



“Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador”

Vargas Freire, Nathaly Andrea

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Ph.D. Proaño Tuma, Karina Isabel

31 de agosto del 2022

COPYLEAKS

Vargas_Andrea_Para copyleaks.docx

Scanned on: 21:8 August 17, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

| | |
|--------------------------|-----|
| Identical Words | 291 |
| Words with Minor Changes | 17 |
| Paraphrased Words | 300 |
| Omitted Words | 0 |



Plz reach to info@copyleaks.com
KARINA
ISABEL



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador**” fue realizado por la señorita **Vargas Freire, Nathaly Andrea**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de septiembre de 2022



Firmado electrónicamente por:

**KARINA
ISABEL**

.....
Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.

C. I. 1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Vargas Freire, Nathaly Andrea**, con cédula de ciudadanía n° 1726720426, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

.....
Vargas Freire, Nathaly Andrea
C.I.: 1726720426



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo Vargas Freire, Nathaly Andrea, con cédula de ciudadanía n° 1726720426, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.**

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

Vargas Freire, Nathaly Andrea
C.I.: 1726720426

Dedicatoria

A mi madre, Jimena, por su amor, trabajo y entrega hacia todos sus hijos, por impulsarme a alcanzar mis metas y darme su apoyo incondicional en este largo camino.

A mi padre, Marcos, que siempre me ha brindado su amor, tiempo y todo lo necesario para poder culminar con esta etapa universitaria.

A mi familia por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y ser la bendición más grande en mi vida, quienes me han brindado su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Agradecimiento

Quiero agradecer a mi tutora, Karina Proaño, Ph.D. por brindarme su guía profesional, además de su paciencia en el desarrollo de mi proyecto de titulación.

Agradezco también a Mónica Jadán, Ph.D. por la apertura al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y su guía en la introducción de plantas.

Gracias a Andrea Ortega, Mgtr., por brindarme su apoyo y respuesta en cada duda planteada.

A la Ing. Gabriela Pazmiño por su tiempo, dedicación, guía y conocimientos compartidos durante todo este tiempo.

A los tesisistas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por enseñarme sus conocimientos adquiridos durante la práctica, brindarme su amistad y todos los momentos bonitos vividos.

Quiero agradecer también a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE y al proyecto BIOGEEC por su apoyo financiero.

Índice de Contenidos

| | |
|---|----|
| Informe Copyleaks | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de Autoría | 4 |
| Autorización de publicación..... | 4 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento | 7 |
| Índice de Contenidos | 8 |
| Índice de Tablas..... | 11 |
| Índice de Figuras | 12 |
| Resumen | 13 |
| Abstract..... | 14 |
| Capítulo I: Introducción | 15 |
| Planteamiento del problema..... | 15 |
| Justificación del problema | 16 |
| Hipótesis | 18 |
| Objetivos | 18 |
| Objetivo general | 18 |
| Objetivos específicos | 18 |
| Capítulo II: Marco Teórico | 19 |
| Bosques Andinos y páramos del Ecuador | 19 |

| | |
|---|----|
| Amenazas existentes en los páramos y bosques andinos..... | 20 |
| Importancia de la conservación de los bosques andinos y páramos | 20 |
| Familia Valerianaceae..... | 21 |
| <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 21 |
| Cultivo in vitro de tejidos vegetales | 22 |
| Tipos de micropropagación in vitro..... | 24 |
| Factores que influyen en la propagación in vitro..... | 26 |
| Hormonas utilizadas en cultivo in vitro..... | 27 |
| Capítulo III: Metodología..... | 29 |
| Ubicación del trabajo de investigación | 29 |
| Recolección del material vegetal..... | 30 |
| Introducción de semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 30 |
| Selección de semillas..... | 30 |
| Desinfección de semillas..... | 31 |
| Introducción y germinación de semillas..... | 32 |
| Introducción de yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 32 |
| Selección de yemas apicales/laterales..... | 32 |
| Desinfección de yemas apicales/laterales..... | 33 |
| Introducción de brotes..... | 34 |
| Análisis Estadístico de los Datos..... | 34 |
| Capítulo IV. Resultados | 36 |

| | |
|---|----|
| Introducción de semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 36 |
| Desinfección de semillas | 36 |
| Germinación de semillas | 39 |
| Introducción de yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 42 |
| Desinfección de yemas apicales/laterales | 42 |
| Crecimiento de yemas apicales/laterales con nuevos brotes..... | 44 |
| Capítulo V: Discusión..... | 47 |
| Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 47 |
| Establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 50 |
| Capítulo VI: Conclusiones | 53 |
| Capitulo VII: Recomendaciones | 55 |
| Referencias..... | 56 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Tratamientos de desinfección de semillas para cultivo in vitro de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 31 |
| Tabla 2 Tratamientos de desinfección para yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 34 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Mapas de las ubicaciones de los dos puntos de muestreo | 29 |
| Figura 2 Segmentos de yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 33 |
| Figura 3 Semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth contaminadas con bacterias y hongos | 36 |
| Figura 4 Porcentaje de semillas no contaminadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 37 |
| Figura 5 Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis con los datos de desinfección de semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 38 |
| Figura 6 Semilla germinada de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth..... | 39 |
| Figura 7 Porcentaje de semillas germinadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 40 |
| Figura 8 Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis de los tratamientos de germinación de semillas de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 41 |
| Figura 9 Yemas apicales/laterales de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth contaminadas con bacterias y hongos y con oxidación..... | 42 |
| Figura 10 Porcentaje de yemas apicales/laterales contaminadas (hongos y bacterias) y oxidadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 43 |
| Figura 11 Yema apical/lateral viable con nuevos brotes de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 45 |
| Figura 12 Porcentaje de yemas apicales/laterales viables y con nuevos brotes de <i>Valeriana microphylla</i> Kunth | 45 |

Resumen

Los bosques y páramos andinos del Ecuador son áreas de gran biodiversidad y endemismo. Poseen más de 5000 especies de plantas de las cuales cerca del 60% son endémicas. Además, cumplen un importante rol ambiental en la captación de carbono y la distribución de agua a la población de las zonas andinas. La conservación de estos bosques es importante, ya que se encuentra en constante amenaza debido a actividades antropogénicas. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo establecer protocolos de desinfección e introducción de semillas y yemas apicales/laterales de especies de la familia Valerianaceae en bosques andinos del Ecuador. Para el cual se eligió el tratamiento de desinfección de semillas y yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth que produjo el menor porcentaje de contaminación y mayor viabilidad. El mejor tratamiento para la desinfección de semillas que permitió el 60% de germinación de las semillas fue hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos. Mientras que, el mejor tratamiento para yemas apicales/laterales fue hipoclorito de sodio 3% durante 5 minutos de inmersión. Los datos obtenidos durante esta investigación ayudarán a la desinfección e introducción de esta planta para poder realizar planes de conservación y restauración de la flora de los páramos y bosques andinos del Ecuador.

Palabras clave: desinfección, germinación, semillas, yemas, oxidación

Abstract

The Andean forests and paramos of Ecuador are a hot spot biodiversity and endemism. They have more than 5,000 plant species of which about 60% are endemic. They also play an important environmental role in carbon sequestration and water distribution to the population especially in the highlands. The conservation of these forests is important, since they are under a constant threat due to anthropogenic activities. The present research work aims to establish protocols for the disinfection and introduction of seeds and apical/lateral buds of species of the Valerianaceae family in Andean forests of Ecuador. For which the treatment of disinfection of seeds and apical/lateral buds of *Valeriana microphylla* Kunth was chosen as it produced the lowest percentage of contamination and the highest viability. The best treatment for seed disinfection that allowed 60% seed germination was sodium hypochlorite 1% for 10 minutes. The best treatment for apical/lateral buds was 3% sodium hypochlorite for 5 minutes of immersion. The data obtained during this research will help in the disinfection and introduction of this plant in order to carry out conservation and restoration plans for the flora of the paramos and Andean forests of Ecuador.

Key words: disinfection, germination, seeds, buds, oxidation

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

En el Ecuador, los bosques andinos y páramos son un punto biogeográfico de alta biodiversidad, que se encuentran a una altura entre 3000 a 4500 m.s.n.m. Estas zonas cubren una extensión aproximada de 1 300 000 ha que corresponde a cerca del 7% de todo el territorio (Chuncho & Chuncho, 2019). En esta área se encuentra una gran variedad de seres vivos como: aves, anfibios, mamíferos (van der Hammen & Cleef, 1986) y es uno de los lugares con mayor diversidad de plantas (Sklenář & Balslev, 2005). Sin embargo, solo el 40% de estas áreas son zonas protegidas (Carrillo *et al.*, 2019).

Los páramos albergan aproximadamente 5000 especies de plantas, de las cuales cerca del 60% son endémicas (Sklenář *et al.*, 2014). A nivel mundial, el páramo encabeza la lista de áreas con mayor endemismo, debido a la relación número especie por área (Myers *et al.*, 2000). Los páramos tienen una importancia tanto ecológica como económica proveyendo de agua a caudales ecológicos, siendo fuente de agua para la agricultura, producción de energía hidroeléctrica, producción de alimentos, pero principalmente son fuentes de captación y distribución de agua limpia a la población de las ciudades (Baruffol, 2020).

Sin embargo, hoy en día el páramo se encuentra en amenaza crítica debido al cambio climático. Varios estudios prevén que la temperatura mundial para mediados del siglo XXI aumente entre 0,9 y 2,0 ° C, lo que afectaría también a los páramos y haría que muchas especies de plantas y animales no logren adaptarse y mueran (Moss & Evans, 2022). A pesar de su gran importancia la actividad humana ha ido modificando los parajes andinos durante mucho tiempo, debido a actividades como la agricultura y cría de ganado. La pérdida de hábitat y de diversidad, acompañado del aumento de la erosión y la poca información conocida de estos parajes, la convierten en un área altamente vulnerable (Buytaert *et al.*, 2006a).

Por ello el presente estudio busca establecer bases de datos de especies andinas para preservar su diversidad genética mediante la creación de un banco de semillas y su posterior introducción a zonas de los páramos.

Justificación del problema

Los páramos son ecosistemas que cumplen un importante rol ambiental, ya que logran la captación y distribución de agua hacia tierras bajas (Hofstede *et al.*, 2002). El páramo cumple una función importante como sumidero de carbono al contener una gran cantidad de materia orgánica, incluso más que los bosques tropicales (Medina *et al.*, 1999), lo que ayuda a disminuir los efectos provocados por el calentamiento global (Podwojewski & Poulenard, 2000).

El ecosistema del páramo se ve afectado por la progresiva colonización y actividad del hombre. Las principales actividades que afectan a este ecosistema y al cambio climático global son la quema de pajonales, la ganadería intensiva, la agricultura y el uso de pesticidas y fertilizantes (Camacho, 2013a).

La ganadería es una de las actividades que más daño causa a esta zona, ya que el suelo se compacta y pierde la capacidad de retención del agua, afectando a las fuentes hidrológicas y por lo tanto a la distribución del agua a la población (Romo & Calero, 2022). Por otro lado, la actividad agrícola que se da en los páramos afecta a la vegetación nativa debido a que cambian las propiedades fisicoquímicas del suelo por el uso de fertilizantes y pesticidas, sumado a la preparación de los barbechos (Hofstede *et al.*, 2014).

En la actualidad existen varias iniciativas o programas para minimizar el daño producido por el hombre en los páramos. Los principales objetivos de los programas son conservar los servicios hidrológicos, mantener la capacidad de captura de carbono y los altos niveles de biodiversidad y endemismo (Camacho, 2013). Para ello se han creado áreas protegidas en las que se limita o restringe en su totalidad la presencia de personas, tratando de proteger a las

especies en su hábitat (*in situ*). Sin embargo, también existen otras técnicas para preservar el material genético vegetal a largo plazo como son los bancos de germoplasma y el cultivo *in vitro*, especialmente de especies en peligro de extinción o de especies que son importantes en las dinámicas de los ecosistemas (Soto, 2017).

Es por ello, que el cultivo de tejidos *in vitro* surge como una herramienta de gran importancia para la conservación de germoplasma de especies amenazadas y endémicas. La producción de semillas artificiales, el mejoramiento de plantas, la propagación a gran escala y su introducción en sitios nativos, permite preservar de mejor manera el material genético (Shahzad *et al.*, 2017).

Una de las familias con mayor número de especies dentro de los bosques y páramos del Ecuador es la familia Valerianaceae, especialmente el género *Valeriana* que tiene varias especies endémicas (Sklenář & Balslev, 2005) (Kutschker, 2011). Esta familia de plantas es de gran interés desde la antigüedad y ha sido utilizada ampliamente en la medicina tradicional en enfermedades como la ansiedad, estrés y depresión, ya que posee propiedades aromáticas, sedantes y relajantes (Das *et al.*, 2021).

El presente estudio busca establecer bases de datos de especies andinas para preservar su diversidad genética a través del banco de semillas (HANS-BANK) con el apoyo del consorcio alemán-ecuatoriano sobre biodiversidad (BIO-GEEC) mediante el proyecto de titulación denominado: "Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador", el cual pretende estandarizar un protocolo de desinfección e introducción a partir de semillas y yemas apicales/laterales, para así conservar su material genético previo a una posterior recuperación en sitios vulnerables.

Hipótesis

El protocolo de desinfección e introducción permite el establecimiento de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Objetivos***Objetivo general***

Establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Objetivos específicos

Determinar el método de desinfección de semillas de especies de la familia Valerianaceae.

Estandarizar el método de desinfección en yemas apicales/laterales de especies de la familia Valerianaceae.

Determinar los mejores medios nutritivos y hormonales para el establecimiento e inducción de brotes de especies de la familia Valerianaceae.

Capítulo II: Marco Teórico

Bosques Andinos y páramos del Ecuador

Los bosques andinos y páramos conforman una de las zonas más biodiversas del Ecuador. Los bosques andinos se encuentran en las estribaciones andinas justo bajo los páramos y la zona de transición entre estas dos áreas, zona conocida como “ceja andina” que se caracteriza por ser en su mayoría matorral (Duque, 2008). Los bosques y páramos del Ecuador constituyen un área aproximada de 1 '250 000 ha, lo que representa cerca del 7% de todo el territorio ecuatoriano. Se encuentran ubicados a una altura entre 2400 y 4000 m.s.n.m. (Chuncho & Chuncho, 2019).

Los bosques andinos se encuentran a una altitud de entre 1800 y 3500 m.s.n.m. aproximadamente (Baquero *et al.*, 2004). Estos bosques se caracterizan por su gran humedad y abundancia de especies de árboles que pueden llegar a medir hasta 25 metros de alto como el aliso. Debido a la gran altura de los árboles y a la vegetación tupida, algunos musgos, orquídeas y otras plantas crecen en los troncos de los árboles para encontrar nutrientes y fuente de luz (Mena, 2010).

El páramo se encuentra a una altitud de 3500 m.s.n.m. como límite inferior, sin embargo, ciertas condiciones climáticas y actividades humanas (antrópicas) hacen que se encuentren páramos desde los 2800 m.s.n.m (Hofstede *et al.*, 2002). A pesar de que una de las reglas de la ecología es que a mayor altitud disminuye la diversidad de plantas y animales, para el páramo no se cumple esto, ya que esta es la zona de montaña más biodiversa del planeta (Mena, 2010).

El páramo tiene características físicas específicas, con temperaturas frías, alta humedad, alta radiación UV y vientos fuertes (Peyre, 2015). Posee condiciones de precipitación relativamente altas con lluvias de 500-3000 mm por año y temperatura media anual de 2 a 10 °C (Hofstede *et al.*, 2002). Sin embargo, presenta variaciones de temperatura que puede

alcanzar hasta los 30°C, cuyas condiciones han generado una gran biodiversidad, especialmente de plantas. 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).

Amenazas existentes en los páramos y bosques andinos

Los bosques andinos y páramos a lo largo de los años se han enfrentado a grandes amenazas, entre ellas encontramos: el cambio climático, la agricultura extensiva, la cría de ganado e incluso la minería (Chuncho & Chuncho, 2019). Estos problemas han provocado la erosión del suelo, pérdida de biodiversidad endémica vegetal y animal, alteración del ciclo hidrológico y pérdida del almacenamiento y retención del carbono (Buytaert *et al.*, 2006b).

En la actualidad una grave amenaza que enfrentan los páramos es la minería. La minería es una práctica que se ha venido desarrollando desde la antigüedad, sin embargo, en años recientes el Ecuador se ha posicionado como un país minero (Estupiñan, 2021). Para lograr esto, en Ecuador se han concesionado áreas de páramo destinadas a esta actividad. Como ejemplo tenemos el proyecto minero Quimsacocha con un área de 12500 hectáreas y que se encuentra ubicado cerca del Parque Nacional Cajas a 3700 metros de altura (ELCOMERCIO, 2011). Con este y otros proyectos ya aprobados y los que se encuentran en espera, se prevé que se afecte a más del 28% del páramo andino, dando como resultado grandes pérdidas vegetales y animales, además de la contaminación del agua y aire (Chuncho & Chuncho, 2019).

Importancia de la conservación de los bosques andinos y páramos

Existen varias razones por lo que es importante la conservación de los bosques andinos y páramos. En primer lugar, estos ecosistemas actúan como grandes bancos genéticos de plantas andinas, ya que son zonas de alta biodiversidad y endemismo de plantas (Peyre,

2015). Además, tiene un importante valor científico y ecológico gracias a la presencia de seres vivos únicos, que se han adecuado a las condiciones físico-químicas y climáticas del páramo a través de adaptaciones morfológicas (Luteyn, 1999). Este factor evolutivo ha resultado en que una gran cantidad de sus especies no se puedan encontrar en ningún otro ecosistema en el mundo (Chuncho & Chuncho, 2019).

Los bosques y páramos andinos proveen de diversos servicios ambientales, entre ellos podemos encontrar al control del calentamiento global con la regulación del clima, debido a la gran capacidad del suelo como sumidero de carbono (Chuncho & Chuncho, 2019). Además, esta cualidad permite la retención de fuentes acuíferas lo que ayuda a la retención y suministro de agua a la población (Cárdenas *et al.*, 2013).

Familia Valerianaceae

La familia Valerianaceae pertenece al orden Dipsacales, se encuentra conformada por 13 géneros y 300 especies alrededor de todo el mundo. En Ecuador existen 35 especies pertenecientes al género *Valeriana*, de las cuáles 7 especies son consideradas endémicas (Kutschker, 2011). Las plantas pertenecientes a esta familia son generalmente herbáceas de tamaño pequeño o arbustos, que se encuentran ampliamente distribuidas desde el norte al sur de la sierra ecuatoriana. Estas plantas es común encontrarlas en zonas boscosas y subpáramos de los Andes (Romoleroux *et al.*, 2019). En el Ecuador existen 7 especies endémicas, una de ellas se encuentra en peligro, dos son vulnerables, dos casi amenazadas y las otras dos se encuentran no amenazadas (León & Montufar, 2017).

Valeriana ha sido un género que ha sido usado por sus raíces y rizomas desde la antigüedad por parte de las tribus nativas indígenas en la medicina tradicional como un sedante, especialmente como antiespasmódico, reductor de estrés y droga calmante (Jiménez, 2022).

***Valeriana microphylla* Kunth**

Valeriana microphylla Kunth es una especie proveniente de la familia Valerianaceae y del género *Valeriana*, su nombre científico es *Valeriana microphylla* Kunth y su nombre común es Valeriana. Se encuentra ampliamente distribuida a una altitud de entre 2500- 5000 m.s.n.m desde Colombia a Perú (Lehmann, 2017). En el Ecuador se la puede encontrar en varias provincias como Pichincha, Cotopaxi, Azuay, Cañar, Bolívar, Carchi, Chimborazo, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Sucumbios, Tungurahua y Zamora Chinchipe (Romoleroux *et al.*, 2019).

Esta especie es un arbusto pequeño y erecto, que crece en pantanos y pajonales, mide aproximadamente un metro. Se caracteriza por tener hojas opuestas y ovaladas de hasta 1 cm de largo. Posee inflorescencias en las puntas de las ramas en forma de panículas terminales, las flores son de forma tubular, con cinco lóbulos y con corola de blanca a rosada, con un ligero color morado. Su fruto es en forma de aquenio elíptico coronado con un vilano color blanco de máximo 2 mm de largo. En *Valeriana microphylla* Kunth se han aislado varios compuestos activos, de los cuáles se han identificado 5 valepotriatos: valtrato, isoaltrato, dialtrato, acealtrato y didroaltrato. Estos compuestos son considerados responsables del efecto sedante en las drogas derivadas de plantas de Valeriana (Bach *et al.*, 1993).

Cultivo in vitro de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos *in vitro* o micropropagación se define como la introducción de semillas, plantas, células vegetales o tejidos en un medio nutritivo estéril, con el fin de obtener una planta con la misma dotación genética que la planta madre (Pierik, 1990). A partir de una pequeña parte de la planta llamada explante se puede obtener una planta entera. Esta capacidad es debido a una propiedad de las plantas llamada totipotencia celular que hace que toda célula viva con núcleo pueda regenerarse (Boutherin & Bron, 1994).

El método de propagación por semillas *in vitro* es el más usado en plantas angiospermas y gimnospermas, debido a que durante su germinación pueden presentarse varios problemas de contaminación por bacterias y hongos. La etapa de germinación es un paso crítico en el desarrollo de la planta, debido a que la semilla se encuentra expuesta a variaciones de temperatura y humedad (Iriundo, 1999).

Para realizar el cultivo o propagación *in vitro* de una planta se debe seguir un proceso de cinco fases.

- a) Fase 0: Preparación de la planta madre y selección del material vegetal. Para esta fase se debe seleccionar el explante óptimo para el cultivo *in vitro*. Para lo cual se debe tener en cuenta la forma de reproducción de la planta, es decir si esta se reproduce por semillas se puede utilizar principalmente las partes embrionarias, pero si su reproducción es vegetativa el mejor explante a utilizar puede ser sus meristemos y ápices (Hartmann & Kester, 1981); (Withers & Engelmann, 1998)
- b) Fase 1: Siembra y establecimiento del tejido vegetal en condiciones asépticas. Durante esta etapa se establece un protocolo de desinfección que permite eliminar agentes contaminantes que competirán con la planta de no ser eliminados, pero estos también deben mantener vivo al explante. Entre algunos de los desinfectantes que se usan para este propósito podemos encontrar: hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, dicloruro de mercurio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata y etanol al 70% (Hartmann & Kester, 1981). La adición de surfactantes como Tween 20 en el proceso de desinfección, permite romper la tensión superficial para un mayor contacto entre los químicos y el explante y así lograr una mayor desinfección. Adicionalmente, los explantes también pueden tener contaminantes internos como hongos sistémicos y bacterias, para lo cual se utilizan fungicidas y bactericidas como antibióticos para prevenir la aparición de contaminantes. La elección del desinfectante al igual que su

concentración se determina según las características físicas del explante, pero experimentalmente se pueden determinar con ensayos prueba y error. Luego de la desinfección del explante, este es introducido en condiciones de total asepsia en el medio de cultivo escogido para el crecimiento (Withers & Engelmann, 1998).

- c) Fase 2: Multiplicación del tejido. Los explantes se introducen en medios de cultivo en donde se establece una relación entre concentraciones de fitorreguladores y nutrientes para así obtener el mayor coeficiente de multiplicación de brotes. Los brotes adventicios desarrollados posteriormente se transfieren a nuevos medios de cultivo con el fin de aumentar la cantidad de plantas (Hartmann & Kester, 1981) .
- d) Fase 3: Enraizamiento. Existen algunas plantas que pueden desarrollar raíces durante la etapa de multiplicación, sin embargo, hay plantas que no lo hacen. Por lo que se transfieren a un nuevo medio de cultivo, el cual contiene menor concentración de citoquininas, mayor concentración de auxinas y baja cantidad de sales para el desarrollo de raíces (Hartmann & Kester, 1981).
- e) Fase 4: Aclimatación. Las plantas *in vitro* que previamente atravesaron las demás etapas se transfieren a un lugar con condiciones ambientales naturales, es decir a condiciones *ex vitro*. Normalmente las plantas se transfieren a un sustrato en el que se modifican las concentraciones de sales y azúcar, además de que se incrementa la intensidad de la luz (Withers & Engelmann, 1998).

Tipos de micropropagación in vitro

La micropropagación es la técnica más usada en especies vegetales con población reducida o en las cuáles se presentan problemas con las técnicas de propagación convencional. Esta técnica es usada para la obtención de un gran número de plantas a partir de un pequeño explante, lo que permite la conservación de los recursos filogenéticos. La

regeneración de la planta se puede dar por organogénesis directa e indirecta y la embriogénesis directa e indirecta (Litz, 1984);(Albarrán *et al.*, 2011).

Organogénesis directa. La organogénesis es un proceso de morfogénesis en el que se producen órganos como raíces o brotes principalmente a partir de explantes como meristemos laterales. En esta ruta se producen brotes vegetativos mediante la utilización de medios de cultivos específicos sin el desarrollo de raíces. Adicionalmente, se requiere de la combinación de hormonas para producir su enraizamiento (Litz, 1984).

Organogénesis indirecta. La organogénesis indirecta es el proceso opuesto a la organogénesis directa, en donde se genera una masa de células indiferenciadas llamada callo. A partir del callo se originan los órganos, tales como brotes y raíces. Este cultivo se lo realiza principalmente utilizando como explante protoplastos (Albarrán *et al.*, 2011).

Embriogénesis directa. La embriogénesis directa como lo indica su nombre, es la formación de un embrión de origen sexual directamente del explante utilizado, lo cual da como resultado una planta completa. Los explantes que siguen esta ruta de regeneración son los granos de polen que llegan a formar embriones haploides o diploides (Litz, 1984).

Embriogénesis indirecta. En la embriogénesis indirecta se da la formación de un callo no organizado que posee la capacidad de dividirse, una vez este se organiza se forman pro-embriones. Los pro-embriones pasarán a ser embriones somáticos y finalmente al ser sometidos a determinadas concentraciones de auxinas formarán una planta completa. Los ejemplos de explantes en los que se da esto son los protoplastos, hojas, tallos y raíces (Albarrán *et al.*, 2011).

Factores que influyen en la propagación in vitro

Existen varios factores que influyen en la propagación in vitro del material vegetal como el explante, la planta madre, el medio de cultivo y condiciones físicas. El explante es uno de los factores más importante ya que es la parte de la planta que se aísla de un órgano o tejido de la planta para después ser introducida en un medio de cultivo (Roca & Mroginski, 1993).

El primer paso en el cultivo *in vitro* es la elección y toma de muestra del explante, para lo cual se debe tener en cuenta su disponibilidad y su procedencia. Los tipos de explantes que pueden utilizarse son meristemos, células, ápices de tallos, anteras, polen, embriones, semillas y óvulos. La elección de este se hace dependiendo del tipo de propagación de la planta. También se debe tener en cuenta la edad fisiológica del explante, ya que mientras más joven e indiferenciado sea, mejor será el crecimiento *in vitro* (Domínguez *et al.*, 2008).

La planta madre de la cual proviene el explante debe tener ciertas características antes de la toma de la muestra. La planta donadora deberá estar sana y libre de cualquier enfermedad que presente síntomas físicos. La edad de la planta madre influirá en la cantidad de nutrientes y hormonas presentes en el explante, por lo que también es un factor importante en su selección. Por último, la planta debe tener características deseables ya que mediante el cultivo *in vitro* se obtienen plantas genéticamente iguales a la madre (Hartmann & Kester, 1981).

La composición del medio de cultivo es otro factor importante. El medio de cultivo es una mezcla sólida, semisólida o líquida de distintas sustancias que dotan de lo necesario para que el explante crezca. Se debe tener en cuenta que cada especie y tipo de explante tendrá distintos requerimientos nutricionales, por lo que los medios de cultivo no tienen una composición definida. Los medios de cultivo se encuentran generalmente constituidos por: sales inorgánicas, macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento o fitohormonas, carbohidratos, agentes gelificantes y agua (Roca & Mroginski, 1993).

Finalmente, los factores físicos que más influyen en el cultivo *in vitro* son la temperatura y la luz. La gran mayoría de familias de plantas en incubación crecen en temperaturas entre 20°C a 24°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, además que la luz cumple un rol importante en la diferenciación de la planta (George *et al.*, 2007).

Hormonas utilizadas en cultivo in vitro

Las fitohormonas son sustancias orgánicas que se producen en pequeñas cantidades dentro de las plantas y que cumplen un importante rol en el crecimiento, desarrollo y actividad metabólica. Además, las hormonas determinan el crecimiento relativo, es decir pueden activar o inhibir el crecimiento de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990).

Se han identificado distintas hormonas y no todas actúan sobre los mismos procesos fisiológicos de las plantas, por ejemplo, entre algunos de los efectos producidos por las fitohormonas podemos encontrar el incremento de la floración, elongación de raíces y maduración del fruto. Los grupos de hormonas más importantes y utilizados en cultivo *in vitro* según Rojas *et al.* (2004), son las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

Auxinas. Las auxinas son hormonas que activan el crecimiento, ya que tiene la capacidad de agrandamiento y alargamiento celular, además promueven la división celular (Rojas *et al.*, 2004). Las auxinas dan origen a la dominancia apical, inhibiendo el crecimiento de yemas axilares, además promueven el desarrollo de raíces adventicias y laterales. Dentro de las sustancias que pertenecen a este grupo encontramos a las siguientes: ácido clorofenoxiacético, ácido clorofenoxipropiónico, ácido naftaleneacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido diclorofenoxiacético (2,4 D), siendo ANA, AIB, AIA y 2,4D las auxinas más utilizadas en cultivo de tejidos.

Citoquininas. Las citoquininas son un grupo de fitohormonas derivadas de la adenina, que promueven la división celular y la diferenciación, por lo que forman y desarrollan el

tallo a partir de diferentes explantes como callo, hoja y cotiledones. La hormona natural más conocida de ese grupo es la zeatina, sin embargo, son más utilizadas la kinetina (KIN) y 6-benzilaminopurina (BAP) que son hormonas sintéticas. Estas además regulan la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos (Rojas *et al.*, 2004).

Giberelinas. El ácido giberélico (AG3) es la sustancia más representativa de este grupo de fitohormonas, la formación de esta hormona se da en los primordios apicales de las hojas, en raíces y en semillas en desarrollo. La principal función que cumplen las giberelinas es el alargamiento de los tallos y el incremento de la tasa de división celular (Domínguez *et al.*, 2008).

Capítulo III: Metodología

Ubicación del trabajo de investigación

La fase de campo se realizó en el parque Nacional Cayambe – Coca, ubicado entre las provincias de Pichincha, Imbabura, Napo y Sucumbíos. Se trabajó en dos parcelas claramente delimitadas de 20x20 m, a las cuales se les denomina plots. El Plot 3 (P3) ubicado en la ladera en 17M 820415 9967215 y el Plot 1 (P1) en el bosque de Polylepis ubicado en 17M 820440 9967202.

Figura 1

Mapas de las ubicaciones de los dos puntos de muestreo



Nota: Plot 1 bosque de Polylepis (P1) (17M 820440 9967202) y plot 3 ladera (P3) (17M 820415 9967215)

La fase de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Matriz Sangolquí, ubicado en la provincia de Pichincha, en el cantón Rumiñahui en la avenida General Rumiñahui S/N.

Recolección del material vegetal

El material vegetal de la especie *Valeriana microphylla* Kunth utilizado durante el proyecto de investigación fue recolectado durante los meses de marzo a junio del 2022. Se recolectó principalmente segmentos de yemas apicales y laterales jóvenes de entre 10 a 15 cm de largo, los cuales se cortaron con la ayuda de una tijera de jardinería y se guardaron en fundas plásticas tipo ziploc. Las muestras se almacenaron en una hielera, durante 24 horas hasta su procesamiento. Además, se recolectó inflorescencias maduras de la misma especie, con presencia de vilanos extendidos, los cuales se cortaron y almacenaron en fundas de papel para su posterior propagación. Todas las muestras recolectadas poseen un código de accesión, una ficha descriptiva propia de la especie y fotografías.

Introducción de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth

Selección de semillas

Las semillas recolectadas previamente fueron colocadas en nuevas fundas de papel para continuar con el secado a temperatura ambiente, al final se colocaron dentro de fundas ziploc doble cierre hasta su procesamiento. Previo a la aplicación de los tratamientos de desinfección, las semillas fueron extraídas de las inflorescencias. Se seleccionaron únicamente aquellas semillas que tenían el vilano extendido y que estaban abultadas. Se extrajo los vilanos de las semillas escogidas y se procedió a colocar aproximadamente 100 semillas por tubo Eppendorf de 1,5 ml.

Desinfección de semillas

Las semillas seleccionadas y almacenadas en los tubos Eppendorf de 1,5 ml fueron utilizadas para los ensayos de desinfección. En primer lugar, se procedió a realizar un lavado con detergente 1% (p/v) y Tween 20 durante 10 minutos con agitación constante por cada tubo.

A continuación, se efectuó varios lavados con agua destilada con la ayuda de una jeringuilla de 5 ml hasta eliminar cualquier resto de detergente. Posteriormente, se realizó un lavado con etanol 70% (v/v) durante 1 minuto y tras esto se enjuagó tres veces con agua destilada. Finalmente, se expuso las semillas a hipoclorito de sodio (NaClO) a distintas concentraciones (1%, 1,5% y 2%) y tiempos (5 y 10 minutos) dentro de la cámara de flujo laminar. La etapa de desinfección se estableció acorde a lo reportado por Jiménez, (2022) en su estudio germinativo de varias especies de la familia Valerianaceae en donde utiliza etanol e hipoclorito de sodio como desinfectantes. En la Tabla 1 se muestra la concentración y tiempo de inmersión utilizada para cada ensayo de desinfección de las semillas.

Tabla 1

Tratamientos de desinfección de semillas para cultivo in vitro de Valeriana microphylla Kunth

| Tratamientos | Concentración de NaClO | Tiempo de inmersión en NaClO (minutos) |
|---------------------|-------------------------------|---|
| MS0 | 0% | 0 |
| MS1 | 1% | 5 |
| MS2 | 1% | 10 |
| MS3 | 1,5% | 5 |
| MS4 | 1,5% | 10 |
| MS5 | 2% | 5 |
| MS6 | 2% | 10 |

Introducción y germinación de semillas

En esta etapa, bajo condiciones asépticas y dentro de la cámara de flujo laminar, se introdujo tres semillas por tubo de ensayo con medio de cultivo y se selló con plástico parafilm. El medio de cultivo está compuesto por sales MS completas, 3 mg/l de ácido giberélico (AG3) y phytagel 0,3% (p/v) como gelificante. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento empleando un Diseño Experimental Completo al Azar (DE), en donde se realizó el conteo de semillas germinadas, contaminadas y no contaminadas cada 7 días durante 30 días después de la introducción. En este ensayo se consideró semilla germinada aquellas semillas con radícula expuesta y a la semilla contaminada aquella que presentaba contaminación con bacterias y hongos. Las semillas introducidas se incubaron a 20°C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad.

Introducción de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth

Selección de yemas apicales/laterales

Los segmentos de yemas apicales y laterales de la planta madre de *Valeriana microphylla* Kunth (Fig. 2) previamente recolectados, se extrajeron de las fundas ziploc y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, las yemas se dividieron en segmentos de 2 a 3 cm con ayuda de un bisturí. Los segmentos consistieron en partes jóvenes con presencia de brotes. Se retiró la mayor cantidad de hojas de los segmentos para colocarlos en frascos de vidrio vacíos.

Figura 2

Segmentos de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth

***Desinfección de yemas apicales/laterales***

Las yemas cortadas previamente fueron sometidas a un lavado con detergente al 10% (p/v) y Tween 20 durante 20 min con agitación continua. Transcurrido este tiempo se realizó los lavados necesarios con agua corriente hasta que no hubiera restos de detergente. Posteriormente, se colocó alcohol 70% (v/v) hasta cubrir los explantes y se agitó durante 1 minuto, para luego enjuagar con agua corriente tres veces. Finalmente, se colocó las yemas apicales/laterales en hipoclorito de sodio (NaClO) a distintas concentraciones (1%, 2% y 3%), durante 5 minutos dentro de cámara de flujo laminar. En la Tabla 2 se especifica la concentración y el tiempo de inmersión para el ensayo de desinfección de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth.

Tabla 2

Tratamientos de desinfección para yemas apicales/laterales de Valeriana microphylla Kunth

| <i>Tratamiento</i> | <i>Concentración de NaClO</i> | <i>Tiempo de inmersión en NaClO (minutos)</i> |
|--------------------|-------------------------------|---|
| <i>M0</i> | 0% | 0 |
| <i>M1</i> | 1% | 5 |
| <i>M2</i> | 2% | 5 |
| <i>M3</i> | 3% | 5 |

Introducción de brotes

En esta fase, bajo condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar, se cortó las partes oxidadas de los explantes para su posterior introducción. A continuación, se introdujo con la ayuda de pinzas estériles una yema apical/lateral por cada frasco que contenía medio de cultivo y se selló con plástico parafilm. El medio nutritivo está compuesto por sales MS completas, sacarosa 3% (p/v) y phytigel 0,3% (p/v) como gelificante. Se realizó 8 repeticiones con tres réplicas por tratamiento, empleando un Diseño experimental completo al azar (DECA). Posteriormente, las yemas se incubaron a 20°C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Este ensayo evaluó el desarrollo de las yemas apicales/laterales cada 7 días durante 30 días. Finalmente se evaluó el número de explantes con nuevos brotes, los explantes oxidados y los contaminados con bacterias y hongos.

Análisis Estadístico de los Datos

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos obtenidos seguían una distribución normal. En el caso de que los datos presentaban una distribución normal se aplicó un análisis de varianza ANOVA, en cambio para los datos que

no presentaban esta distribución se aplicaba una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El procesamiento de todos los datos obtenidos se realizó con el paquete estadístico InfoStat.

Capítulo IV. Resultados

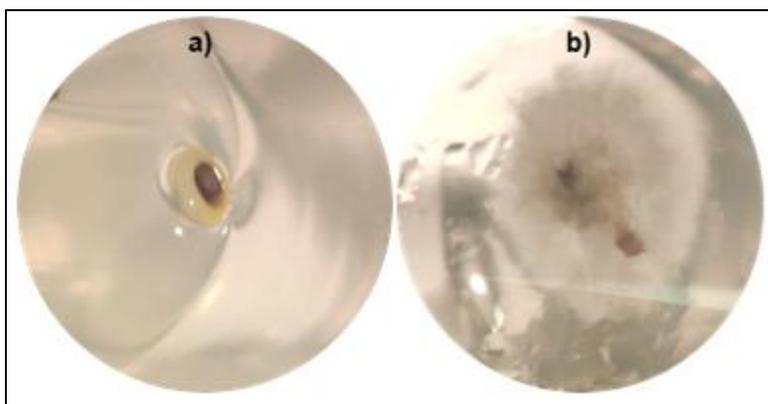
Introducción de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth

Desinfección de semillas

La desinfección de semillas es un paso importante para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Valeriana microphylla* Kunth. En este ensayo se probó tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 1,5% y 2%), dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos) y un control sin hipoclorito de sodio. En estos tratamientos se evaluó la variable de contaminación causada por hongos y bacterias (Fig.3).

Figura 3

Semillas de Valeriana microphylla Kunth contaminadas con bacterias y hongos.



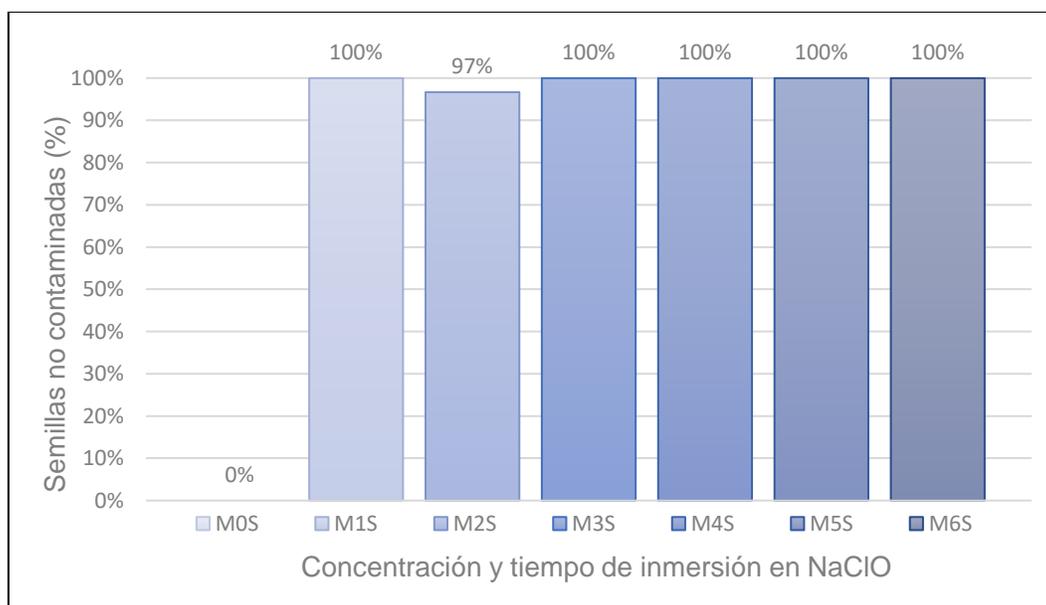
Nota: Semillas de *Valeriana microphylla* Kunth a) semilla contaminada con bacteria, b) semilla contaminada con hongo.

Luego de evaluar la contaminación, se calculó el porcentaje de semillas no contaminadas para determinar las semillas que posiblemente sean viables en la etapa de germinación. La figura 4 muestra los resultados del porcentaje de semillas no contaminadas,

con respecto a la concentración y tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO), observados durante 30 días de incubación a 20°C.

Figura 4

Porcentaje de semillas no contaminadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en *Valeriana microphylla* Kunth



Nota: Porcentaje de semillas no contaminadas en base a diferentes tratamientos de desinfección. M0S: Control sin NaClO, M1S: 1% de NaClO durante 5 min, M2S: 1% de NaClO durante 10 min, M3S: 1,5% de NaClO durante 5 min, M4S: 1,5% de NaClO durante 10 min, M5S: 2% durante 5 min, M6S: 2% de NaClO durante 10 min.

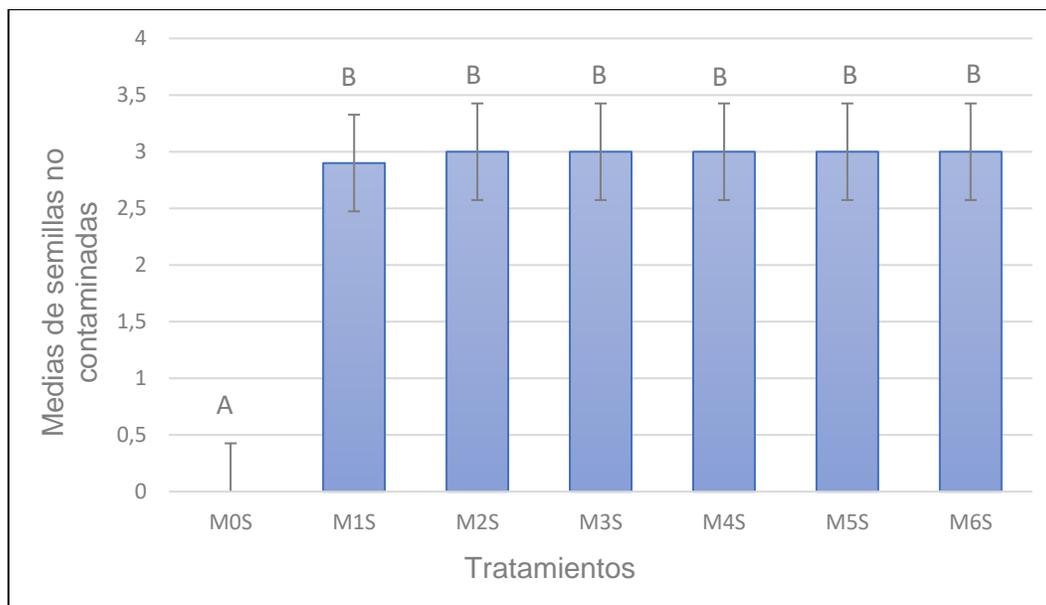
En esta figura, los tratamientos de desinfección M1S, M2S, M3S, M4S, M5S y M6S con inmersión en NaClO al 1% (v/v), 1,5% (v/v) y 2% (v/v) durante 5 y 10 minutos mostraron un alto porcentaje de semillas no contaminadas (97%). En cambio, el tratamiento control (M0S) sin exposición a NaClO mostró 0% de semillas no contaminadas, donde la mayoría de las semillas mostraron contaminación por hongos y bacterias. Estos resultados sugieren que todos los tratamientos utilizados fueron eficientes en la desinfección de semillas. Los datos de las

semillas no contaminadas con respecto a los tratamientos de desinfección se encuentran en el Anexo 1.

En base a estos resultados se realizó el análisis estadístico mediante la prueba Shapiro-Wilks, donde se obtuvo un p-valor ($<0,0001$). Este valor es menor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$), es decir que los datos de semillas no contaminados son datos no paramétricos (Anexo 2). A partir de esta prueba, se realizó un análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis (Fig. 5) para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. El p-valor ($<0,0001$) obtenido en la prueba es menor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$).

Figura 5

Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis con los datos de desinfección de semillas de Valeriana microphylla Kunth



Nota: Medias de las semillas no contaminadas en base a los tratamientos de desinfección.

Grupo de clasificación A (M0S) y grupo de clasificación B (M1S, M2S, M3S, M4S, M5S y M6S).

Los tratamientos clasificados con la letra B no poseen diferencias significativas entre sí, por lo cual la desinfección de semillas con hipoclorito de sodio al 1% (v/v), 1,5% (v/v) y 2% (v/v) a 5 y 10 minutos son tratamientos efectivos en la desinfección de más del 97% de contaminantes bacterianos y fúngicos.

Germinación de semillas

La etapa de germinación *in vitro* de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth fue realizada en medio MS con 3 mg/l de ácido giberélico. En este ensayo se evaluó la germinación de la semilla con respecto a la concentración y tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 1% (v/v), 1,5% (v/v) y 2% (v/v) a 5 y 10 minutos. Se consideró como semilla germinada a aquella semilla que presentaba una radícula expuesta (Fig. 6).

Figura 6

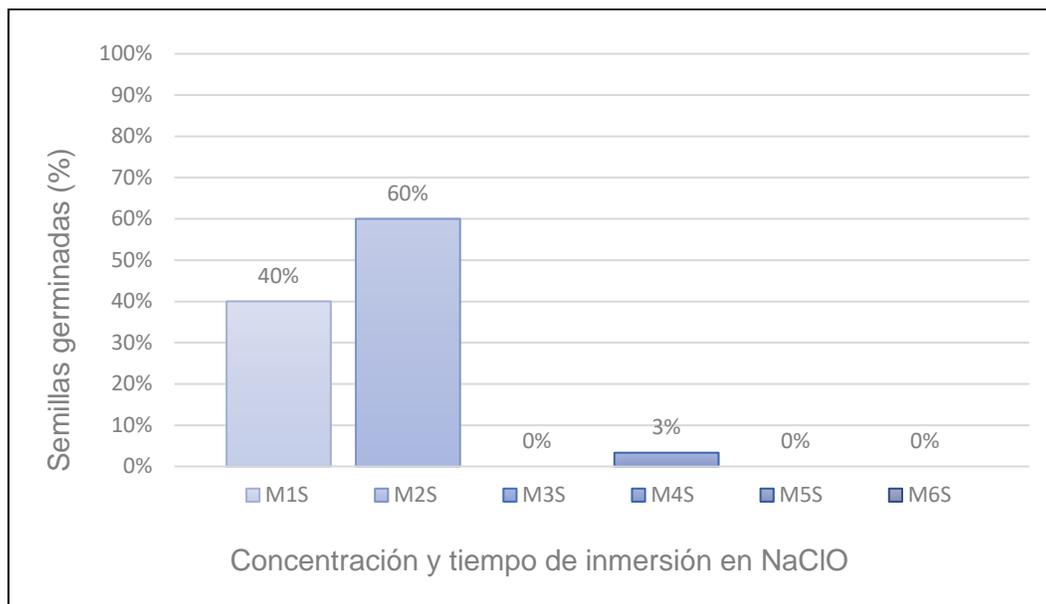
Semilla germinada de Valeriana microphylla Kunth



Luego de evaluar la germinación de semillas, se calculó el porcentaje de germinación. La figura 7 muestra los resultados del porcentaje de semillas germinadas, en relación a las diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO), durante 30 días de incubación.

Figura 7

Porcentaje de semillas germinadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en *Valeriana microphylla* Kunth



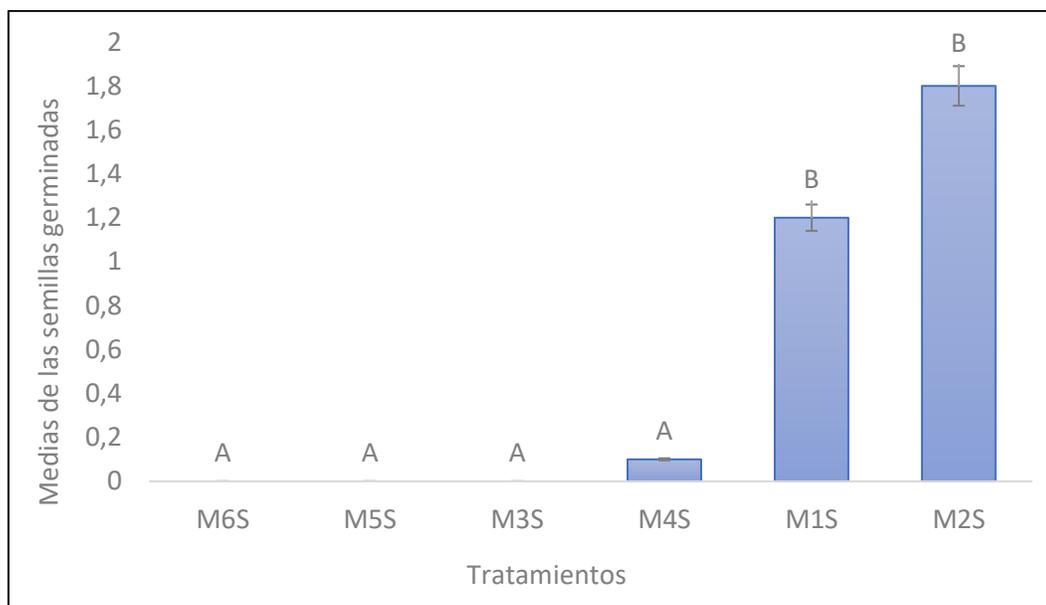
Nota: Porcentaje de semillas germinadas en base a los diferentes tratamientos de desinfección previamente aplicados. M1S 1% de NaClO durante 5 min, M2S: 1% de NaClO durante 10 min, M3S: 1,5% de NaClO durante 5 min, M4S: 1,5% de NaClO durante 10 min, M5S: 2% durante 5 min, M6S: 2% de NaClO durante 10 min.

En esta figura, el tratamiento M2S con inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% (v/v) durante 10 minutos mostró el más alto porcentaje de germinación con un 60%. En cambio, el tratamiento M1S con inmersión en NaClO al 1% (v/v) durante 5 minutos mostró un porcentaje de germinación de semillas del 40%. Estos resultados sugieren que el tratamiento M2S es el mejor tratamiento de desinfección ya que se obtiene el mayor número de semillas germinadas. Los datos de las semillas germinadas con respecto a los tratamientos de desinfección se encuentran en el Anexo 4.

En base a los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico mediante la prueba Shapiro-Wilks, en donde se determinó que los datos obtenidos en la etapa de germinación de semillas no siguen una distribución normal, ya que el p-valor ($<0,0001$) obtenido es menor que el estadístico de prueba ($\alpha=0,05$), es decir son datos no paramétricos (Anexo 5). A partir de esta prueba se realizó un análisis de varianza Kruskal Wallis para datos no paramétricos cuyos resultados se muestran en la figura 8.

Figura 8

Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis de los tratamientos de germinación de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth



Nota: Medias de las semillas germinadas en base a los tratamientos de desinfección.

Grupo de clasificación A (M3S, M4S, M5S y M6S) y grupo de clasificación B (M1S, M2S). El p-valor obtenido

En esta figura se puede observar las diferencias significativas entre los tratamientos M1S, M2S, M3S, M4S, M5S y M6S. Los tratamientos clasificados con distintas letras poseen diferencias significativas entre sí, mientras que, los tratamientos clasificados con una misma

letra no poseen diferencias significativas. Por lo tanto, el grupo B (M1S y M2S) con los tratamientos de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 5 y 10 minutos son tratamientos efectivos en la obtención de más del 40% de semillas germinadas. El tratamiento M2S es claramente eficiente ya que con este se obtiene el 60% de germinación de semillas de esta especie.

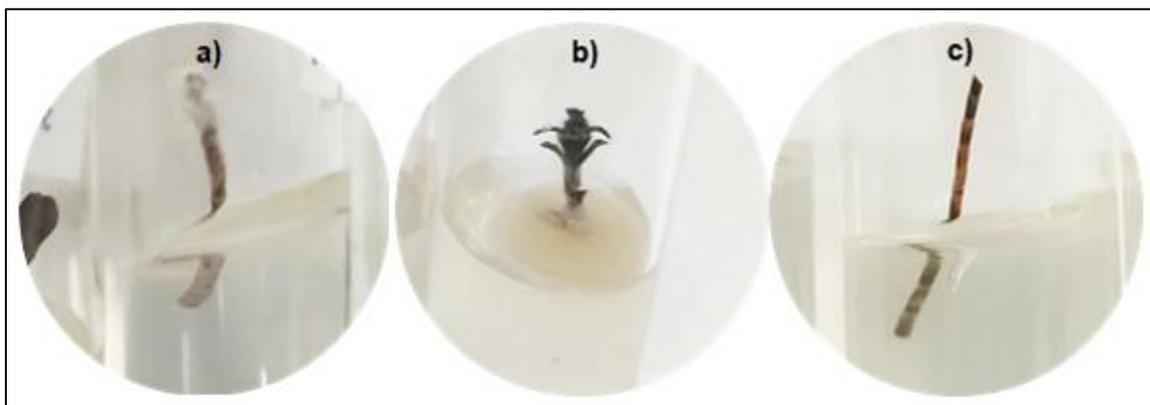
Introducción de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth

Desinfección de yemas apicales/laterales

La micropropagación mediante yemas es una técnica ampliamente utilizada en la obtención de gran cantidad de plantas. El primer paso de esta técnica es el establecimiento de un protocolo de desinfección. En este ensayo se probó tres concentraciones de hipoclorito de sodio al 1%, 2% y 3%, con un tiempo de inmersión de 5 minutos. El control del ensayo se realizó sin hipoclorito de sodio. Además, se evaluó la variable contaminación causada por hongos y bacterias y la variable oxidación (Fig. 9).

Figura 9

Yemas apicales/laterales de Valeriana microphylla Kunth contaminadas con bacterias y hongos y con oxidación

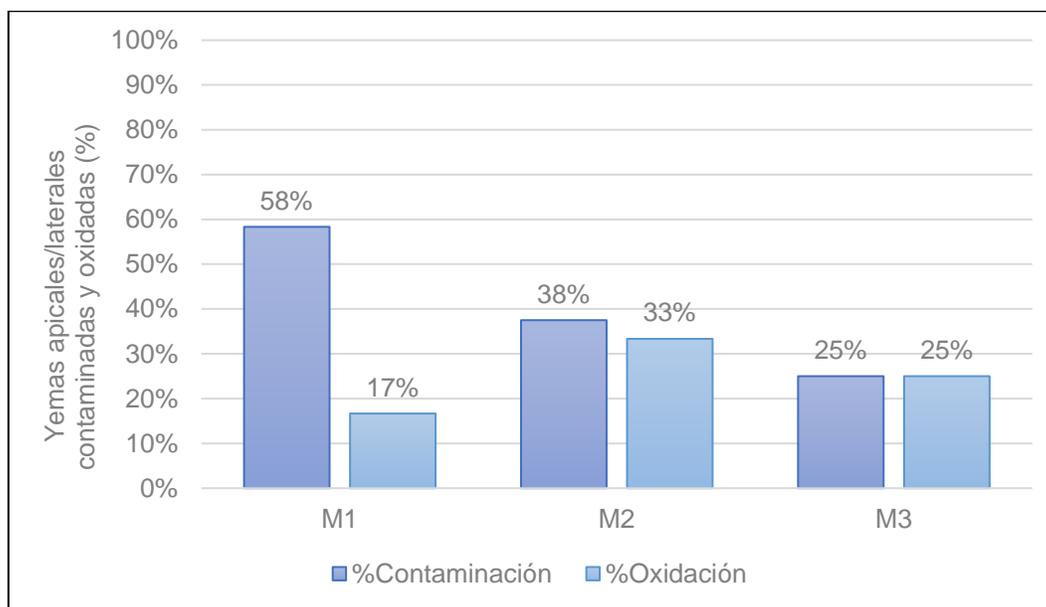


Nota: Yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth a) yema contaminada con hongo, b) yema contaminada con bacteria y c) yema oxidada.

Luego de evaluar la contaminación y oxidación, se calculó el porcentaje de yemas contaminadas y oxidadas. La figura 10 muestra los resultados del porcentaje de yemas apicales/laterales contaminadas (hongos y bacterias) y oxidadas, con respecto a la concentración y tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO). Estos datos se observaron cada siete días de incubación a 20°C durante 30 días.

Figura 10

Porcentaje de yemas apicales/laterales contaminadas (hongos y bacterias) y oxidadas con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección en Valeriana microphylla Kunth



Nota: Porcentaje de yemas apicales/laterales contaminadas y oxidadas en base a los distintos tratamientos de desinfección. M0: sin inmersión a hipoclorito de sodio (NaClO), M1: 1% de NaClO durante 5 min, M2: 2% de NaClO durante 5 min y M3: 3% de NaClO durante 5 min.

En esta figura, los tratamientos de desinfección con inmersión en NaClO al 1% (v/v), 2% (v/v), 3% (v/v) durante cinco minutos, así como el control sin exposición a hipoclorito de sodio,

dieron un porcentaje de contaminación del 100%, 58%, 38% y 25% para los tratamientos M0, M1, M2 y M3 respectivamente. Adicionalmente, en esta gráfica se observa los porcentajes de oxidación de las yemas apicales/laterales para cada tratamiento de desinfección en donde se obtuvo 0%, 17%, 33% y 25% para los tratamientos M0, M1, M2 y M3 respectivamente. Estos resultados sugieren que el tratamiento M3 es el más eficiente en la desinfección de yemas y que además da un menor porcentaje de oxidación. Los datos de las yemas apicales/laterales contaminadas y oxidadas con respecto a los tratamientos de desinfección se encuentran en el Anexo 8.

En base a estos resultados se realizó el análisis estadístico mediante la prueba Shapiro-Wilks en el que se obtuvo un p-valor (0,0643). Este valor es mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$), es decir que los datos de yemas apicales/laterales contaminadas siguen una distribución normal o son datos paramétricos (Anexo 9). Para los datos de oxidación se obtuvo un p-valor (0,5670) que al igual que el de contaminación es mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$) por lo cual sigue una distribución normal. A partir de esta prueba se realizó un análisis de varianza ANOVA. Para los datos de contaminación se obtuvo un p-valor de 0,1212 que es mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$). Esto significa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección. El mismo análisis se realizó para los datos de oxidación mediante la prueba ANOVA, obteniendo un p-valor de 0,8420 mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0,05$), por lo que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

Crecimiento de yemas apicales/laterales con nuevos brotes

En la incubación de las yemas apicales/laterales se evaluó también las yemas viables y los nuevos brotes respecto a los tratamientos que fueron aplicados previamente a distintas concentraciones de NaClO al 1%, al 2% y al 3% (v/v) y tiempo de inmersión de 5 minutos. En esta etapa se evaluó la viabilidad de las yemas y la presencia de nuevos brotes (Fig.12).

Figura 11

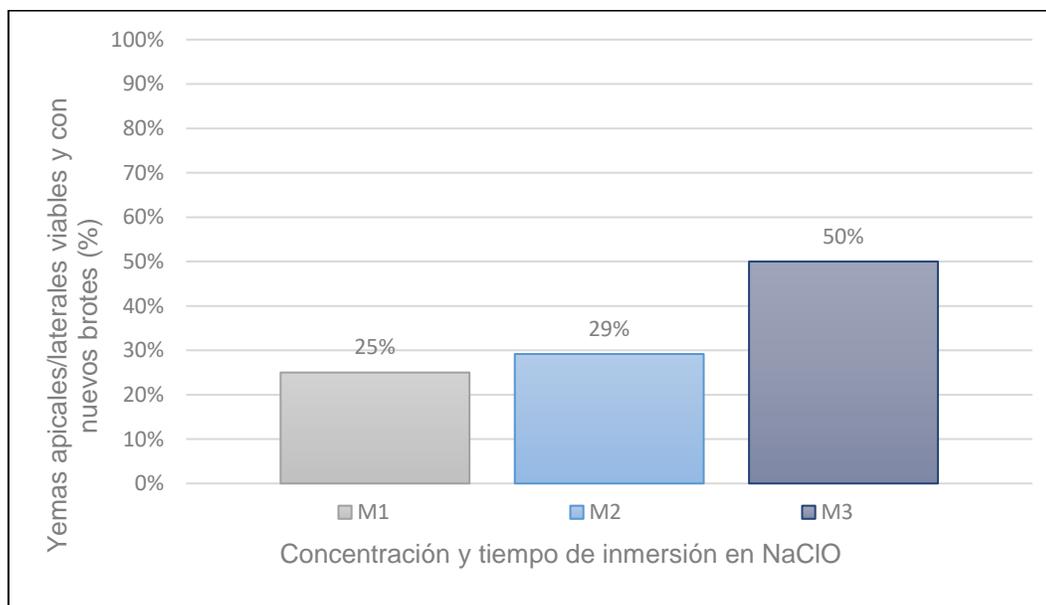
Yema apical/lateral viable con nuevos brotes de Valeriana microphylla Kunth



La figura 12 muestra los resultados del porcentaje de las yemas apicales/laterales viables y con nuevos brotes tras la introducción en el medio de cultivo MS con 3% de sacarosa, observados cada siete días durante un mes a 20°C.

Figura 12

Porcentaje de yemas apicales/laterales viables y con nuevos brotes de Valeriana microphylla Kunth



Nota: Yemas apicales/laterales viables y con nuevos brotes respecto a los tratamientos de desinfección previamente aplicados. M1: 1% de NaClO durante 5 min, M2: 2% de NaClO durante 5 min y M3: 3% de NaClO durante 5 min.

En esta figura, el tratamiento de desinfección M3 al 3% de hipoclorito de sodio durante 5 min, fue el que mostró el mayor porcentaje de yemas viables y con nuevos brotes con un 50%, mientras que con los tratamientos M2 y M1 se obtuvo porcentajes más bajos del 29% y 25% de yemas viables y con nuevos brotes respectivamente.

Capítulo V: Discusión

Los bosques y páramos del Ecuador conforman una de las áreas más importantes en cuanto a diversidad y endemismo de flora. Sin embargo, estas zonas han sido críticamente afectadas por actividades antropogénicas y por el calentamiento global, dándose la pérdida de varias especies vegetales (García, 2005).

El cultivo *in vitro* surge como una técnica de relevancia en la conservación de especies vegetales de interés y la micropropagación a gran escala para la reinserción en sitios vulnerables (Engelmann, 1998). Por lo cual, es importante el establecimiento *in vitro* de protocolos de desinfección e introducción de especies presentes en estas áreas con miras a una posterior reintroducción y restauración de estas zonas.

Establecimiento *in vitro* de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth

Las semillas son ampliamente usadas en el cultivo *in vitro* para la obtención de una planta entera a partir de un explante y en la conservación del germoplasma de especies amenazadas (Engelmann, 1998);(George *et al.*, 2007). Según Teixeira y sus colaboradores, (2015) en el cultivo de tejidos *in vitro* la primera etapa y el paso más importante en el establecimiento aséptico de un cultivo, es la desinfección de los explantes. Este paso es un requisito previo para el éxito del cultivo *in vitro* de tejidos de cualquier planta.

En base a esto, se estableció un protocolo previo de desinfección de semillas en el que se usó detergente 1% por 10 minutos junto con unas gotas de Tween-20 y alcohol al 70% por 1 minuto. Adicionalmente, se evaluó distintas concentraciones de hipoclorito de sodio al 1%, 1,5% y 2% (v/v) durante 5 y 10 minutos para determinar el mejor protocolo de desinfección.

El análisis estadístico realizado a partir de los tratamientos de desinfección para las semillas de *Valeriana microphylla* Kunth mostró que con 1% de NaClO a los 5 y 10 minutos

(M1S y M2S), 1,5% de NaClO a los 5 y 10 minutos (M3S y M4S) y 2% de NaClO a los 5 y 10 minutos (M5S y M6S) junto al detergente, Tween-20 y etanol se obtiene más del 97% de semillas libres de contaminación bacteriana y fúngica, mostrando que estas concentraciones son efectivas en la desinfección de estas semillas.

Algunos autores como Rosales (2014) han reportado otro desinfectante en sus estudios como el dicloruro de mercurio en especies de *Valeriana sp.* donde han obtenido hasta un 65% de desinfección de semillas. Mientras que autores como Nell y colaboradores (2010) al utilizar una doble desinfección con hipoclorito de sodio (1,6%) y etanol (10%) en sus tratamientos de desinfección logran obtener cerca del 100% de semillas no contaminadas en *Valeriana officinalis* L., lo que sugiere el papel importante del hipoclorito de sodio en estos protocolos.

Los resultados obtenidos por Nell y colaboradores (2010) muestran que la combinación de dos agentes desinfectantes como etanol e hipoclorito de sodio favorecen a una mayor eliminación de contaminantes tales como hongos y bacterias. El uso de tensoactivos como Tween-20 es muy importante ya que permite un mayor contacto entre el explante y los desinfectantes al disminuir la tensión superficial, permitiendo así una mayor desinfección (Samadi *et al*, 2009).

Durante el cultivo *in vitro*, otro parámetro a evaluar es la germinación de las semillas. Este parámetro puede verse afectado por la dormancia de la semilla, el tiempo de almacenamiento, la edad, la concentración y tiempo de inmersión de los desinfectantes utilizados, así como la contaminación por hongos y bacterias (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria & Plan Nacional de Desarrollo Alternativo, 2001).

Por tal razón, se evaluó la germinación respecto a los distintos tratamientos de desinfección aplicados. El mayor porcentaje de germinación de semillas con un 60% se obtuvo con el tratamiento al 1,5% de NaClO durante 10 min (M2S), con el tratamiento al 1% de NaClO

durante 5 minutos se obtuvo el 40% de germinación, mientras que con 1,5% y 2% durante 5 y 10 minutos (M3S, M4S, M5S y M6S) la germinación fue menor al 3%.

Los resultados obtenidos de germinación en relación a los distintos tratamientos de desinfección van de acuerdo a lo mencionado por Yildiz & Celâl (2002). En su estudio mencionan que existe una influencia directa entre el desinfectante y la germinación, ya que a mayor concentración del desinfectante la tasa de contaminación se reduce, pero además se reduce la germinación de las semillas. Vargas y colaboradores (2014) mencionan también que la utilización de agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio son útiles en la escarificación, es decir la liberación de la dormancia de las semillas, para una mayor germinación. Sin embargo, George y colaboradores (2007) mencionan que se debe considerar un equilibrio entre el nivel de contaminación y la supervivencia del explante ya que los agentes desinfectantes también pueden ser tóxicos para los tejidos de las plantas. Por lo que la elección de la concentración y tiempo de inmersión del desinfectante se escoge cuando los explantes logran sobrevivir y crecer en un ambiente *in vitro* sin contaminación (Buckley & Reed, 1994).

Considerando lo mencionado anteriormente el tratamiento de desinfección que logra dicho equilibrio entre alto porcentaje de desinfección y germinación de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth es el tratamiento con 1% de NaClO durante 10 minutos (M2S).

Otro de los factores que influencia el establecimiento *in vitro* de semillas es el medio de cultivo y las condiciones de incubación (luz, temperatura, humedad), especialmente para las especies de páramo que se encuentran adaptadas a condiciones específicas y extremas (Mena, 2010). Por lo cual, se estableció un medio de cultivo con sales completas MS, sacarosa 3% y 3 mg/l de ácido giberélico (AG₃), que según George y sus colaboradores (2007) provee de los nutrientes necesarios y promueven la germinación de las semillas al reducir su dormancia mediante la utilización de AG₃.

En algunas especies de plantas de páramo la baja tasa o el largo periodo de germinación, hace que la micropropagación a partir de semillas no sea la técnica más apta en la obtención de gran cantidad de plantas (Iriondo, 2001). Sin embargo, *Valeriana microphylla* Kunth ha desarrollado estrategias ecológicas, con gran producción de semillas (R) y alto porcentaje de germinación (K) lo que hace la una buena especie para una posterior reintroducción en bosques y páramos andinos del Ecuador (Badii *et al.*, 2013).

Establecimiento *in vitro* de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth

La micropropagación a través de yemas es una de las técnicas más fiables y utilizadas en el cultivo *in vitro*. El fin del cultivo de yemas es la multiplicación de brotes mediante la formación de gran cantidad de ramas axilares, ya que cada brote formado servirá para una proliferación repetida (George *et al.*, 2007). Al igual que la semillas el primer paso para el establecimiento *in vitro* de yemas es la desinfección.

En esta primera etapa se estableció un protocolo previo de desinfección de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth con detergente al 10% durante 20 minutos, con unas gotas de Tween-20 y alcohol al 70% durante 1 minuto. Adicionalmente, se evaluó distintas concentraciones de hipoclorito de sodio al 1%, 2% y 3% (v/v) durante 5 minutos para la elección del mejor tratamiento de desinfección.

El análisis estadístico de los distintos tratamientos de desinfección para yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth mostró que con 3% de hipoclorito de sodio (NaClO) con inmersión durante 5 minutos (M3) junto al detergente, Tween-20 y etanol se obtiene el menor porcentaje de contaminación y oxidación. El 25% de yemas presentaron contaminación, otro 25% presentó oxidación por lo que solo el 50% de yemas fueron viables y presentaron nuevos brotes.

Resultados semejantes se han reportado en otras especies del género *Valeriana*. El estudio de Andrade y sus colaboradores (2002) utilizó un protocolo de desinfección de yemas en el que obtuvo un porcentaje de 47,5% de viabilidad y 52,5% de oxidación y contaminación, al utilizar etanol (70%, 1 min) e hipoclorito de sodio (1,5%, 10 min). Otros autores como Rosales (2014) reporta un 6% de contaminación, 79% de oxidación y 15% de yemas viables utilizando dicloruro de mercurio al 0,1% durante 5 minutos como desinfectante. Sin embargo, menciona que los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que tuvieron un alto número de yemas necrosadas (oxidadas). Estos resultados sugieren que cada especie requiere de distintas concentraciones de desinfectante y tiempos de inmersión para la desinfección de yemas a pesar, de pertenecer a la familia Valerianaceae. Sin embargo, también se puede observar que el porcentaje de oxidación de yemas en todas estas investigaciones es alto lo que puede deberse al estrés oxidativo que se produce al cortar el explante y el tratamiento previo de la planta madre (van Staden *et al.*, 2006).

A pesar de haber obtenido un alto porcentaje de yemas viables con nuevos brotes, según George y sus colaboradores (2007) se puede promover el crecimiento y la proliferación de los brotes mediante la utilización de reguladores de crecimiento (citoquininas) en el medio de cultivo. Es así como lo muestran Kaur y colaboradores (1999) en su investigación de cultivo *in vitro* de yemas de *Valeriana jatamansi* en la que mediante la adición de auxinas y citoquinas logran la proliferación de las yemas además de la formación de raíces.

Finalmente, podemos mencionar que la estandarización de un protocolo de desinfección e introducción de semillas y yemas es uno de los pasos fundamentales para la implementación de estrategias de conservación, para preservar y propagar los recursos filogenéticos de cada región amenazada con la pérdida de biodiversidad (Cuba *et al.*, 2020). Por lo tanto, la investigación realizada en las semillas y yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla*

Kunth permitió establecer un protocolo de desinfección e introducción *in vitro* de esta especie que permita realizar futuros planes de restauración.

Esta investigación además establece información relevante para la micropropagación y conservación de otras especies pertenecientes a la familia Valerianaceae, que puedan ser usadas para la recuperación de los bosques y páramos andinos del Ecuador.

Capítulo VI: Conclusiones

El presente estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Valerianaceae en Bosques Andinos del Ecuador, en base a esto se realizaron ensayos de desinfección e introducción que permitieron el establecimiento *in vitro* de *Valeriana microphylla* Kunth y se pudo concluir que:

- Todos los protocolos de desinfección de semillas realizados en este estudio con detergente al 1% (p/v), etanol al 70% e hipoclorito de sodio 1%, 1,5% y 2% (v/v) con inmersión durante 5 y 10 minutos, permitieron la eliminación de agentes contaminantes como hongos y bacterias, con porcentajes de desinfección mayores al 97%.
- El tratamiento de desinfección que permitió la germinación del 60% de semillas de *Valeriana microphylla* Kunth en medio de cultivo suplementado con sales MS completas, 3% de sacarosa y con una concentración de 3 mg/L ácido giberélico, fue el tratamiento M2S con 1% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos.
- El protocolo de desinfección óptimo para yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth, es usando detergente 10% (p/v), etanol 70% (v/v) y 3% de hipoclorito de sodio (NaClO) con inmersión durante cinco minutos, ya que presenta la menor tasa de contaminación y oxidación de aproximadamente 25% en cada caso.
- El medio nutritivo establecido para la introducción de yemas apicales/laterales de *Valeriana microphylla* Kunth consta de sales MS completas y sacarosa 3%, mediante el cual se obtuvo el 50% de yemas con nuevos brotes.

- La concentración de 1% de NaClO y tiempo de inmersión de 10 minutos permite la germinación de las semillas, permeabilizando la testa y permitiendo un mayor flujo de agua hacia el interior de la semilla.

Capítulo VII: Recomendaciones

En la etapa de desinfección de semillas, la selección del material es muy importante. Se recomienda seleccionar semillas que se encuentran abultadas y de color oscuro, debido a la madurez y presencia de embrión, lo que ayudaría en la etapa de germinación.

Se recomienda realizar estudios de multiplicación de brotes mediante la utilización de hormonas para incrementar el número de plantas con el fin de poder realizar planes de reinserción en los páramos y bosques andinos del Ecuador.

En la etapa de desinfección de yemas de *Valeriana microphylla* Kunth se sugiere realizar combinaciones con otros desinfectantes y tiempos de inmersión que permitan obtener un equilibrio entre mayor cantidad de yemas viables y menor cantidad de yemas contaminadas y oxidadas.

Se recomienda establecer un medio de cultivo para yemas de *Valeriana microphylla* Kunth mediante la utilización de agentes antioxidantes que reduzcan la tasa de oxidación de los explantes.

Se sugiere realizar posteriores análisis moleculares, fitoquímicos y bioquímicos en *Valeriana microphylla* Kunth debido a las propiedades medicinales que esta posee.

Referencias

- Albarrán, J., Fuenmayor, F., Fuchs, M., Gustavo Martínez, Rodríguez, A., Manzanilla, E., Díaz, E., León, R., & Torrealba, M. (2011). Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el INIA-CENIAP Venezuela. Caso yuca y musáceas. *Agronomía Tropical*, 61(1), 85–94.
- Bach, K.-K., Guia, F., & Torsell, K. (1993). Valtrates and Lignans in *Valeriana microphylla*. *Planta Med.*, 59(2), 478–479.
- Badii, M., Landeros, J., Valenzuelea, J., Rodríguez, R., Ochoa, Y., & Cerna, E. (2013). Patrones Reproductivos. *International Journal of Good Conscience*, 8(1), 55–63.
- Baquero, Francis., Sierra, R., Ordoñez, L., Tipan, M., Espinoza, L., Rivera, M., & Soria, P. (2004). *La vegetación de los Andes del Ecuador : memoria explicativa de los mapas de vegetación potencial y remanente de los Andes del Ecuador a escala 1:250.000 y del modelamiento predictivo con especies indicadoras* (Vol. 1). EcoCiencia.
- Baruffol, M. (2020, March 22). *Andean ‘water sponges’: The role of plants in water supply*. Kew Royal Botanic Gardens.
- Boutherin, D., & Bron, G. (1994). *Multiplificación de plantas hortícolas*. Editorial Acribia.
- Buckley, P. M., & Reed, B. M. (1994). Antibiotic susceptibility of plant-associated bacteria. *HortScience*, 29(5), 434c–4434. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.5.434c>
- Buytaert, W., Célleri, R., de Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006a). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1–2), 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>

- Buytaert, W., Célleri, R., de Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006b). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1–2), 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>
- Camacho, M. (2013a, December 13). Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. *ANALES de La Universidad Central Del Ecuador*, 79–92.
- Camacho, M. (2013b). *Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible*.
- Cárdenas, C., Picó, F., & Alumbrosos, R. (2013). El fuego y el pastoreo en el páramo húmedo de Chingaza (Colombia): efectos de la perturbación y respuestas de la vegetación. *Ecotrópicos*, 11(1), 3–18.
- Carrillo, G., Silva, B., Rollenbeck, R., Célleri, R., & Bendix, J. (2019). The breathing of the Andean highlands: Net ecosystem exchange and evapotranspiration over the páramo of southern Ecuador. *Agricultural and Forest Meteorology*, 265, 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.11.006>
- Chuncho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71–83.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, & Plan Nacional de Desarrollo Alternativo. (2001). *Manejo integrado del cultivo de tomate de árbol* (1st ed., Vol. 1). Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA PLANTE.
- Cuba, M., Rivera, C., Navarrete, E., & Klagges, M. (2020). Advances of native and non-native Antarctic species to in vitro conservation: improvement of disinfection protocols. *Scientific Reports*, 10(1), 3845. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60533-1>

- Das, G., Shin, H.-S., Tundis, R., Gonçalves, S., Tantengco, O. A. G., Campos, M. G., Acquaviva, R., Malfa, G. A., Romano, A., Robles, J. A. H., Clores, M. Q., & Patra, J.-K. (2021). Plant Species of Sub-Family Valerianaceae—A Review on Its Effect on the Central Nervous System. *Plants*, *10*(5), 846. <https://doi.org/10.3390/plants10050846>
- de Andrade, L., Silva, A., Germano, A., Lino, G., & Rech, S. (2002). *Valeriana glechomifolia*: in vitro propagation and production of valepotriates. *Plan Science*, *163*(1), 165–168. www.elsevier.com/locate/plantsci
- Domínguez, M., Jiménez, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., & Pérez, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, *16*(41), 53–62. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67404109>
- Duque, D. (2008). Creating a high andean montane forest habitat corridor within a paramo mosaic in northern Ecuador. *Ecología Aplicada*, *7*(1).
- ELCOMERCIO. (2011, October 26). *Correa llegó reforzado a Quimsacocha - El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/politica/correa-llego-reforzado-a-quimsacocha.html>
- Engelmann, F. (1998). In vitro germplasm conservation. *Acta Horticulturae*, *461*, 41–48. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.2>
- Estupiñan, R. (2021). La minería en Ecuador. Pasado, presente y futuro. *BOLETÍN GEOLÓGICO Y MINERO*, 533–549. <https://doi.org/10.21701/bolgeomin.132.4.010>
- García, P. (2005). Los caminos del desarrollo sostenible. In *La biodiversidad del Ecuador* (Vol. 2, pp. 81–106).

- George, E. F., Hall, M. A., & de Klerk, G.-J. (2007). *Plant Propagation by Tissue Culture* (E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk, Eds.; 3rd ed., Vol. 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Hartmann, H., & Kester, D. (1981). *Propagación de plantas. Principios y prácticas* (1st ed., Vol. 1). CECSA.
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., & Cerra, M. (2014). *Los Páramos Andino ¿Qué Sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema del páramo*. UICN. www.uicn.org/sur
- Hofstede, R., Groenendijk, J., Coppus, R., Fehse, J., & Sevink, J. (2002). Impact of Pine Plantations on Soils and Vegetation in the Ecuadorian High Andes. *Mountain Research and Development*, 22(2), 159–167. <https://doi.org/10.1659/0276>
- Iriondo, J. (1999). Propagation from seeds and seed preservation. *Manson Publish*, 46–57.
- Iriondo, J. (2001). Biología de poblaciones conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria*, 16(2), 5–24.
- Jiménez, C. (2022). “*Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe-Coca en Ecuador*” [Trabajo de titulación]. Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE.”
- Kaur, R., Sood, M., Chander, S., Mahajan, R., Kumar, V., & Sharma, D. R. (1999). In vitro propagation of *Valeriana jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 227–229. <https://doi.org/10.1023/A:1006425230046>
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género *Valeriana* (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana. Botánica*, 68(2), 244–296. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432011000200016>

- Lehmann, B. (2017). *Valeriana microphylla*. Missouri Botanical Garden.
<http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Valeriana%20microphylla>
- Litz, R. (1984). In vitro somatic embryogenesis from callus of Jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. *HortScience*, 19(1), 62–64.
- Luteyn, J. (1999). *Páramos: A checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature* (1st ed., Vol. 1). Memoirs of The New York Botanical Garden.
- Medina, G., Mena, P., & Josse, C. (1999). *El Páramo como espacio de mitigación de carbono atmosférico* (1st ed., Vol. 1). Abya Yala.
- Mena, P. (2010). *Los páramos ecuatorianos: Paisajes diversos, frágiles y estratégicos*.
- Moss, E. D., & Evans, D. M. (2022). Experimental Climate Warming Reduces Floral Resources and Alters Insect Visitation and Wildflower Seed Set in a Cereal Agro-Ecosystem. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.826205>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858.
<https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nell, M., Wawrosch, C., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Kopp, B., Lössl, A., Franz, C., Novak, J., & Zitterl-Eglseer, K. (2010). Root Colonization by Symbiotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increases Sesquiterpenic Acid Concentrations in *Valeriana officinalis* L. *Planta Medica*, 76(04), 393–398. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186180>
- Peyre, G. (2015). *Plant diversity and vegetation of the Andean Páramo* [Degree of Doctor, Universitat de Barcelona and Aarhus University]. www.tdx.cat

- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores* (1st ed., Vol. 1).
- Podwojewski, P., & Poulenard, J. (2000). La degradación de los suelos de los páramos. *Los Suelos Del Páramo*, 5, 27–38. <https://www.researchgate.net/publication/285589451>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones* (2nd ed., Vol. 1). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rojas, S., García, J., Alarcón, M., Escobar, C., Cipagauta, M., Solarte, H., Osorio, V., Barahona, R., Trujillo, R., Tróchez, M., Rivera, E., Colorado, G., & Cadena, F. (2004). *Propagación asexual de plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*. Corporación colombiana de investigación agropecuaria.
- Romo, M., & Calero, E. (2022). Degradación de la vegetación de páramo por efecto de la ganadería en el Parque Nacional Llanganates, Ecuador. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 17(1), 27–34. <https://doi.org/10.18378/rvads.v17i1.9093>
- Romoleroux, K., Cárate, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019, August 13). *Valeriana microphylla* En: *Plantas vasculares de los bosques de polylepis en los páramos de Oyacachi*. Bioweb.
- Rosales, M. (2014). *Propagacion in vitro de la planta medicinal alto andina Valeriana sp. "siete sabios ", hasta la fase de brotación.* Universidad Nacional "Santiago Antunez de Mayolo."
- Samadi, N., Abadian, N., Bakhtiari, D., Fazeli, M., & Jamalifar, H. (2009). Efficacy of Detergents and Fresh Produce Disinfectants against Microorganisms Associated with Mixed Raw Vegetables. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1486–1490. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1486>

- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., Yadav, V., Upadhyay, A., & Ahmad, Z. (2017). Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 1–36). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_1
- Sklenář, P., & Balslev, H. (2005). Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 416–433. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2004.12.006>
- Sklenář, P., Hedberg, I., & Cleef, A. M. (2014). Island biogeography of tropical alpine floras. *Journal of Biogeography*, 41(2), 287–297. <https://doi.org/10.1111/jbi.12212>
- Soto, P. (2017). *Establecimiento de un protocolo óptimo para la introducción en cultivo in vitro de las especies endémicas: Phaedranassa schizantha y Phaedranassa tunguraguae, en peligro de extinción* [Escuela de Ciencias Químicas]. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Teixeira, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of Anthurium. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14. <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0009>
- van der Hammen, T., & Cleef, A. M. (1986). Development of the High Andean Páramo Flora and Vegetation. In *High Altitude Tropical Biogeography* (pp. 153–201). <https://www.researchgate.net/publication/284027319>
- van Staden, J., Fennell, C. W., & Taylor, N. J. (2006). Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725, 55–62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2>

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

Withers, L. A., & Engelmann, F. (1998). In Vitro Conservation of Plant Genetic Resources. *Agricultural Biotechnology*, 1, 57–88.

Yildiz, M., & Celâl, E. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, 89(6), 259–261. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6>