficie pubescente o hirsuta en una o ambas caras).

La presencia de papus en las tres especies se relaciona principalmente con el modo de dispersión (Bell & Donoghue, 2004). Esta adaptación de la semilla le permite transportarse a través del viento (dispersión anemocoria), recorriendo grandes distancias (dispersión longinqua) (Troiani et al., 2017). El peso ligero (23 ± 1 a 27 ± 4 mg para 100 semillas), sumado al tamaño pequeño (largo 1.1 ± 0.1 a 1.8 ± 0.1 mm, ancho 0.8 ± 0.1 a 0.9 ± 0.1 mm) de las semillas de estas especies, potencia su movilidad durante la dispersión (Buitrago-Méndez & López-Herrera, 2015).

La forma de dispersión anemocoria y longinqua que presentan las especies de estudio, favorece sus procesos de regeneración dentro del ambiente extremo del páramo, mediante la estrategia de colonización de nuevas áreas. Esto permite que las especies se alejen de factores negativos desarrollados alrededor de la planta

madre y logren encontrar el lugar más adecuado para su desarrollo (Castor, 2002). Sin embargo, una desventaja de esta forma de dispersión, es que pueden encontrarse con ambientes menos favorables para su regeneración. Por ejemplo, suelos sin vegetación, en donde la insolación, la falta de humedad y las bajas temperaturas no permitirán que la planta se establezca (Seminario-Cunya et al., 2016).

El ambiente hostil de los páramos, ejerce un rango de presión selectiva sobre las plantas que lo habitan, a lo cual deben adaptarse para sobrevivir y reproducirse de forma efectiva (Badii et al., 2013). Las especies de valeriana han adoptado estrategias ecológicas de selección r/K , en un espectro continuo (Morales, 1968). Las tres especies de estudio se han especializado en reproducirse a través de grandes cantidades de semillas con técnicas de dispersión asociadas (estrategia r), junto a altos porcentajes de viabilidad embrionaria (estrategia K) (Badii et al., 2013). *V. microphylla* con un porcentaje de viabilidad del 97%, *V. adscendens* del 95% y *V. laurifolia* del 72%.

Las semillas constituyen la unidad de dispersión total, manteniendo la variación de la progenie, permitiendo una mayor adaptabilidad ecológica, lo cual es importante en planes de conservación y restauración de especies (Vargas & Pérez, 2014). Por otra parte, el cultivo *in vitro* permite potenciar la capacidad germinativa de las semillas especialmente en aquellas que presentan dormancia, además de obtener plántulas asépticas y libres de patógenos que a futuro pueden usarse como fuente de explantes (Bueno et al., 2009).

Comúnmente, las plantas de especies silvestres, están expuestas a la presencia de una serie de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras, que limitan su germinación y crecimiento (Cárdenas-Burgos et al., 2019). Durante la fase de establecimiento *in vitro* del material vegetal, estos microorganismos son detectados al crecer favorablemente en el medio de cultivo, llegando a ser dañinos

para el explante. Compiten por los nutrientes del medio evitando el correcto desarrollo de las plantas y produciéndoles daños directos e indirectos al colonizar sus tejidos o liberar metabolitos tóxicos en el medio (Hernández & González, 2010). Por lo tanto, determinar un protocolo de desinfección adecuado para las especies de estudio según el tipo de material vegetal, es imprescindible para garantizar la eliminación de los contaminantes y evitar el daño de la estructura vegetal (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

En cultivo *in vitro* los desinfectantes comúnmente utilizados son etanol (70%) e hipoclorito de sodio (NaClO) (1-2%, 5-10 minutos) (Bacchetta et al., 2008), generalmente aplicados juntos en una doble desinfección. En algunos casos es útil el uso de algún agente tensoactivo (Roca & Mroginski, 1993), como primer paso para romper la tensión superficial y permitir que el explante tenga un mejor contacto con los desinfectantes (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994). En base a lo anterior, se estableció un protocolo basado en el uso de detergente (1%, 10 minutos), etanol (70%, 1 minuto) e hipoclorito de sodio (1 y 2 %, 5 y 10 minutos) como agente evaluado. En este sentido, Cárdenas-Burgos et al. (2019), reportaron un alto porcentaje de desinfección (57%) en semillas de *Bucquetis glutinosa* (especie endémica del páramo) al aplicar una doble desinfección con alcohol e hipoclorito de sodio, y un tensoactivo (Tween 20).

El análisis estadístico acerca de los protocolos de desinfección mostró que para *V. microphylla* los tratamientos TB1 (NaClO 1%, 5 min) y TB2 (NaClO 2%, 5min) dieron como resultado semillas libres de contaminación (100%), sin embargo, el tratamiento TB1 reporta el mayor número de semillas germinadas (21%). En el caso de *V. adscendens* el tratamiento TB2 (NaClO 2%, 5min) es el mejor para su desinfección obteniendo el mayor porcentaje (99%) de semillas no contaminadas y uno de los porcentajes más altos de germinación (73%). Para *V. laurifolia* los tratamientos TB3 (NaClO 1%, 10 min) y TB4 (NaClO 2%, 10 min) generaron semillas

libres de contaminación (100%), sin embargo, el tratamiento TB4 resultó en un mayor número de semillas germinadas (25%).

Los resultados obtenidos muestran que el uso de hipoclorito de sodio en el protocolo de desinfección actuando como un agente de doble desinfección, favorece ampliamente la eliminación de contaminantes. Adicionalmente, se evidencia que la concentración y el tiempo de inmersión son dependientes, lo cual determina la calidad de la desinfección, tal como lo afirma Diomedi et al. (2017). De acuerdo a Hsiao & Quick (1984), la germinación también se ve favorecida gracias a que el hipoclorito de sodio aumenta la permeabilidad de la semilla mejorando la absorción de agua.

Resultados semejantes se han reportado para otras especies del género *Valeriana*. Como es el caso de Carrera (2014), quien indicó que un tratamiento de desinfección de NaClO al 1% por 5 minutos será efectivo para *Valeriana pyramidalis* Kunth. Por otro lado, para *Valeriana pilosa* Ruiz & Pav., Medina (2017) mostró que el mejor tratamiento para desinfección y germinación es NaClO al 2% por 5 minutos. Finalmente, Dini et al. (2013) sugieren que para *Valeriana officinalis* L. un tratamiento de desinfección de NaClO 2% por 10 minutos es adecuado. En consecuencia, se puede deducir que tanto la concentración como el tiempo de inmersión en NaClO óptimos para la desinfección y germinación son propios de cada especie. Por lo tanto, siempre será importante realizar estudios previos en aquellas especies de las que no se tiene conocimiento. Sin embargo, en base a la información recopilada, se puede establecer un rango de concentración de NaClO de 1-2% y tiempo de inmersión de 5-10 minutos para el género *Valeriana*.

En ecosistemas de páramo, las semillas de la mayoría de sus especies presentan una germinación irregular y relativamente baja, debido a que se encuentran en estado de latencia (Besnier, 1976). Este hecho, se debe principalmente, a que los suelos tienden a perder nutrientes a medida que aumenta

la altitud, generando competencia entre las especies (Vargas & Pérez, 2014). Al realizar procesos de germinación, es importante brindar a la semilla las condiciones propicias para liberarla de la dormancia y estimular su desarrollo. Los principales factores externos a considerar para tener éxito son luz, temperatura y humedad (Hartmann & Kester, 1997).

En la mayoría de las semillas de páramo, la germinación se ve favorecida por la presencia de luz (Bacchetta et al., 2008). Esto facilita la formación de bancos de semillas en el suelo profundo o vegetación cerrada, ya que su germinación será inhibida en oscuridad. Sin embargo, existen especies altoandinas que no requieren de luz para germinar, y se ven favorecidas en condiciones de oscuridad. Por lo tanto, es importante realizar pruebas de fotoperiodo (Vargas & Pérez, 2014).

En este trabajo se determinó que para las tres especies de estudio la luz es un factor indispensable en la germinación de semillas, siendo consideradas con fotosensibilidad positiva (Pérez, 2003). El tratamiento TD1 (Luz/Oscuridad) obtuvo las capacidades germinativas más altas, para *V. microphylla* del 50%, en *V. adscendens* del 63% y *V. laurifolia* del 48%. Por otro lado, en el caso de *V. microphylla* y *V. adscendens* en condiciones de completa oscuridad no existió germinación y para *V. laurifolia* la germinación fue muy baja (12%).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Medina (2017) para *Valeriana pilosa* Ruiz & Pav. en donde en condiciones de luz obtuvieron un mejor porcentaje de germinación (47%). Por el contrario, Carrera (2014) indicó que para *Valeriana pyramidalis* Kunth la oscuridad influyó de manera positiva en el porcentaje de germinación (80%), sin embargo, mencionan que esto puede deberse a su condición domesticada. Acorde a esto, podemos inferir que para especies silvestres del género *Valeriana* el requerimiento de luz es importante para la germinación, sin embargo, de ser necesario cuando no se tiene conocimiento de los requerimientos de la especie se debe realizar un análisis previo.

Cada especie tiene un intervalo de temperatura óptimo al cual ocurre el máximo de su germinación en el menor tiempo posible. Sin embargo, un gran número de especies reaccionan favorablemente a una alternancia de temperatura. Analizar la germinación a temperaturas constantes en contraste con un régimen alternado puede ofrecer resultados diferentes (Osuna et al., 2017).

Las condiciones de termoperiodo utilizadas afectaron de forma variable la germinación de *V. laurifolia*, observándose que el porcentaje de semillas germinadas fue mayor (12%) bajo el tratamiento TE1 (temperatura ambiental). Este resultado indica que una alternancia en la temperatura (día/noche) en periodos que oscilan entre 25.5°C/día - 14.1°C/noche influyen positivamente ya que simula las condiciones de su hábitat natural. En contraste con temperaturas constantes (20°C) y temperaturas bajas (5°C) en donde se obtuvieron porcentajes de germinación bajos (8% y 2% respectivamente) (ENSCONET, 2009).

Los equipos utilizados en los tratamientos de termoperiodo presentaban únicamente condiciones de oscuridad, lo cual afectó de forma negativa la germinación de las semillas. Causando en *V. microphylla* y *V. adscendens* una ausencia de germinación imposibilitando su análisis. Por lo tanto, al presentar fotosensibilidad positiva, la luz es el factor principal para su germinación, independientemente de que las condiciones de humedad, oxígeno y temperatura hayan sido adecuadas (Pérez, 2003).

Además de la importancia de factores externos (humedad, temperatura, luz), la viabilidad del embrión y la dormancia son elementos que influyen directamente en la germinación (Hartmann & Kester, 1997). La aplicación de ácido giberélico (AG₃) en el medio de cultivo puede ayudar a levantar la dormancia (ENSCONET, 2009), ya que estimula la germinación, ayudando a la maduración del embrión (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

Se encontraron resultados favorables en la germinación con la aplicación de ácido giberélico en el medio de cultivo. Para *V. microphylla* y *V. laurifolia* se obtuvo el mejor porcentaje final de germinación (66% y 95% respectivamente) junto a la velocidad de germinación más alta (5.93 y 12.49 respectivamente) con la aplicación del tratamiento TC2 (2 mg/L AG₃). Por otro lado, en *V. adscendens* el tratamiento TC3 (3 mg/L AG₃) presentó un mayor porcentaje final de germinación (95%) y la mejor velocidad de germinación (14.97). Estos resultados muestran que el ácido giberélico promovió y aceleró la germinación. Adicionalmente, el porcentaje y velocidad de germinación son dependientes de la concentración de ácido giberélico aplicado.

De la misma manera ocurre en *Valeriana pyramidalis* Kunt, según el estudio realizado por Carrera (2014) la concentración de 3mg/L de AG₃ generó un mayor porcentaje de semillas germinadas (80%). Adicionalmente, en concordancia con lo reportado por Rosales (2014) para *Valeriana sp.*, la aplicación de AG₃ en bajas concentraciones (1 mg/L AG₃) no presenta un efecto positivo considerable en la germinación de las especies de *Valeriana*, sin embargo, a partir de concentraciones de 2 mg/L se obtuvieron excelentes resultados. Por otro lado, en el caso de *V. microphylla* y *V. laurifolia* la germinación disminuyó con la concentración más elevada (3 mg/L AG₃), esto puede deberse a que a concentraciones altas de AG₃ en dependencia con la especie de estudio puede llegar a ser tóxico (Roca & Mroginski, 1993).

Los resultados obtenidos en el análisis de germinación, indican que las especies de estudio presentan dormancia. Según Vargas & Pérez (2014), principalmente presentan fotodormancia ya que es indispensable un requerimiento de luz para su germinación y dormancia endógena fisiológica ya que el uso de ácido giberélico favorece altamente la germinación indicando que las semillas son viables.

Para la conservación de semillas en bancos de germoplasma, se sigue un proceso de desecación y almacenamiento a bajas temperatura (ENSCONET, 2009). Para ello, es necesario conocer la resistencia de las semillas a este proceso y así poder clasificarlas en ortodoxas o recalcitrantes. De esta manera se pueden seleccionar las semillas aptas para su conservación con la menor pérdida posible de viabilidad (Vargas & Pérez, 2014). En este sentido, las semillas ortodoxas toleran la deshidratación sin afectar su viabilidad, lo que les permite ser conservadas sin inconveniente durante mucho tiempo (Romero & Pérez, 2016).

Las semillas ortodoxas cumplen con ciertos rasgos morfológicos, producen una gran cantidad de semillas, tienen tamaños menores a 17 mm de largo y 13 mm de ancho y tienden a ser más livianas (Romero & Pérez, 2016). De los resultados obtenidos en este trabajo se pudo ver que las tres especies de estudio presentan grandes cantidades de semillas, tienen tamaño pequeño (largo 1.1 ± 0.1 a 1.8 ± 0.1 mm, ancho 0.8 ± 0.1 a 0.9 ± 0.1 mm) y un peso ligero (23 ± 1 a 27 ± 4 mg para 100 semillas), por lo tanto, se puede inferir que mantienen un comportamiento ortodoxo. Esta información pudo ser corroborada mediante los ensayos de germinación, en donde las especies tuvieron altos porcentajes de germinación a pesar de que fueron almacenadas durante un periodo de 5 meses (Vargas & Pérez, 2014).

El material almacenado en los bancos de germoplasma es de gran valor y se espera conservarlo por periodos largos de tiempo. Sin embargo, el paso del tiempo y las condiciones de almacenamiento, pueden comprometer la viabilidad de las semillas. Por ello, es fundamental evaluar la calidad propagativa desde su ingreso y durante el tiempo de conservación. La prueba de viabilidad mediante tetrazolio es una alternativa rápida y económica, no obstante, al igual que las pruebas germinativas este ensayo requiere de su optimización (Ortiz, 2015).

Al no existir información previa acerca de la prueba de tetrazolio en las especies de estudio, se utilizaron los parámetros estándar establecidos en ISTA (2016), en cuanto a concentración (tetrazolio 1%), tiempo de remojo de semillas (24 horas) y condiciones de incubación (30°C, oscuridad). Pereira et al. (2019) destacan la importancia de la preparación de la semilla previa al ensayo. Por ello, mediante una evaluación rápida se estableció que la mejor opción para realizar una correcta tinción es extraer el embrión completo después de la imbibición en agua, ya que para el embrión no es factible realizar cortes.

El tiempo de exposición a la solución de tetrazolio es un parámetro determinante que depende de cada especie (Salazar et al., 2020). Basado en ello, se encontró que para las tres especies de estudio el tratamiento TA2 (6 horas de inmersión) generó el mayor porcentaje de embriones viables. Contrastando los resultados de viabilidad y germinación, para *V. adscendens* el porcentaje de viabilidad y el máximo alcanzado en germinación es el mismo (95%) esto nos indica que las condiciones de la prueba de tetrazolio son adecuadas y que las condiciones del tratamiento germinativo han sido favorables (3 mg/L AG₃, luz/oscuridad, temperatura ambiental día: 25.5°C - noche: 14.1°C). En el caso de *V. microphylla* la prueba de tetrazolio obtuvo un porcentaje de viabilidad (97%) superior al máximo alcanzado en germinación (66%), por lo tanto, será importante encontrar los factores ideales para su germinación además de los ya expuestos en este estudio. Por otro lado, en *V. laurifolia* la prueba de tetrazolio subestima la viabilidad ya que se obtuvo un porcentaje (72%) menor al máximo alcanzado en germinación (95%), por lo tanto, se considera probar un tiempo mayor de inmersión en tetrazolio.

El estudio realizado establece información relevante en semillas de las especies *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* representativas de los páramos ecuatorianos por su importancia ecológica y medicinal. Este trabajo constituye un referente aplicable en próximos análisis de especies relacionadas. Los

objetivos propuestos en el presente proyecto de investigación fueron cumplidos con éxito y sientan las primeras bases en los proyectos HANS-BANK y BIO-GEEC.

Capítulo VI: Conclusiones

Las semillas de *V. microphylla*, *V. adscendens* y *V. laurifolia* son aquenios coronados por un vilano (6-13 filamentos), de tamaño pequeño (largo 1.1 ± 0.1 a 1.8 ± 0.1 mm, ancho 0.8 ± 0.1 a 0.9 ± 0.1 mm) y peso ligero (23 ± 1 a 27 ± 4 mg para 100 semillas), consideradas ortodoxas y por ende óptimas para su conservación.

El uso de hipoclorito de sodio en la desinfección actuando como un agente de doble desinfección, favorece ampliamente la eliminación de contaminantes. Además, mejora la germinación ya que aumenta la permeabilidad de la semilla mejorando la absorción de agua.

El mejor tratamiento de desinfección para semillas de *V. microphylla* es una concentración de NaClO de 1% en un tiempo de inmersión de 5 minutos. Para *V. adscendens* es una concentración de NaClO de 2% en un tiempo de inmersión de 5 minutos. Y para *V. laurifolia* una concentración de NaClO de 2% en un tiempo de inmersión de 10 minutos.

La presencia de luz es un factor indispensable en la germinación de las tres especies de estudio, por lo que son consideradas con fotosensibilidad positiva.

En *V. laurifolia* se vio que una temperatura alternante de entre $25.5^{\circ}\text{C}/\text{día}$ - $14.1^{\circ}\text{C}/\text{noche}$ es favorable para la germinación.

La aplicación de ácido giberélico tuvo una influencia positiva en la germinación de las tres especies de estudio. Sus concentraciones óptimas son para *V. microphylla* y *V. laurifolia* 2 mg/L de AG_3 y para *V. adscendens* 3mg/L de AG_3 .

Para *V. microphylla* y *V. adscendens* se ajustó un tiempo de tinción de 6 horas en solución de tetrazolio al 1% en incubación a 30°C y en oscuridad, para *V. laurifolia* en las mismas condiciones se considera probar un tiempo mayor de inmersión

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda que para ensayos de morfología la recolección de semillas se realice en tubos falcon para mantener la muestra fresca hasta su uso.

Si las semillas recolectadas van a ser almacenadas por un periodo de tiempo antes de su uso, se debe realizar un proceso de secado previo para evitar su descomposición.

Una de las formas más factibles de secado de semillas es con el uso de sílica gel, así se puede evitar la oxidación de la muestra.

Debido a que las semillas de valeriana son aquenios secos, es preferible primero realizar el secado de las inflorescencias y posteriormente la extracción de las semillas esto agilizará el proceso.

Para procesos de cultivo *in vitro* se recomienda extraer el vilano de la semilla esto ayuda a disminuir la contaminación en el medio.

Realizar el análisis de termoperiodo aplicando periodos de luz para *V. microphylla* y *V. adscendens*.

Este es el primer estudio realizado en estas especies, en donde se hace un análisis de morfología y se establecen protocolos de germinación y viabilidad, por lo que será necesario continuar con la investigación en especies relacionadas.

Referencias

- Abdelnour-Esquivel, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Turrialba: Catie.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal Of the Linnean Society*, 105-121.
- Bacchetta, G., Bueno Sánchez, Á., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B., & Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias / La Caiza.
- Bach, K. K., Ghia, F., & Torssell, K. B. (1993). Valtrates and Lignans in *Valeriana microphylla*. *Planta Med*, 478 - 479.
- Backlund, A., & Moritz, T. (1998). Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 309-335.
- Badii, M., Landeros, J., Valenzulea, J., Rodríguez, R., Ochoa, Y., & Cerna, E. (2013). Patrones Reproductivos. *Daena: Internacional Journal of Good Conscience*, 8(1): 55-63.
- Bell, C., & Donoghue, M. (2004). Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *ELSIVIER*, 147-159.
- Besnier, F. (1976). Semillas de Flores. *Revista de extensión agraria*, 161-164.
- Bueno, M., Alzugaray, C., Giubileo, G., Severin, C., & Carnevale, N. (2009). Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Maytenus vitis-idaea* cultivadas in vitro. *BOSQUE*, 30(3): 146-150.

- Buitrago-Méndez, J., & López-Herrera, L. (2015). Síndromes de dispersión de las especies arbustivo y arbóreas de tres tipos de coberturas del Parque Natural Quininí, municipio de Tibacuy, Cundinamarca, Colombia. *Biodiversidad Neotropical*, 5(1): 7-15.
- Cachiguango, C. (2019). *Composición y cobertura florística en el páramo del Parque Nacional Cotopaxi en dos diferentes estados de conservación: páramo conservado y sobrepastoreado*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Camacho, M. (2013). Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. *ANALES de la Universidad Central del Ecuador* 372, 78 - 92.
- Cárdenas, C. (2013). El fuego y el pastoreo en el páramo húmedo de Chingaza (Colombia): Efectos de la perturbación y respuesta de la vegetación. *Ecotropicos*, 15: 3-18.
- Cárdenas-Burgos, C., Araque-Barrera, J., Bohorquez-Quintero, M., Hernández-Herrera, Y., & Pacheco-Maldonado, J. (2019). Propagación in vitro de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Páramos colombianos. *SciELO*, <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201970057>.
- Carrera Navarrete, E. C. (2014). *Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de Valeriana pyramidalis Kunth y estudio del efecto de la hormona GA₃ en germinación in vitro de sus semillas*. [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/9778>
- Castor, C. (2002). *Patrones, procesos y mecanismos de dispersión secundaria en plantas andinas de Chile central*. Santiago de Chile: Universidad de Chile: Facultad de ciencias.

- Celis, C. T., Rincón, J., & Guerrero, M. F. (2007). Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 36(1), 11-22.
- Chuncho Morocho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *REBID*, 71-83.
- Dini, M., Abbaspour, N., & Samadi, A. (2013). Study of Two Treatments on the Germination of *Valeriana officinalis* L. Seeds in Two Growth Media. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 5(5): 232-236.
- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, I., Medel, M., . . . Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología*, 34: 156-174.
- ENSCONET. (2009). *Protocolos de conservación y Recomendaciones*. Pavia: Departamento de Ecología del Territorio de la Universidad de Pavia.
- Giraldo, S., Rincón, J., Puebla, P., Marder, M., Wasowski, C., Vergel, N., & Guerrero, M. (2010). Isovaleramida, principio anticonvulsivo aislado de *Valeriana pavonii*. *Biomédica*, 30(2), 245-50.
- Hartmann, H., & Kester, D. (1997). *Propagación de plantas*. México D.F.: Compañía editorial Continental S.A.
- Hernández, Y., & González, M. (2010). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*, 31(4).

- Heywood, V. H., & Iriondo, J. M. (2003). Plant conservation: old problems, new perspectives. *ELSEVIER*, 321-335.
- Hofstede, R., Coppus, R., Mena, P., Segarra, P., Wolf, J., & Sevink, J. (2002). El estado de conservación de los páramos de pajonal en el Ecuador . *ECOTROPICOS*, 15(1):3-18.
- Hofstede, R., Segarra, P., & Mena, P. (2003). *Los Páramos del MUNDO*. Quito: Proyecto Atlas Mundial de los Páramos.
- Hsiao, A., & Quick, W. (1984). Actions of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide on seed dormancy and germination of wild oats, *Avena fatua* L. *Weed Research*, 24(6): 411-419.
- ISTA. (2016). *International seed testing association*. Zürich.
- Kadereit, J. W., & Bittrinch, V. (2016). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Hamburg: Springer.
- Kuhn, R. (2011). No Todo Lo Que Brilla Es Oro conflictos socio ambientales alrededor de dos proyectos de minería a gran escala en el Ecuador . *Tesis de Maestría*, Universidad Andina Simón Bolívar.
- Kutschker, A. (2008). Morfología del fruto en especies de Valeriana (Valerianaceae) de los Andes Australes. *DARWINIANA*, 46(1): 17-35.
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género Valeriana (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana Bot*, 244-296.
- León-Yáñez, S., & Montúfar, R. (2017). Valerianaceae. *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*, Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

- MECN - INM. (2015). *Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador*. Quito: Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad. Publicación Patrimonio Natural del Ecuador Nro. 2. Quito-Ecuador.
- Medina Tello, J. C. (2017). *Respuesta de la semilla de Valeriana (Valeriana pilosa Ruiz & Pav.) a tres tratamientos pregerminativos*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Cajamarca]. <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/1676>
- Mena, P., & Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 91 - 109.
- Mena, P., Castillo, A., Flores, S., Hofstede, R., Josse, C., Lasso, S., . . . Ortiz, D. (2011). *Páramo: Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado*. Quito: EcoCiencia/Abya-Yala/ECOBONA.
- Mena, P., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). *Los páramos del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas*. Quito: Abya Yala/Proyecto páramo.
- Morales, E. (1968). Estrategias de ciclo de vida. *CIENCIAS*, 37 - 43.
- Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., De Feo, V., De Martino, L., Bruni, G., . . . Micheli, L. (2006). Binding studies for serotonergic, dopaminergic and noradrenergic receptors of *Valeriana adscendens* Trel. extracts. *ELSIVIER*, 185 - 187.
- Novara, L. (2012). Valerianaceae Batsch. *APORTES BOTÁNICOS DE SALTA*, 1 - 22.
- Ortiz, A. (2015). *DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE DOS ESPECIES DE INTERÉS PARA LA CONSERVACIÓN EN LA CAPV: UNA RUTÁCEA, Haplophyllum linifolium*

(L.) G. Don fil, Y UNA LILIÁCEA, *Lilium pyrenaicum* Gouan. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco, Leioa.

- Osuna, H., Osuna, A., & Fierro, A. (2017). *Manual de propagación de plantas superiores*. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana .
- Pereira, D., Bugatti, P., Lopes, F., Souza, A., & Saito, P. (2019). Contributing to agriculture by using soybean seed data from the tetrazolium test. *ELSEVIER*, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.12.090>.
- Pérez, F. (2003). *Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento*. Córdoba: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Romero, J., & Pérez, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de las especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*, 7-31.
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019a). *Valeriana microphylla*. *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi.*, Version 2019.0
<<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Valeriana%20microphylla>>.
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2019b). *Valeriana adscendens*. *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi.*, Version 2019.0
<<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Valeriana%20adscendens>>.

- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019c). *Valeriana laurifolia*. *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*, Version 2019.0
<<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Valeriana%20laurifolia>>.
- Rosales Cuentas, M. M. (2014). *Propagación in vitro de la planta medicinal alto andina Valeriana sp. "Siete sabios", hasta la fase de brotación*. [Tesis de grado, Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo".
<http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/1016>
- Rueda, D. (2015). *Botánica Sistemática*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Salazar, S., Botello, E., & Quintero, D. (2020). Optimización de la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad en semillas de *Solanum lycopersicum* L. *Ciencia y tecnología agropecuaria*,
https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1344.
- Sánchez, J. M. (2020). *Flora ornamental española*.
- Seminario-Cunya, J., Rumay-Sánchez, L., & Seminario-Cunya, A. (2016). Biología de *Valeriana pilosa* R. & P. (Valerianaceae): una especie en peligro de extinción de las altas montañas de Perú. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(5): 337-351.
- Troiani, H., Prina, A., Muiño, W., Tamame, M., & Beinticinco, L. (2017). *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*. Santa Rosa: EdUNLPam.
- Vargas, O., & Pérez, V. (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.