



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN HORTICULTURA AMBIENTAL



**Portada interna del Trabajo de Titulación**  
**Protocolo de propagación por semilla de *Gentiana spathacea* Kunth.**  
(Tesis Individual).

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Horticultura Ambiental

**Presenta:**

Danae Vania Romero Rangel

**Dirigido por:**

**SINODALES**

Dra. Emma Fabiola Magallán Hernández  
Presidente

  
Firma

Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños  
Secretario

  
Firma

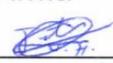
Dr. Santiago Vergara Pineda  
Vocal

  
Firma

M. en C. Judith Gabriela Luna Zuñiga  
Suplente

  
Firma

M. en C. Juan Antonio Valencia Hernández  
Suplente

  
Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

22 de Agosto del 2022

**México**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Protocolo de propagación por semilla de *Gentiana  
spathacea* Kunth

**por**

Danae Vania Romero Rangel

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-237018

## Resumen

En México existe una alta diversidad de plantas aromáticas y medicinales (PAM's) con usos tradicionales, muchas de las cuales se extraen de poblaciones silvestres para su comercialización, este es el caso de *Gentiana spathacea* Kuth, conocida comúnmente como "flor de hielo". La especie se encuentra en la categoría de riesgo "Sujeta a protección especial" en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010). Por esta razón, son valiosos los trabajos que generan información sobre la fisiología, propagación y manejo agrícola, que contribuyen a la preservación y un uso adecuado de la especie, con la finalidad de que también las comunidades locales sean beneficiadas. Los objetivos de este estudio fueron 1) Caracterizar los frutos y las semillas (peso, tamaño, color, forma y cubierta), 2) determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas y 3) determinar el porcentaje de germinación en diferentes condiciones. Para la caracterización de los frutos y las semillas se utilizaron glosarios botánicos y tablas para determinar su madurez. Para determinar la viabilidad, se efectuaron 3 tratamientos, teniendo como constantes la concentración de tetrazolio y la temperatura, con 3 diferentes tiempos de exposición, como variable. Para el porcentaje de germinación, se llevó a cabo un diseño experimental de tipo multifactorial, con dos factores (temperatura y fotoperiodo), con 42 unidades muestrales, en 5 unidades experimentales. Los resultados muestran que los frutos con tonalidades verdes son inmaduros al igual que las semillas verdes o traslucidas, mientras tanto en las pruebas de viabilidad el tratamiento con la concentración del 1% de tetrazolio, temperatura de 30°C y 96h de exposición, es el que obtuvo el mayor porcentaje de tinción, que fue de 89%. En cuanto a la germinación, se encontró que la luz no es un factor determinante, en cambio la temperatura sí lo es. El mayor porcentaje de germinación fue de 80% a 20°C. Se determinó que las semillas son fotoblásticas neutras, no presentan latencia y por lo tanto no requieren tratamiento pregerminativo. Con la información generada se pretende ayudar al establecimiento de *Gentiana espathaceae* como cultivo de planta medicinal y ornamental, así mismo proporcionar una herramienta para evitar su pérdida parcial o total en el territorio nacional.

## Summary

In Mexico there is a high diversity of aromatic and medicinal plants (PAM) with traditional uses, many of which are extracted from wild populations for marketing, this is the case of *Gentiana spathacea* Kuth, commonly known as "ice flower". The species is in the risk category "Subject to special protection" in NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010). For this reason, the works that generate information on the physiology, propagation and agricultural management, which contribute to the preservation and proper use of the species, with the aim of also benefiting local communities are valuable. The objectives of this study were 1) Characterize fruits and seeds (weight, size, color, shape and cover), 2) determine the viability percentage of seeds and 3) determine the germination percentage under different conditions. For the characterization of the fruits and seeds, botanical glossaries and tables were used to determine their ripeness. To determine viability, 3 treatments were performed, having as constants the concentration of tetrazolium and temperature, with 3 different exposure times, as variable. For the germination percentage, an experimental multifactorial design was carried out, with two factors (temperature and photoperiod), with 42 sample units, in 5 experimental units. The results show that fruits with green hues are immature like green or translucent seeds, meanwhile in feasibility tests the treatment with the concentration of 1% tetrazolium, temperature of 30°C and 96h exposure, is the one who obtained the highest staining percentage, which was 89%. As for germination, it was found that light is not a determining factor, whereas temperature is. The highest germination percentage was 80% to 20°C. It was determined that the seeds are photoblastic neutral, have no latency and therefore do not require pregerminative treatment. The information generated is intended to help the establishment of *Gentiana espathaceae* as a medicinal and ornamental plant crop, as well as provide a tool to prevent its partial or total loss in the national territory.

## **Dedicatorias**

A Dios, a mis hermanos Leo y Bruno, a mi papá Edgar, a mi mamá Ariadna, a mi familia y mis amigos con mucho cariño.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por los espacios y material que otorgo para realizar mi trabajo de titulación.

A mi directora de tesis Dra. Fabiola Magallán por permanecer a mi lado durante todo el proceso, por su paciencia y dedicación, a mis sinodales la Dra. Mónica Queijeiro, el Dr. Santiago Pineda, M. en C. Judith Gabriela Luna Zuñiga y M. en C. Juan Antonio Valencia Hernández por enriquecer esta investigación con su conocimiento, tiempo y enseñanzas.

A mi familia que estuvo al pendiente de mí, dándome sus palabras de aliento y ánimo.

A mis amigos Ana, Karen, Lucia, Miguel, Paola, Abraham que estuvieron apoyándome y alentándome a que continuara.

A mis compañeros de Licenciatura por sus palabras de aliento, a Paola Arellano Valencia por su apoyo y foto y a Nahúm Uribe Arteaga por su ayuda en el conteo de semillas.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Summary</b> .....	3
<b>Agradecimientos</b> .....	5
<b>Dedicatorias</b> .....	4
<b>Índice</b> .....	6
<b>Índice de figuras</b> .....	7
<b>Índice de cuadros</b> .....	8
<b>1.Introducción</b> .....	9
<b>2.Marco teórico</b> .....	10
2.1. La semilla y su germinación.....	10
2.2. Protocolo de propagación por semilla .....	11
<b>3. Especie de estudio</b> .....	12
3.1. Taxonomía .....	12
3.2. Distribución.....	13
3.3. Características ecológicas.....	14
3.4 Descripción botánica .....	15
<b>4. Antecedentes</b> .....	16
4.1. Estudios etnobotánicos .....	16
4.2. Fitoquímica, farmacología y actividad biológica .....	17
4.3. Estudios de propagación.....	18
<b>5. Justificación</b> .....	19
<b>6. Hipótesis</b> .....	20
<b>7. Objetivos</b> .....	20
7.1 Objetivo general .....	20
7.2. Objetivos particulares .....	20
<b>8. Metodología</b> .....	20
8.1. Diagrama de flujo. ....	20
8.2. Revisión Bibliográfica .....	21
8.3. Revisión de herbario.....	21
8.4. Área de estudio .....	22

8.5. Modo de colecta y almacenamiento .....	23
8.6. Caracterización de frutos y semillas .....	24
8.7. Determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas .....	25
8.8. Definición de las condiciones ambientales óptimas para la germinación de las semillas .....	25
8.9. Análisis estadísticos .....	27
<b>9. Resultados .....</b>	<b>27</b>
9.1. Caracterización de frutos.....	27
9.2. Caracterización de las semillas .....	28
9.3. Determinación del porcentaje de viabilidad de las semillas.....	29
9.4. Condiciones ambientales óptimas para la germinación de las semillas. ....	31
9.4.1. Porcentaje y tasa de germinación. ....	31
<b>10. Discusión .....</b>	<b>33</b>
10.1. Caracterización de los frutos y las semillas.....	33
10.2. Viabilidad de la semilla. ....	34
10.3. Porcentaje y tasa de germinación. ....	34
10.4 Problemática en la conservación y la importancia de la propagación. ....	36
<b>12. Protocolo de propagación .....</b>	<b>36</b>
<b>13. Conclusión.....</b>	<b>39</b>
<b>14. Literatura Citada.....</b>	<b>39</b>
<b>15. Anexos .....</b>	<b>43</b>

### Índice de figuras

Figura 1. Distribución <i>Gentiana spathacea</i> Kunth, en la República Mexicana. Imagen tomada de Villarreal et al., (2009). ....	14
Figura 2. Mapa de la distribución de la especie <i>Gentiana spathacea</i> Kunth, en el Bajío y zonas adyacentes (Villarreal-Quintanilla 1998). ....	14
Figura 3. Flor del hielo, <i>Gentiana spathacea</i> Kunth, bosque en las cercanías de Xichú. Fotografía: Arellano Valencia Paola 2020. ....	16
Figura 4. Diagrama de flujo de los procedimientos que se siguieron durante el trabajo de investigación. ....	21

Figura 5. Sitios de colecta, Sierra de El Doctor, Cadereyta de Montes y Tenasda, Amealco de Bonfil, Querétaro. ....	23
Figura 6. Ejemplo de información de la forma en que se tomaron las medidas la semilla completa y el embrión a través del estereoscopio Leica 9.....	25
Figura 7. Esquema del diseño experimental. ....	26
Figura 8. Partes del fruto de <i>Gentiana spathacea</i> , a) cápsula elíptica alargada con una dehiscencia septicida apical, se muestra el ápice en espiral; b) corte longitudinal de la cápsula, el acomodo de las semillas, número de lóculos y carpelos Sm=semillas, Cpl=Carpelo y Lcl= lóculo. ....	28
Figura 9. Fruto mostrando corola persistente de 4-6 lóbulos bicúspidados. ....	28
Figura 10. Semilla de <i>Gentiana spathacea</i> , que muestra la forma periforme, junto con el ala translúcida de textura reticulada. a) Embrión b) ala de la semilla.....	29
Figura 11. Embrión teñido con las medidas de largo y ancho. ....	30
Figura 12. Gráfica comparativa de los ensayos de viabilidad de las semillas de <i>Gentiana spathacea</i> . ....	30
Figura 13. Diferencias de las semillas del grupo 1 y 2. a) Semilla del grupo 1 sin tinción b) semilla del grupo 2 con tinción. ....	31
Figura 14. Gráfica comparativa entre tratamientos. ....	32
Figura 15. Gráfica comparativa de las semillas germinadas y la velocidad de germinación entre los tratamientos. ....	32

### **Índice de cuadros**

Cuadro 1. Tabla de comparativa.....	30
Cuadro 2. Diferencias significativas entre la tasa de germinación entre los tratamientos .....	32

## 1. Introducción

En México existe una alta diversidad de plantas aromáticas y medicinales (PAM's) de uso tradicional, resultado de la combinación de la herbolaria precolombina y la europea. Se estima que el 80% de la población hace uso de las PAM's (García *et al.*, 2011), lo que implica una demanda importante de estas plantas, las cuales se comercializan en diferentes presentaciones, que se obtienen de las distintas partes de la planta, que van de las hojas hasta la raíz, y de los productos de él metabolismo secundario como los aceites esenciales. La mayoría de las especies que se comercializan, no se cultiva, extrayéndose de las poblaciones silvestres, esta extracción suele ser sin ningún tipo de control y en grandes cantidades, lo cual es un grave problema en la actualidad, ya que contribuye a la pérdida de la biodiversidad en nuestro país (INAH, 2014).

La sobreexplotación y la pérdida del hábitat tienen una influencia directa sobre las PAM's, ya que son las principales causas de su extinción. La sobreexplotación se define como la extracción de individuos de una población a una tasa mayor a la de su reclutamiento, lo que ha llevado a la extinción de las poblaciones. Algunas especies son más vulnerables que otras a este proceso, debido a sus características biológicas intrínsecas como: distribución restringida, baja abundancia, alta tasa de mortalidad y baja tasa reproductiva. Además, existe poca información para desarrollar programas de conservación y manejo, aunado a la falta de herramientas para su propagación y cultivo (CONABIO, 2020), este es el caso de *Gentiana spathacea* Kunth, conocida comúnmente como "flor de hielo", la cual recibe este nombre debido al color de sus flores y a que florece principalmente en invierno. Se utiliza para varios padecimientos del sistema respiratorio y digestivo, administrándose en macerados de diferentes partes de la planta y mayormente de las flores (Aguilar *et al.*, 2020). Debido a su uso y a la creciente demanda del mercado, junto con su distribución geográfica, la especie se encuentra en la categoría de "Sujeta a protección especial" en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010).

## 2. Marco teórico

## 2.1. La semilla y su germinación

La semilla es una unidad funcional de las plantas, resultante del óvulo fecundado y desarrollado, que sirve para la dispersión y la reproducción sexual de las plantas con flor, cuyas estructuras principales son: radícula, plúmula, cotiledón o cotiledones, endocarpio, endospermo, cubierta seminal, entre otras estructuras especializadas, por ejemplo las alas, los tricomas, los arilos, etc. La semilla contiene la información genética de sus progenitores, estos datos están asociados con su ecología, esa información le da las características que distinguen a las plantas unas de otras. Gracias a esas características adaptativas, las condiciones que requieren las semillas para iniciar el proceso de germinación son muy distintas entre especies (Hartmann *et al.*, 2011 y Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

La germinación es un proceso en el que aumenta la actividad metabólica y comienza el crecimiento del embrión, lo que involucra hidratación o imbibición y la utilización de las reservas nutrimentales, como resultado se da la ruptura de las cubiertas de la semilla y gradualmente se da el desarrollo de los sistemas de síntesis que permiten que la planta sea autotrófica y poco tiempo después que esto ocurre emerge la plántula. La germinación está dividida en las siguientes etapas: 1) adsorción de agua (por imbibición y ósmosis), 2) asimilación, 3) respiración y 4) crecimiento, las cuales son clave para el establecimiento de las poblaciones, ya que a través de los nuevos reclutas (plántulas) las especies permanecen (Hartmann *et al.*, 2011 y Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). Para que el proceso de germinación se lleve a cabo, se debe de contar con las condiciones ambientales adecuadas y favorables en cuanto a la humedad, la temperatura, la composición de los gases atmosféricos, la luz, entre otros. La temperatura óptima para la germinación, es variable, ya que las semillas tienen diferentes rangos de temperatura para germinar, además que a muy bajas o altas temperaturas ya no es posible este proceso. La luz puede ser o no un factor determinante en la germinación, esto depende de la ausencia o la cantidad de un pigmento proteico sensible a la luz llamado fitocromo y del periodo de iluminación. Dependiendo de su respuesta a la luz, las semillas pueden ser clasificadas como: fotoblásticas positivas, las cuales no germinan en la

oscuridad; fotoblásticas negativas, cuya germinación es inhibida por la luz y por último las fotoblásticas neutras, las cuales son indiferentes a la presencia o ausencia de luz (Márquez-Gúzman *et al.*, 2013).

La quiescencia es un estado de reposo en el que se encuentra la semilla en la primera etapa de su desarrollo, en donde siguen activas sus funciones fisiológicas, esta etapa inicia desde el momento que la semilla está madura y es depositada fuera del fruto, hasta que comienza a germinar en condiciones de humedad y temperatura adecuadas. Mientras la dormancia es causada por: necesidad de maduración tardía, cubiertas de la semilla difíciles de romper, retraso en el intercambio gaseoso, cubiertas impermeables y embriones rudimentarios, además la latencia o dormancia es el estado en el cual una semilla viable no germina, hasta tener las condiciones idóneas y en muchos casos hasta pasar por procesos específicos, llamados tratamientos pregerminativos. Esto se debe a que las células meristemáticas se encuentran en estado de reposo, esto les ayuda a las semillas a sobrevivir en condiciones desfavorables y adversas, aunque no indefinidamente, estas células pueden estar inactivas por muchos años, es una de las propiedades adaptativas más importantes que poseen las plantas, gracias a ello, las semillas pueden sobrevivir a diferentes condiciones. (Hartmann *et al.*, 2011 y Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

## 2.2. Protocolo de propagación por semilla

Es un conjunto de información sobre los métodos de propagación sexual y rasgos de historia de vida de las plantas. En él se integran los mecanismos, técnicas y métodos, que promueven la germinación de la semilla y la supervivencia de las plántulas, tomando en cuenta las condiciones ambientales óptimas lo que determina el éxito del proceso. Para determinar las condiciones óptimas de germinación de una especie es necesario conocer los parámetros ambientales, la capacidad germinativa de la especie y así poder propagarse. En el caso particular de especies endémicas, raras o amenazadas tener un protocolo de propagación es muy importante ya que una vez estableciendo sus requerimientos podrán propagarse sin afectar a las poblaciones silvestres y brindar el conocimiento para el

aprovechamiento sustentable de las plantas. Los protocolos pueden tener información variada pero debe de contar con al menos: el contexto sobre el hábitat de la especie, el manejo y reproducción de la planta de estudio (Dumroese-Kasten., 2009; Rodríguez-Servín *et al.*, 2010 y Martínez-Peña *et al.*, 2012 ).

### **3. Especie de estudio**

#### 3.1. Taxonomía

La especie *Gentiana spathacea* fue propuesta Kunth en 1818, pertenece a la familia Gentianaceae que se encuentra en la subclase: Asteridae y al orden: Gentianales, esta familia tiene aproximadamente 80 géneros y más de 1600 especies (Villarreal–Quintanilla *et al.*, 2009). La familia Gentianaceae fue estudiada por Villareal (1998), quien llevó a cabo un estudio taxonómico en donde describió que la familia contiene 80 géneros y aproximadamente 1000 especies, con una distribución cosmopolita, principalmente en clima húmedo y templado, así como montañas tropicales. En el mismo estudio se describió que muchas de sus especies tienen flores vistosas y se cultivan como ornamentales. Struwe *et al.*, (2002) realizaron una monografía, en la que enlistan más de 1600 especies en 87 géneros, este trabajo sirvió para determinar la gran variación morfológica presente en la familia y su adaptación a diferentes síndromes funcionales para polinización y dispersión.

El género *Gentiana* fue propuesto por Linneo en 1753 y más tarde fue estudiado por Gillett (1957) en un trabajo de revisión taxonómica. En dicho estudio se discutió que era necesario aumentar los estudios en América, para delimitar los géneros de la familia, como resultado agrupó las especies de Norteamérica en tres subgéneros: *Euplephis*, *Gentianella* y *Comastoma*. Iltis (1965) también realizó estudios taxonómicos y florísticos sobre los géneros y especies de Gentianaceae, describiendo nuevas especies y haciendo segregación de los géneros. Ho *et al.*, (1993) hicieron un estudio florístico presentando un listado de las especies de *Gentianella* en el sur de América y el norte de Nueva Zelanda, donde se delimitaron los géneros *Gentiana* y *Gentianella* a través de caracteres morfológicos. Más tarde Villareal (1996) desarrolló un estudio taxonómico, en el que describió una nueva especie en Durango, con la cual, se contabilizaron cinco especies conocidas de la

sección *Pneumonanthe* (*Gentiana*) para el norte del país. Para el 2002 Struwe contabilizó 360 especies dentro del género *Gentiana*. Villarreal *et al.*, (2009), realizaron un estudio florístico del género *Gentiana* en México en el que se reconocieron 13 especies con una subespecie, con distribución en la Sierra Madre Oriental, la sierra Madre Occidental y el eje Neovolcánico transversal.

### 3.2. Distribución

La especie se distribuye a través del centro del país en las regiones fisiográficas de: la Sierra Madre oriental, Sierra Madre occidental y el Eje neovolcánico transversal en los estados de Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Ciudad de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Pringle., 1977 y Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2009)(Figura 1). Dentro del Estado de Querétaro se encuentra en los municipios de Peñamiller, Pinal de Amoles, San Joaquín, Cadereyta y Amealco (Villarreal-Quintanilla, 1998) (Figura 2).

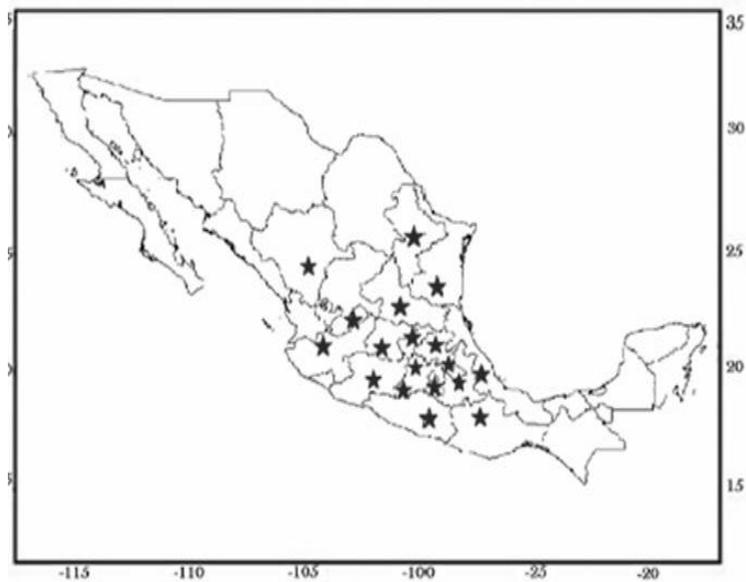


Figura 1. Distribución *Gentiana spathacea* Kunth, en la República Mexicana. Imagen tomada de Villarreal *et al.*, (2009).

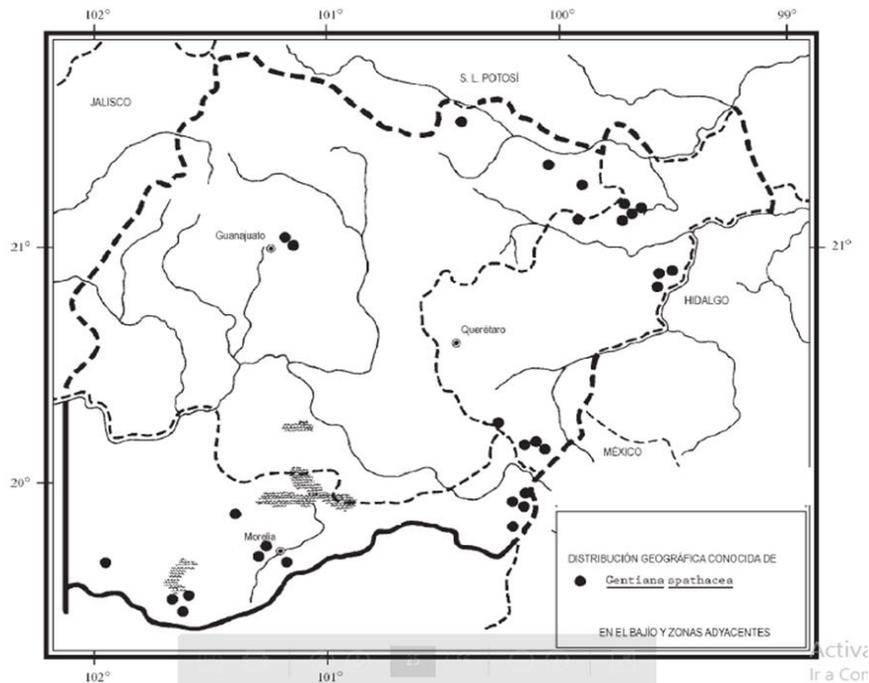


Figura 2. Mapa de la distribución de la especie *Gentiana spathacea* Kunth, en el Bajío y zonas adyacentes (Villarreal-Quintanilla 1998).

### 3.3. Características ecológicas

Es común encontrarla en laderas y claros, en bosques de Pinus-Quercus y Pinus-Abies a una altura que va desde los 1800 a los 3300 msnm (Villarreal-Quintanilla., 1998). En cuanto a las interacciones con animales e insectos, por el tipo de corola (salverforme, un tubo estrecho con pétalos doblados abruptamente hacia afuera en ángulo recto), se puede inferir que las flores proporcionan una zona de aterrizaje para los insectos polinizadores que las visitan, como las mariposas. Adicionalmente, por su color (azulado a violeta) es probable que presente síndrome de polinización de psicofilia (polinización por mariposas) (Struwe *et al.*, 2002). También se menciona que florece durante casi todo el año, principalmente en los meses de diciembre a marzo (Villarreal-Quintanilla.,1998).

### 3.4 Descripción botánica

La descripción de Villareal-Quintanilla (1998) menciona que *Gentiana spathaceae* (Figura 3) es una planta herbácea perenne con raíz pivotante de 1 a 2 cm de grueso, usualmente ramificada tiene tallos erectos o ascendentes, de 30 a 120 cm de alto,

glabros o puberulentos; las hojas sésiles, lanceoladas a anchamente ovadas, de 3 a 8 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho, ápice agudo, base redondeada, margen entero, trinervadas, de color verde claro; flores solitarias o dispuestas en grupos, sésiles a cortamente pedunculadas, terminales o en las axilas de las hojas superiores, acompañadas de un par de hojas reducidas; cáliz espatiforme, con una sola fisura lateral, glabro, tubo de 5 a 10 mm de largo, lóbulos de menos de 1 mm de largo; corola azul-morada, cilíndrico-campanulada, tubo de 2.5 a 4 cm de largo, lóbulos elíptico-ovados, de 5 a 10 mm de largo, apéndices interlobulares bicuspidados, de 3 a 6 mm de largo; estambres inclusos, anteras de 2 a 3 mm de largo; pistilo con estilo corto, estigma bifurcado, corto; cápsula elíptica, de 2 a 4 cm de largo; semillas de 1 a 2 mm de largo, aladas (Villarreal-Quintanilla.,1998).



Figura 3. Flor del hielo, *Gentiana spathacea* Kunth, bosque en las cercanías de Xichú. Fotografía: Arellano Valencia Paola 2020.

#### **4. Antecedentes**

##### **4.1. Estudios etnobotánicos**

Gracias a su extensión geográfica la especie *Gentiana spathacea* se conoce con muchos nombres que se han documentado en diferentes trabajos, en la Ciudad de México se nombra como Yelera o Hielera (Salazar, 1945), en los estados de

Querétaro, Michoacán y Guanajuato se nombra como Yolera o Flor de los hielos (Villarreal-Quintanilla.,1998), en el herbario de QMEX se menciona que en Amealco Querétaro se le llama Juana Mi Pila (Cabrera, 2015), en el estado de Hidalgo se le conoce como Flor de hielo y Nochebuena (Aguilar *et al.*, 2020), la UNAM menciona Flor del cielo raso del monte, Estado de México Juanilipili, Morelos Yelhuetecapahtli (BDMTM, 2009) mientras CONABIO tiene registros de los nombres de Flor de güegüeche, Lebón retama, Yelhuetecapahtl o Cola de tlacuache (Enciclovida, 2021) y Rã doni ste en hñähñu nombre utilizado por las comunidades hablantes de la lengua (Morales, 2019).

Aguilar *et al.*, (2020) desarrollaron un estudio etnobotánico, en el que registraron los usos que le dan a la flor del hielo los habitantes de Mineral del Monte, Hidalgo, registrando que se usa principalmente en tisanas y macerados, para afecciones de los sistemas respiratorio y digestivo. El estudio enfatizó la categoría de conservación en que se encuentra *Gentiana spathacea*, bajo la categoría “Amenazada” en la NOM-059-2001(DOF 2002), con esta información se hizo una reflexión de su importancia para los habitantes de Mineral del Monte, ya que forma parte de la flora del lugar y juega un papel esencial para la salud de los residentes.

#### 4.2. Fitoquímica, farmacología y actividad biológica

Salazar (1945) realizó un análisis químico (considerado un estudio farmacodinámico) de *Gentiana spathacea* con el objetivo de comprobar las propiedades terapéuticas con efecto astringente, y en particular las propiedades de algunos principios activos que contiene la especie. Analizó cuatro extractos con diferentes partes de la planta y en etapas fisiológicas diferentes, estas cuatro muestras se sometieron a diferentes pruebas. Con el primer extracto estudió la presencia de alcaloides, resinas, éteres, grasas, cera y caucho, la prueba de alcaloides junto con la de grasas dieron negativo, mientras de cera y caucho dieron positivo, en la prueba de resinas encontró que contiene resinas ácidas, resinas alcoholes, resinas ésteres y resinas. El segundo extracto, se sometió a pruebas de sustancias solubles en éter sulfúrico, en el que el análisis dio positivo a pirocatequina, posteriormente el mismo extracto se sometió a la prueba de ácidos

orgánicos, en el que solo dio positivo en el ácido acético. Llevó a cabo otra prueba con el método Stas Otto para analizar la presencia de los alcaloides, dichas pruebas dieron positivo. Para el tercer extracto investigó taninos, glucosa, flobafenos y resinas, en donde las pruebas dieron positivo. En el cuarto extracto investigó ácidos orgánicos, albuminoides, saponinas, principios pépticos y gomas. Como resultados se obtuvo que la acción astringente se debe al tanino, que es el principio más abundante que contiene la planta, y al que se puede atribuir las propiedades antidiarreicas. El mucílago (que se encuentra en hojas y ramas) que contiene ejerce acción benéfica y puede ser correctivo de la astringencia del tanino, también determinó que después de la floración, contiene mayor cantidad de taninos que antes de la floración.

Rojas *et al.*, (1999) realizaron un estudio en el que investigaron el efecto de los extractos cloroformo-metanol (1:1) sobre las contracciones musculares ileales espontáneas en ratas, derivados de varias especies usadas por los indígenas otomíes en Querétaro. Dentro de las especies estudiadas se encontraba *Gentiana spathacea*, en sus resultados mostraron que todos los extractos producen una inhibición dependiente de la concentración, en las contracciones ileales espontáneas que sufrían las ratas. Además probaron la actividad antimicrobiana de los extractos contra enterobacterias patógenas, en la que *Gentiana* no mostró ningún efecto. Las acciones farmacológicas expuestas por dichos extractos, confirman el uso etnomédico de la planta para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

Rojas *et al.*, (2000) realizaron un bioensayo con extracto de cloroformo-metanol (1:1) de *Gentiana spathacea* a través del cual aislaron el compuesto gentiopicrosido (gentiopricrina 1), el principal componente espasmolítico de la planta. Este principio inhibió, de manera dependiente de la concentración, las contracciones espontáneas del músculo liso del cerdo, lo que sugiere que este compuesto podría estar interfiriendo con la entrada de calcio en las células del músculo liso.

Rojas *et al.*, (2003) llevaron a cabo un trabajo de investigación sobre los efectos de los extractos de cloroformo-metanol (1:1), derivados de cinco especies de plantas

medicinales en *Xenopus laevis oocytes* (una especie de anfibio). Para este trabajo utilizaron la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos, como resultado encontraron que el extracto de *Gentiana spathacea* no indujo ninguna respuesta.

Yanga et al., (2010) hicieron una revisión bibliográfica de 1960 a 2009, de los trabajos relacionados con la fitoquímica del género *Gentiana*, principalmente de la caracterización de los metabolitos secundarios, como resultado obtuvieron una tabla de los componentes químicos, las especies que lo contienen, las referencias y el país en donde se realizó el trabajo. Para *Gentiana spathacea*, se menciona que contiene iridoideas y secoiridoideas, a los que pertenece genciopicrosido, estos compuestos presentan propiedades benéficas sobre la función hepática y biliar.

#### 4.3. Estudios de propagación

Sobre *Gentiana spathacea* Kunth, no se encontraron estudios de su propagación, únicamente se hallaron trabajos con especies relacionadas. Tal es el caso de *Gentiana lutea* L. en la cual llevaron a cabo dos ensayos sobre sus condiciones de germinación, en estos ensayos probaron la respuesta de la semilla bajo diferentes tratamientos y condiciones, de frío y exposición a la luz. Para el primer ensayo se usaron semillas que se colectaron 30 meses antes del experimento, estas estuvieron almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente. Al momento de colocar las semillas en las cajas petri para iniciar el experimento observaron un deterioro importante en ellas. Las semillas fueron sometidas a un pretratamiento de 45 días en refrigeración, y un control sin el tratamiento de refrigeración, posteriormente se incubaron en 15 °C, 25 °C y alternando 15 °C/25 °C, en completa oscuridad y otro tratamiento con 12 horas de exposición de luz (fotoperiodo). Para el segundo ensayo se usaron las semillas que se colectaron 20 meses antes. En este segundo ensayo utilizaron un pre tratamiento que consistía en 15 días de refrigeración a 20°C con un tratamiento de 24 h inmersas en una solución de ácido giberélico (70 mg/1 ml a temperatura ambiente). La incubación se realizó con la modalidad del régimen alternativo 10 °C, 20 °C y 10 °C/ 20°C, en completa oscuridad y con 12 horas de exposición a la luz (fotoperiodo). Ambos ensayos tuvieron

resultados de germinación nulos, discutieron que probablemente esto sucedió debido al tiempo de almacenamiento, que resultó excesivo (Póvoa et al., 2005).

## **5. Justificación**

Hasta el momento, la especie *Gentiana spathacea*, se ha estudiado con un enfoque taxonómico, etnobotánico y fitoquímico. Sin embargo, no se encontraron estudios sobre la caracterización de la semilla y su propagación, por lo que es necesario realizar un protocolo de germinación para ayudar a la conservación de la especie y sus poblaciones silvestres ofreciendo herramientas para su cultivo, restándole la presión a la que es sometida por el saqueo.

Por esta razón, son valiosos los trabajos que generan información sobre la fisiología, propagación y manejo agrícola, que contribuyen a la preservación y un uso adecuado de la especie, con la finalidad de que también las comunidades locales sean beneficiadas (INAH, 2014).

## **6. Hipótesis**

Debido a que *Gentiana spathacea* es una planta anual del Bosque de *Quercus-Pinus*, las semillas no necesitarán de un tratamiento pregerminativo y tendrán mayor porcentaje de germinación a temperaturas promedio de entre 18 °C a 20°C debido a que su hábitat es predominantemente templado.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Elaborar un protocolo de propagación por semilla para *Gentiana spathacea* Kunth.

### **7.2. Objetivos particulares**

7.2.1. Caracterizar los frutos y las semillas (tamaño, peso, color, forma y cubierta), desde un enfoque agronómico.

7.2.2. Determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas de *Gentiana spathacea* Kunth.

7.2.3. Determinar el porcentaje y tasa de germinación de *G. spathacea* en diferentes condiciones de luz y temperatura.

## 8. Metodología

### 8.1. Diagrama de flujo.

Se esquematiza en el siguiente diagrama la metodología de la presente investigación, en el cual se sintetizan los procedimientos que se utilizaron para el cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados (Figura 4).

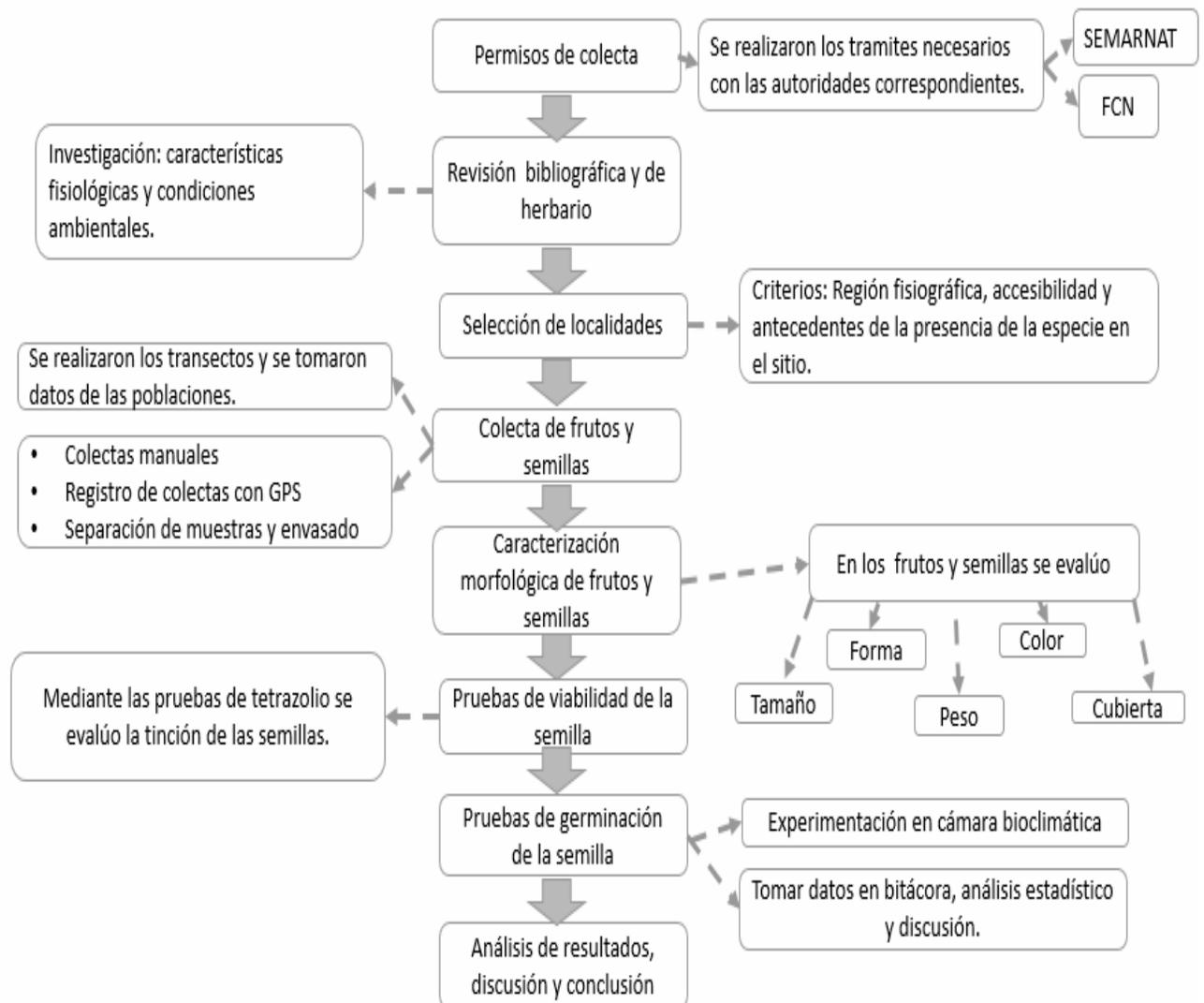


Figura 4. Diagrama de flujo de los procedimientos que se siguieron durante el trabajo de investigación.

## 8.2. Revisión Bibliográfica

Se revisaron artículos científicos los cuales se obtuvieron de las siguientes fuentes: Google académico, Pubmed, Scopus, Science Direct y Dialnet, se usaron palabras clave como “*Gentiana spathacea*”, “fitoquímica”, “propagación” y “Hielera”, con diferentes combinaciones, se hizo una selección de los artículos, para documentar el hábitat, descripción botánica, fisiología, taxonomía, trabajos etnobotánicos, fitoquímica, farmacología, actividad biológica y propagación de la especie.

## 8.3. Revisión de herbario

Se llevó a cabo una revisión de ejemplares en el herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX) para recopilar información sobre la distribución de la especie en el estado de Querétaro, época de floración y fructificación, hábitat y fechas de colectas. Esta información fue necesaria para conocer los sitios de colecta del material y para determinar las condiciones de los experimentos (Anexo 1 y 2)

## 8.4. Área de estudio

Se seleccionaron dos localidades (Figura 5), utilizando los siguientes criterios: 1) Región fisiográfica y 2) Accesibilidad a los sitios de colecta. Estos dos sitios fueron:

- La Sierra El Doctor que se localiza en el Municipio Cadereyta de Montes, Estado de Querétaro, México y se encuentra en las coordenadas longitud  $99^{\circ} 58' 80''$  O y latitud  $20^{\circ} 85' 11''$  N, se encuentra a una altura de 2700 msnm. La vegetación predominante es el Bosque de Quercus.
- Bosque de Tenasda (Barrio de San Ildefonso) que se localiza en el Municipio de Amealco de Bonfil, Estado de Querétaro, México y se encuentra en las coordenadas GPS longitud  $99^{\circ} 57' 49''$  O y latitud  $20^{\circ} 55' 60''$  N, se encuentra a una altura de 2528 msnm. La vegetación predominante es el Bosque de Quercus-Pinus.

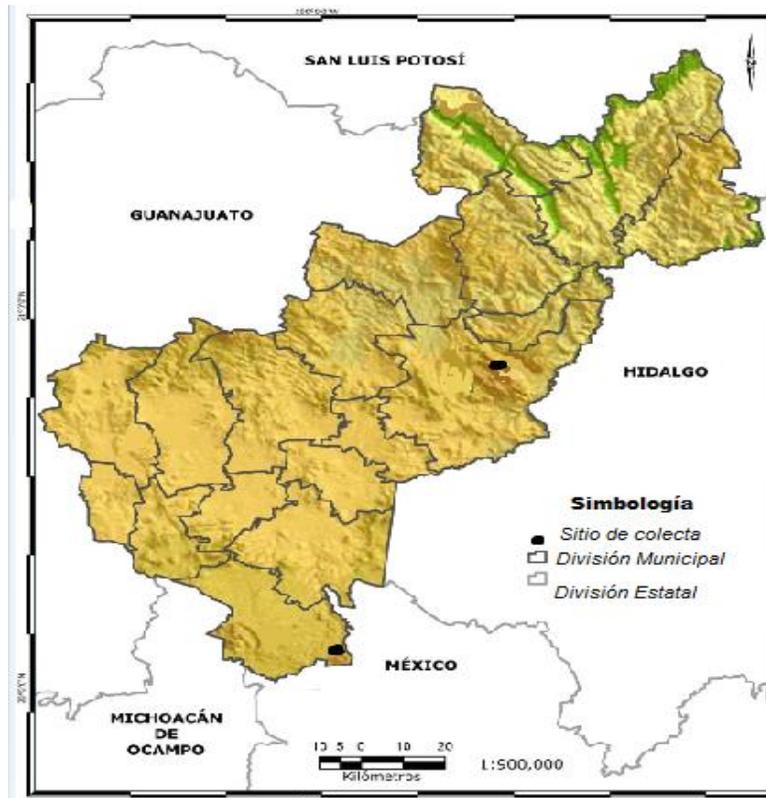


Figura 5. Sitios de colecta, Sierra de El Doctor, Cadereyta de Montes y Tenasda, Amealco de Bonfil, Querétaro.

### 8.5. Modo de colecta y almacenamiento

En las localidades seleccionadas, se hicieron 10 transectos de 2 X 50m. Únicamente se colectaron 15 frutos por localidad en diferentes estados de maduración para la caracterización de las semillas y los experimentos de viabilidad y germinación. Al momento de la colecta se tomaron los siguientes datos: coordenadas (con GPS Garmin Oregon 700), localidad, altitud, fecha y características del hábitat (vegetación, suelo, algún tipo de interacción ecológica). Se etiquetó cada muestra con los datos tomados y estas se conservaron en bolsas de papel estraza. Una vez en laboratorio las semillas se separaron del fruto y se colocaron en frascos de vidrio con sílica gel, se almacenaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente (entre 25°C y 30°C).

## 8.6. Caracterización de frutos y semillas

Para la caracterización de los frutos, se midió su largo y ancho usando el vernier (calibrador digital H-7352), se midieron en total 85 frutos, 55 *in situ* y 30 *ex situ*. Posteriormente, la muestra de los 30 frutos se pesó utilizando la balanza analítica (OHARUS AVENTURER H-5276), estos se clasificaron de acuerdo a su color utilizando las tablas de Munsell (2011) y por último se hizo una descripción de su forma, cubierta y textura utilizando el Glosario botánico (Moreno 1984) y el diccionario Botánico (Font-Quer 2000), con la información obtenida se clasificó el grado de maduración.

Para la caracterización de las semillas, se usaron frutos de las dos localidades. Debido al tamaño muy pequeño de las semillas (Figura 6), no fue posible utilizar el vernier para obtener sus medidas individuales, por lo que fue necesario medirlos con la ayuda del estereoscopio Leica S9i, obteniendo información de 40 semillas. Las medidas incluyeron 1) semilla completa incluyendo el ala y 2) el embrión.

Por otro lado los protocolos establecidos para la caracterización de semillas con fines agronómicos indican que se deben pesar entre 100 o más semillas por repetición (ISTA, 2016). Sin embargo, debido a que las semillas de *Gentiana spathacea* son muy pequeñas se pesaron 200 semillas por repetición, usando una mezcla con diferentes grados de maduración. Se realizaron 30 repeticiones utilizando la balanza analítica (OHARUS AVENTURER H-5276) después se obtuvo un promedio. Para describir el color de la testa se utilizó las tablas de Munsell (2011), haciendo una clasificación de semilla por color. La forma, cubierta y textura se describieron, usando el Glosario Botánico (Moreno 1984) y el diccionario botánico (Font-Quer., 2000). Con la información obtenida se caracterizó y clasificó el grado de maduración.

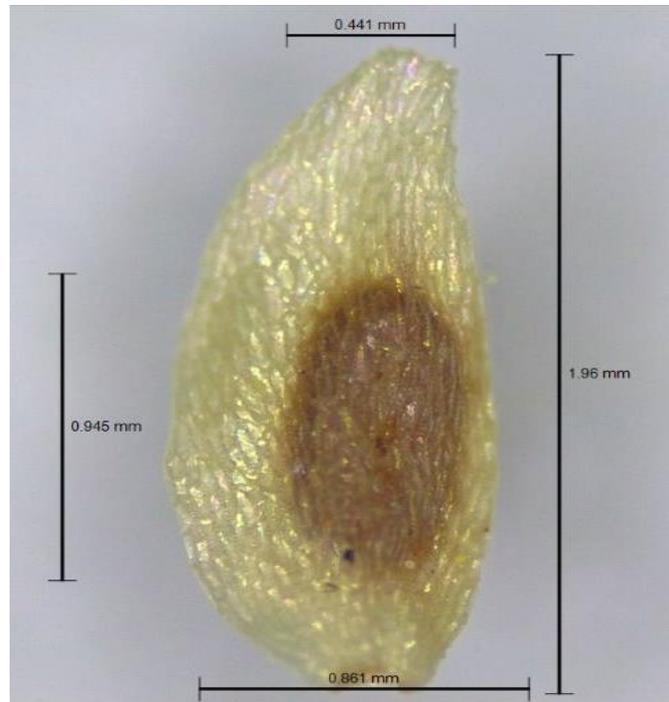


Figura 6. Ejemplo de información de la forma en que se tomaron las medidas la semilla completa y el embrión a través del estereoscopio Leica 9.

#### 8.7. Determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas

Se llevó a cabo la prueba de viabilidad con tetrazolio (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio). Se efectuaron 3 ensayos (E), con una sola concentración de la solución de tetrazolio [C] = 1%, con una temperatura constante  $T = 30^{\circ}\text{C}$  y con diferentes tiempos de exposición ( $T_i$ ); los ensayos fueron los siguientes:

E1) [C] = 1%,  $T = 30^{\circ}\text{C}$  y  $T_i$  (48 h)

E2) [C] = 1%,  $T = 30^{\circ}\text{C}$  y  $T_i$  (72 h)

E3) [C] = 1%,  $T = 30^{\circ}\text{C}$  y  $T_i$  (96h)

Cada ensayo (tratamiento) tuvo dos repeticiones con 100 semillas cada uno. Se relacionó el color, el tamaño y la transparencia de las semillas con el porcentaje de viabilidad (ISTA., 2016).

#### 8.8. Definición de las condiciones ambientales óptimas para la germinación de las semillas

Se efectuó una investigación en la que se analizó los factores climáticos de cada localidad (puntos de colecta) a través de las estaciones meteorológicas más cercanas (CONAGUA 2009). El factor principal fue la temperatura, y una vez recopilada la información, se generó una tabla comparativa (Anexo 3), estos datos nos ayudaron a seleccionar los intervalos de temperatura para el experimento.

Para comprobar la hipótesis se llevó a cabo un diseño experimental de tipo multifactorial con 42 unidades muestrales (semillas), en 5 unidades experimentales (Caja Petri). Las unidades experimental se sometió en un tratamiento con dos niveles, el primer nivel fue el de la temperatura, este constó de 3 diferentes temperaturas: 10°C, 20°C y 30°C; el segundo nivel fue el de fotoperiodo, con dos condiciones: 1) 12/12 horas luz-oscuridad y 2) 24 horas de oscuridad. La humedad relativa se mantuvo entre 40 a 60% y se mantuvo a saturación el medio o sustrato (pads de algodón) durante todo el experimento (Figura 7).

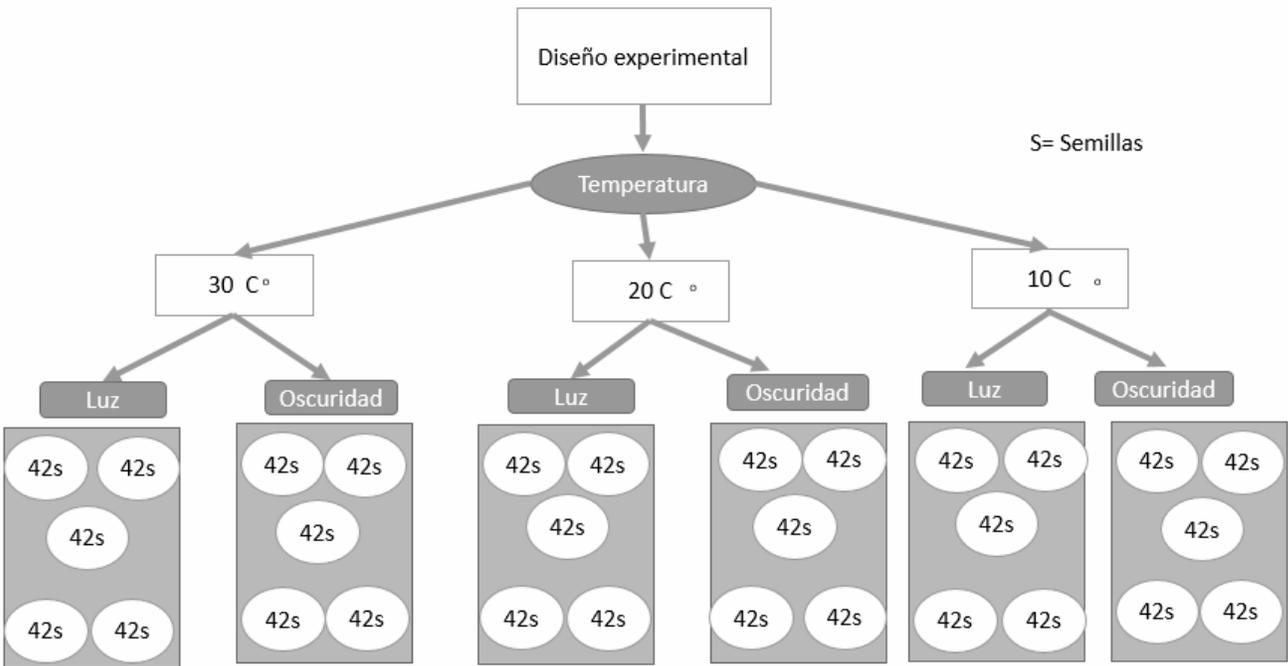


Figura 7. Esquema del diseño experimental.

## 8.9. Análisis estadísticos

Se analizó el efecto de la luz y de la temperatura de forma independiente y posteriormente se analizó el efecto de los dos factores (Luz\*Temperatura) en conjunto, para determinar si hay diferencias significativas entre los factores ambientales, esto se hizo a través de un ANOVA factorial, en el programa de JMP (versión 2.0 2008). También se hizo una comparación entre tratamientos sobre la velocidad de germinación, esto se analizó con un ANOVA en Excel.

## 9. Resultados

### 9.1. Caracterización de frutos

En cuanto al tamaño, los 85 frutos medidos presentaron un promedio de 20.89+-5.13 mm y el ancho de 7.17+-1.9 mm (un intervalo de 5.47-32.18 mm de largo y de 2.16-10.14 mm de ancho) (Anexo 4). En cuanto al peso, los 30 frutos presentaron un promedio de peso de 0.045+-0.014g (un intervalo de 0.02-0.50 g) (Anexo 5). En referencia a su color, los 85 frutos mostraron diferentes tonalidades que iban desde verde al marrón con las siguientes claves 2.5GY 8/4, 2.5GY 8/6, 2.5Y 8/8, 5Y 8/2, 7.5 YR 6/6 y 7.5 YR 7/6 (Munsell 2011) (Anexo 4). En cuanto a sus características morfológicas el fruto es una cápsula elíptica alargada con dehiscencia septicida apical, el ápice termina en dos espirales pequeños, tiene una textura rugosa, presenta dos carpelos y dos lóculos (Figura 8), presenta corola persistente de color azul pálido, tiene una textura papirácea y presenta de 4 a 6 lóbulos bicúspidados (Figura 9).

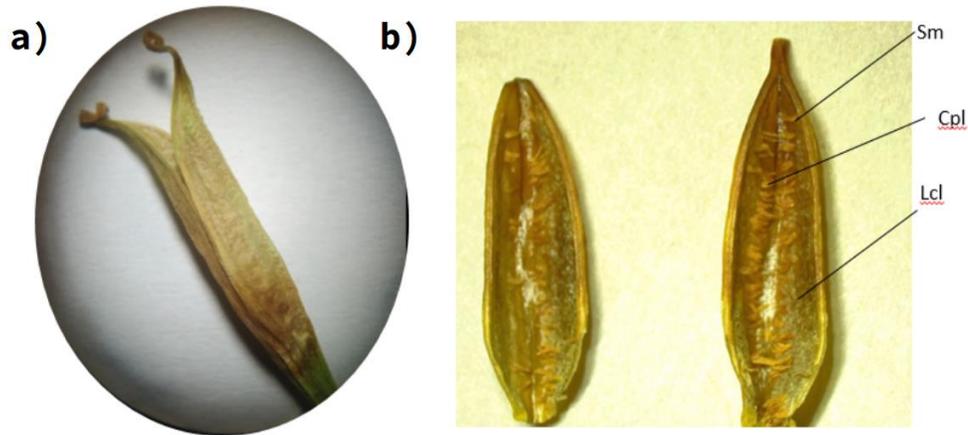


Figura 8. Partes del fruto de *Gentiana spathacea*, a) cápsula elíptica alargada con una dehiscencia septicida apical, se muestra el ápice en espiral; b) corte longitudinal de la cápsula, el acomodo de las semillas, número de lóculos y carpelos Sm=semillas, Cpl=Carpelo y Lcl= lóculo.



Figura 9. Fruto mostrando corola persistente de 4-6 lóbulos bicúspidados.

## 9.2. Caracterización de las semillas

Las características de las semillas permiten distinguir fácilmente el embrión y el ala. Las semillas (con embrión y ala) tuvieron un promedio de  $1.95 \pm 0.28$  mm largo y de

0.65+-0.10 mm ancho y presentaron un intervalo de 1.46-3.20 mm largo y de 0.44-0.91 mm ancho. El embrión con un promedio de 0.98 +- 0.20 mm de largo y 0.36+-0.12 mm de ancho y presentó un intervalo de 0.74-1.22 mm de largo y 0.24-0.74 mm de ancho (Anexo 6). En cuanto al peso, 200 semillas en promedio pesan 0.0098 g, una semilla pesa en promedio 0.00004915 g. Por lo tanto en un 1 g existe un aproximado de 20408.16 semillas. La coloración de las alas de las semillas es translúcida con tonalidades que van de verdes a amarillas (2.5GY 7/8, 7.5 YR 8/8, 10 Yr 6/8, 10 Yr 7/8 y 10 Yr 8/8), mientras que el embrión presentó tonalidades de beige a marrones o guinda determinados con las tablas de Munsell (2011) (2.5 GY 4/8, 2.5 GY 6/8, 2.5 GY 8/8, 2.5 GY 10/8, 5 YR 8/2, 5 YR 8/4, 5 YR 5/4, 5 YR 5/6, 5 YR 5/8, 5 YR 4/4, 5 YR 4/6 y 5 YR 4/8) (Anexo 6). Las semillas tienen forma de ovoide a piriforme, son aladas con textura escariosa y reticulada (Figura 10).

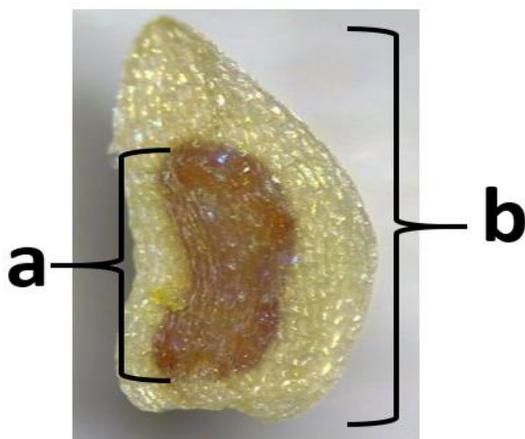


Figura 10. Semilla de *Gentiana spathacea*, que muestra la forma piriforme, junto con el ala translúcida de textura reticulada. a) Embrión b) ala de la semilla.

### 9.3. Determinación del porcentaje de viabilidad de las semillas

La semilla se consideró viable cuando el embrión presentaba una coloración rojo oscuro (Figura 11). En las pruebas de viabilidad se obtuvo un 49% de tinción en el primer ensayo (T1= 48h), un 71% en el segundo ensayo (T2=72h) y el 89% de en el tercer ensayo (T3=92h) (Figura 12). Al revisar las semillas en el estereoscopio, se observó que hay dos grupos, grupo 1 son las semillas de menor tamaño (0.10-0.32 mm de ancho y 0.30-0.79 mm de largo) las cuales son translúcidas al observarse en estereoscopio y no presentaron ninguna tinción. Las del grupo 2 eran de mayor

tamaño de embrión, con 0.33-0.78 mm de ancho y 0.80-1.30 mm de largo las cuales no permitieron el paso del haz de luz del estereoscopio y presentaban tinción (Figura 13).



Figura 11. Embrión teñido con las medidas de largo y ancho.

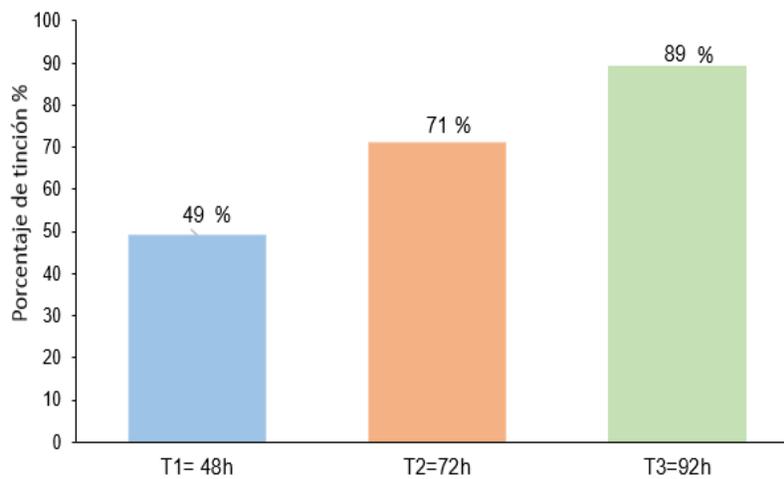


Figura 12. Gráfica comparativa de los ensayos de viabilidad de las semillas de *Gentiana spathacea*.

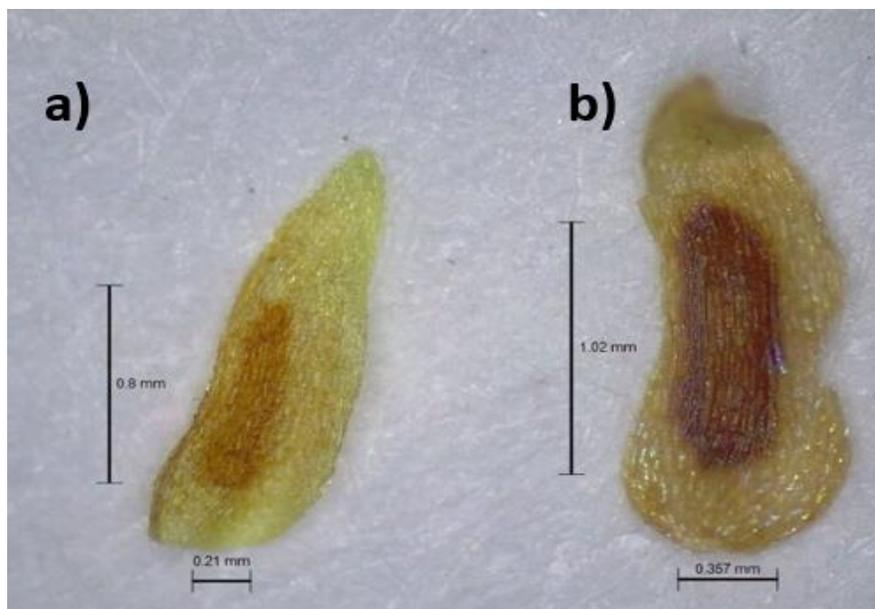


Figura 13. Diferencias de las semillas del grupo 1 y 2. a) Semilla del grupo 1 sin tinción b) semilla del grupo 2 con tinción.

#### 9.4. Condiciones ambientales óptimas para la germinación de las semillas.

##### 9.4.1. Porcentaje y tasa de germinación.

La prueba de ANOVA factorial nos mostró que no hay una diferencia significativa entre los tratamientos (T1, T2, T3) con el factor de luz y la interacción entre luz y temperatura, mientras que si hubo una diferencia significativa con el factor de temperatura (Cuadro 1).

	GL	CHISQUARE	P
<b>LUZ</b>	1	1.2083637	0.2717
<b>TEMPERATURA</b>	2	682.1032	<.0001*
<b>LUZ*TEMPERATURA</b>	2	0.6643575	0.7174

Cuadro 1. Tabla de comparativa

Posteriormente se analizó la diferencia entre las tres temperaturas, se encontró que hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos T1 (10°C), T2 (20°C) y T3 (30°C), esta diferencia resultó menor entre la T3 y T2, pero sigue siendo significativa. El tratamiento con mayor porcentaje de semillas germinadas fue el T2 con una T de 20°C (Figura 14).

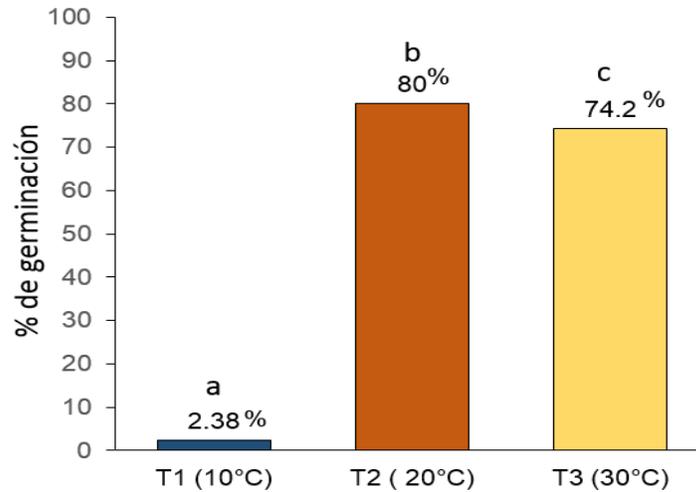


Figura 14. Gráfica comparativa entre tratamientos.

Las semillas comenzaron a emerger a partir del día 3, después de los 8 días se tenía más del 60% de germinación (Figura 15). En la tasa de germinación no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos T2 (20°C) y T3 (30°C), pero sí hubo una diferencia significativa entre el tratamiento T1 (10°C) con el T2 (20°C) y T3 (30°C) (Cuadro 2). En el tratamiento 3 comenzó la germinación a los tres días.

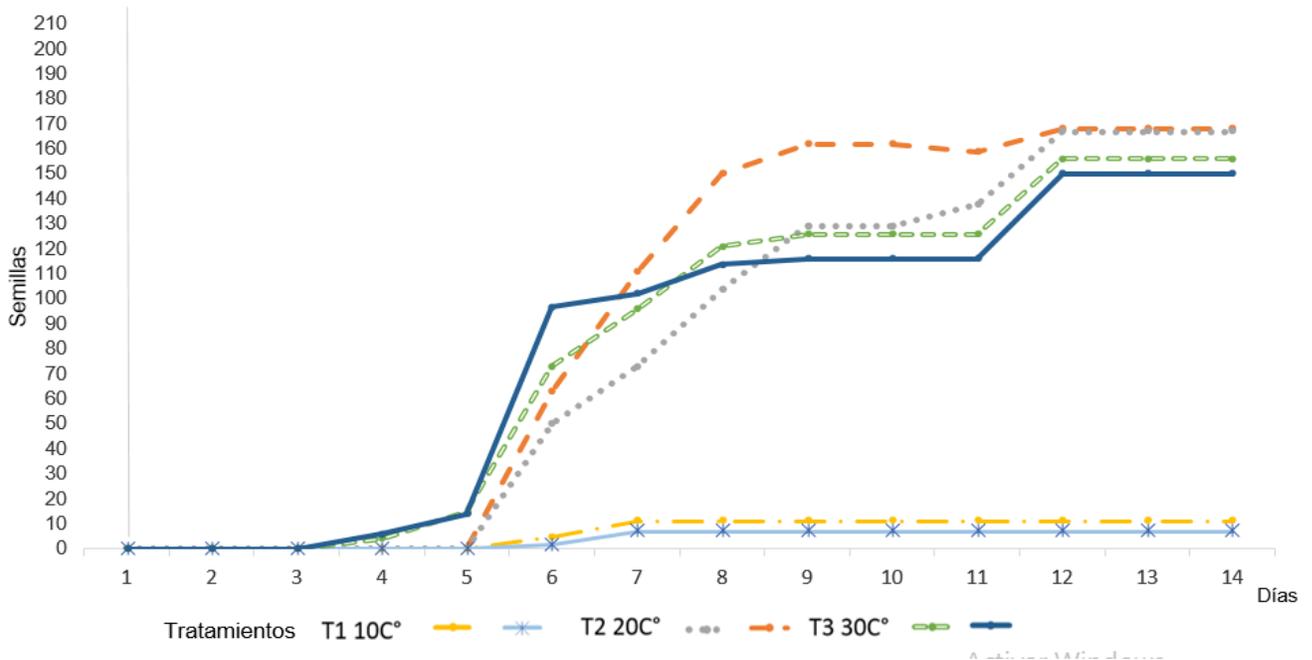


Figura 15. Gráfica comparativa de las semillas germinadas y la velocidad de germinación entre los tratamientos.

T1	a
T2	b
T3	b

Cuadro 2. Diferencias significativas entre la tasa de germinación entre los tratamientos

## 10. Discusión

### 10.1. Caracterización de los frutos y las semillas

Se observó que existe un intervalo muy amplio en las medidas del fruto, tanto de ancho (2.16-10.14 mm) como de largo (5.47-32.18 mm), esto se puede deber a la diversidad genética de la especie o a las condiciones ambientales, a su vez se detectó que el tamaño no se encuentra relacionado con el estado de maduración de los frutos, debido a que todos los tamaños presentaron semillas viables. Por otro lado, sí se observó una relación entre la coloración y el estado de maduración, ya que los frutos con tonalidades guindas más oscuros (7.5 YR 6/6 y 7.5 YR 7/6) presentaron semillas viables, mientras los frutos de tonalidades verdes (2.5 GY 8/4 y 2.5 GY 8/6) no presentaron semillas viables. Además, los frutos que mostraron dehiscencia del ápice, tenían mayor número de semillas maduras y viables en comparación con los frutos que aún tenían el ápice cerrado, por lo que el color y la dehiscencia son indicadores agronómicos del estado de maduración en que se encuentran los frutos. En referencia a la información sobre el tamaño del fruto Villarreal-Quintanilla (1998), describió únicamente que es una cápsula elíptica, con un intervalo de 2-4 cm, estos resultados son diferentes a los de este estudio en el que se encontró que los frutos midieron un intervalo menor (0.54-3.21 cm), además el trabajo de Villarreal-Quintanilla (1998) no describe el estado de maduración, la forma del fruto ni el color del fruto.

En referencia a los resultados que se obtuvieron de las semillas, en el estudio se observó que los embriones presentan un intervalo de 0.24-0.74 mm de ancho y 0.74-1.22 mm de largo, con una variación estándar muy amplia, ya que las medidas fueron tomadas de las semillas tanto viables como inviables, ya que fueron tomadas

antes de relacionar el tamaño del embrión con el estado de maduración. A diferencia del fruto, en el caso de las semillas el tamaño sí se relaciona con la viabilidad, dado que las semillas con embriones de mayor tamaño (0.33 a 0.78 mm) fueron las que presentaron embriones viables. Villareal-Quintanilla (1998), no hace distinción entre el ala y el embrión, solo hace mención que miden de 1 a 2 mm de largo y son aladas, en contraste en este estudio se obtuvo un tamaño mayor de la semilla con ala (1.46-3.20 mm) que la que se había registrado. También se observó que una coloración marrón (5 YR 4/4) indicaba un estado de maduración mayor. Otra de las características identificada fue la ausencia o presencia de un embrión traslucido, característica que se pudo relacionar con la viabilidad, ya que se relacionó con los embriones traslucidos son inviables y los embriones no traslucidos son viables. Su forma ovoide a piriforme y su estructura con ala de las semillas nos indica una adaptación para ser dispersada por viento, lo cual es común encontrar en otras especies anuales del mismo hábitat (Rocchia *et al.*, 2013). Cabe señalar que no había registro sobre los factores indicadores de maduración de la semilla, hasta ahora.

#### 10.2. Viabilidad de la semilla.

En referencia a las pruebas de tetrazolio, el mayor porcentaje de tinción (89 %) en un periodo de 96 horas, con una temperatura constante de 30°C. Estas pruebas sirvieron para identificar en qué condiciones se obtenía mayor tinción, también ayudan a establecer y conocer las mejores condiciones de tinción. Cabe destacar, que las semillas no viables presentaron embriones pequeños (0.10-0.32 mm de ancho y 0.30-0.79 mm de largo) y translúcidos, mientras que las semillas viables tenían mayor tamaño de embrión (0.33-0.78 mm de ancho y 0.80-1.30 mm de largo) y no translúcidos. Debido a la observación de estas características fue posible distinguir una semilla viable de una semilla inviable, siendo la principal característica la translucidez de los embriones, esta información es valiosa para que sea factible su propagación y comercialización.

#### 10.3. Porcentaje y tasa de germinación.

El factor determinante para la germinación fue la temperatura, indicado por los resultados de la ANOVA que se realizó, también se mostró que la temperatura con mejores resultados de germinación fue 20°C (80 %). Se observó, que a menor temperatura (10°C) hay una inhibición de la germinación de la semilla, mientras que a mayor temperatura (30°C) hay una disminución de la germinación de la semilla (74.2 %). El factor no determinante fue el fotoperiodo, ya que los resultados evidencian que la especie no requiere de luz para germinar y no hay una diferencia significativa con la germinación en oscuridad, lo que la hace una planta fotoblástica neutra. También se observó que las semillas iniciaron su germinación a los 5 días de que fueron puestas en las condiciones ambientales controladas para su germinación, después de los 8 días se estabilizó la germinación y terminó a los 15 días de someterlas a diferentes condiciones ambientales, el periodo de germinación es muy corto. En la industria es de suma importancia el tiempo de germinación por la cuestión de recursos que se utilizan y que se necesita el producto en un tiempo determinado para cubrir la demanda, es por eso que *Gentiana spathacea*, puede ser una planta de alto potencial para ser cultivada ya que germina en un periodo corto de tiempo como se muestra en las gráficas de resultados. Este es el primer estudio que documenta los factores ambientales determinantes para la germinación de las semillas de *Gentiana spathacea*, esto se logró a través de un diseño experimental multifactorial.

En referencia a la hipótesis planteada, se mencionó que *Gentiana spathaceae* por ser una planta anual de los bosques de *Quercus-Pinus* no necesitaría de un tratamiento pregerminativo y su pico de germinación sería entre los 18°C y 20°C debido a la temperatura que registra su hábitat, los bosques templados. Por lo tanto la hipótesis planteada fue correcta, ya que no fue necesario la implementación de algún método pregerminativo, además el mayor porcentaje de germinación fue a los 20°C como se había planteado. Por lo que concluimos que las semillas son quiescentes y no se encuentran en latencia.

El tipo de sustrato, aparentemente no constituye un factor limitante para la germinación, ya que en las observaciones de los ejemplares de herbario, se muestra

una variedad amplia de tipos de suelo donde fueron colectados los ejemplares además, no presentaron dificultad al germinar en los pads de algodón en donde fueron colocadas para el experimento.

#### 10. 4. Problemática en la conservación y la importancia de la propagación.

La especie *Gentiana spathacea* se encuentra en listada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010) con categoría “Sujeta a protección especial”, debido a su uso medicinal, la creciente demanda en el mercado y a la pérdida de los hábitats donde se la ha llevado a pertenecer a dicha categoría. El estatus en donde se encuentra actualmente (DOF2010) difiere de los estudios llevados a cabo por Aguilar *et al.* (2020), ya que se menciona la categoría de la NOM-059-SEMARNAT-2001, en donde se encuentra como “amenazada”, una categoría mayor a la de sujeta a protección especial. Esto puede deberse a que en el estudio pretendían provocar mayor sensibilidad a la pérdida de la especie y lo que eso representaría en las comunidades que la utilizan.

Gracias a todo lo anterior, se determinó que la propagación sexual de *Gentiana spathacea* puede llevarse a cabo sin muchos recursos, siempre y cuando se pueda tener las herramientas para medir y determinar la transparencia, junto a controlar la variación de temperatura.

## **12. Protocolo de propagación**

Resultado del presente estudio se originó un protocolo de propagación, estos datos se complementaron con la información bibliográfica, el cual tiene el objetivo de servir como base para posteriormente cultivarla y comercializarla, teniendo en cuenta que aún se requieren pruebas en condiciones de campo fuera del laboratorio. Cabe mencionar que las sugerencias son condiciones recomendadas para adaptarse al invernadero.

## Protocolo de germinación de *Gentiana spathacea* Kunth

Nombre científico	<i>Gentiana spathacea</i> Kunth
Nombre común	Flor de Hielo, Yelera, Hielera, cola de tlacuache, Juana Mi Pila, Nochebuena, Flor del cielo raso del monte, Flor de güegüeche, Lebón retama, Yelhuetecapahtli o Cola de tlacuache, Juanilipili, Yelhuetecapahtli y Rã doni
Familia	Gentianaceae
Origen	México
Uso	Medicinal, para afecciones del sistema respiratorio y digestivo.
Caracteres diagnósticos	Hierva erguida de 40 cm a 1 m de altura. Las hojas son ovaladas y puntiagudas, pegadas al tallo. Las flores son azules o azul morado, de 2 a 2.5 cm de largo; con frecuencia son solitarias o pueden estar agrupadas en conjuntos terminales de las ramas. Los frutos son cápsulas elíptica, de 5.47-32.18 mm de largo y con dehiscencia apical, semillas menores a los 1.46 a 3.20 mm con alas.
Método de colecta	Con tijeras de poda, coleccionar en frascos con tapa o bolsas de papel estraza, los frutos.
Época de colecta	Para el estado de Querétaro es de Octubre a Marzo.

### Descripción de frutos y semillas

Frutos

Deben de ser de color marrón a guinda.



Semillas

Deben de no ser traslucidas. Medir entre 0.33-0.78 mm de ancho y 0.80-1.30 mm de largo y deben de ser de color marrón a guinda.



Almacenamiento	Los frutos y semillas se deben colocar en frascos pequeños (100 ml) con tapa. Es recomendable agregar un sobre de sílica gel al interior para mantener en buen estado las muestras. También es recomendable mantener los frascos en condiciones de sombra y a temperatura ambiente.
Tratamiento pre germinativo	No necesario
Condiciones para mejor tinción de la semilla	Tiempo de tinción: 96 horas Temperatura: 30°C Concentración: 1 %
Viabilidad de las semillas	Embrión con transparencia 0 % Embrión sin transparencia 89 %
<b>Método</b>	Se coloca en una caja petri cerrada
Sustrato	En laboratorio se utilizo pads de algodón. Para invernadero preferentemente usar como sustrato peat moss
Humedad Ambiental	de 40 a 60%
Fotoperiodo	12/12 Horas luz oscuridad
Riego	Saturación del medio
Temperatura	20°C
<b>Germinación</b>	
Inicio	5 días después de la siembra
Media	8 días después de la siembra

Termino

15 días después de la siembra

Porcentaje de  
germinación

80%

### 13. Conclusión

- El color y la dehiscencia son las características agronómicas que permite distinguir los frutos maduros.
- Las semillas viables presentan un tamaño entre 0.33-0.78 mm de ancho y 0.80-1.30 mm de largo, son de color marrón o guinda y no presentan transparencia del embrión.
- El factor determinante para la germinación de la especie es la temperatura.
- La temperatura en la que se obtiene mayor porcentaje de germinación es 20°C.
- Las semillas son quiescentes y fotoblasticas neutras.
- Los protocolos de propagación tienen repercusiones en el uso y conservación de una especie, son indispensables para mejorar las condiciones de las plantas amenazadas.

### 14. Literatura Citada

Aguilar-Hernández, A., Lugo-Ríos, I. y Vargas-Rivera, L. A. 2020. "La flor del hielo *Gentiana spathaceae* Kunth: uso medicinal en Hidalgo, México." *Herreriana*, Vol. 1, No. 2 pag. 34-35.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009 Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Monografías "Flor del hielo" UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=flor-hielo>

Cabrera-Luna, A. 2015. Plantas medicinales del estado de Querétaro, México; con base en ejemplares de herbario (Maestro en Ciencias-Recurso Bióticos). Universidad Autónoma de Querétaro.

Comisión Nacional del Agua. 2009. Servicio Meteorológico Nacional . Estaciones Climatológicas.

Dumroese-Kasten, R; Luna,T; Landis, T. D., editors. 2009. Nursery manual for native plants: A guide for tribal nurseries - Volume 1: Nursery management. Agriculture Handbook 730. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 302 p.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (2020) Biodiversidad mexicana. “¿Por qué se pierde la biodiversidad en México?” <https://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/porque>

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2001), Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo publicada 6 de marzo de 2002.

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010), Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010.

Enciclovida, Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) 2021, “Cola de tlacuache, *Gentiana spathaceae*”. <https://enciclovida.mx/especies/164207>

Font-Quer Pio. 2000. “Diccionario de botánica” Editorial: Ediciones Península.

García, A., Ramírez- Hernández, B. C.,Robles- Arellano,, G., Zañudo- Hernández, J., Salcedo- Rocha , A. L., y García-Alba V. J. E. (2012). “Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara.” *Desacatos*, 39: 29-44

- Gillett, J.M., 1957. "A revision of the North American species of *Gentianella* Moench". *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 44: 195-262.
- Guzmán, M.H., Díaz, H., Gonzales Ch. 2017. "Plantas medicinales, la realidad de una tradición ancestral" Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Informativo (1)
- Ho, T. N., Liu, S. W., (1993), "New combinations names and taxonomic notes on *Gentianella* (*Gentianaceae*) from south America and New Zealand". *Bull. nat. Hist. Lond. (Bot)* 23(2):61-65.
- Ilitis, H.H., (1965). "The genus *Gentianopsis* (*Gentianaceae*): transfers and phytogeographic comments". *Sida*, 2(2): 129-154.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies-Jr, F. T. y Geneve, R. L. 2011. *Plant propagation: principles and practices*. (8 Ed.). Prentice Hall. 915 pp.
- Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) (2014). Gobierno de México Boletines. "El INAH preserva 75 plantas medicinales en peligro de extinción" <https://inah.gob.mx/boletines/1678-el-inah-preserva-75-plantas-medicinales-en-peligro-de-extincion>.
- Martínez-Peña M.L., Díaz-Espinosa A.M. y Vargas O. 2012. *Protocolo de propagación de plantas hidrófilas y manejo de viveros para la rehabilitación ecológica de los parques ecológicos distritales de humedal*. Grupo de Restauración Ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente. Bogotá, D.C., Colombia. 184 p.
- Moreno Nancy. 1984. "Glosario Botánico Ilustrado". Inst. Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Compañía Editorial Continental SBN: 9682604346.
- Morales-Tellez 2019. "El romero, imprescindible en los ritos y ceremonias religiosas de los Hñähñus de Hidalgo", <http://www.cuexcomate.com/search/label/Lamiaceae>
- Póvoa, O., Monteiro, A., Vasconcelos, T., (2005). *Distribution and seed propagation of *Centaurium erythraea* Rafn. and *Gentiana lutea* L. (*Gentianaceae*)*. *Biología vegetal e agro-industrial Volumen 2* pp. 307-314.
- Pringle, J. S. 1977. *Taxonomy and distribution of *Gentiana* (*Gentianaceae*) in México and Central America*. I. Sect. *Pneumonanthe*. *Sida* 7: 174-217.

Reglas internacionales para el Análisis de las semillas, International Seed Testing Association (ISTA) 2016. pp.151-156

Rocciaa, B., Preidikmanb, S., Estradab, C. y Massab, J. 2013. "Estudio Del "Vuelo" De Semillas Autorrotantes" Mecánica Computacional Vol XXXII, pp. 1481-1500.

Rodríguez-Servín, J., Castro-Lara, D. y Bye-Boettler, R. 2010. Protocolo de germinación de dos especies de quelites: *Crotalaria pumila* "Chepil" y *Porophyllum ruderale* var. *macrocephalum* "Pápalo". Universidad Nacional Autónoma de México.

Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., Serrano, V., Pacheco, S., (1999) "Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders" *Phytomedicine* 6 (5): 367-371.

Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., Gutiérrez, M. D., (2000). Smooth Muscle Relaxing Activity of Gentiopicroside Isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta Med* 2000; 66(8): 765-767 DOI: 10.1055/s-2000-9774

Rojas, A., Mendoza S., Moreno, J., Arellano, R.O. (2003) "Extracts from plants used in mexican traditional medicine activate Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes" *Phytomedicine* 10(5): 416-421

Salazar, Salazar. T., (1945) "Análisis de la planta denominada *Gentiana apathaceae*" Repositorio de la Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela nacional de Ciencias Químicas.

Struwe, L., Albert, A. V. (2002) "Gentianaceae systics and Natural History" (1 ed.) Cambridge University press.

Villarreal-Quintanilla, J. Á. (1996). Una nueva especie de *Gentiana* (Gentianaceae) para el oeste de México. *Acta Botánica Mexicana*, (34): 49 – 51. ISSN: 0187-7151.

Villarreal-Quintanilla, J. Á (1998). Flora del bajío y de regiones adyacentes fascículo 65 Gentianaceae. Departamento de Botánica Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Villarreal, J. A., Estrada, E., Jasso, D., (2009). El género *Gentiana* (Gentianaceae) en México. *Polibotánica* Núm. 27: 1-16, ISSN 1405-2768.

Yanga, J.L., Liua, L.L., Yan-Ping, S., (2010) "Phytochemicals and Biological Activities of Gentiana Species". Natural Product Communications 5 (4): 649 – 664.

## 15. Anexos

Anexo 1. Revisión de Herbario QMEX de *Gentiana spathacea* Kunth.  
Coordenadas y localidades.

ID	Fecha de colecta	Colectores	Estado	Municipio	Localidad	N	O	Altitud
1	02-nov-15	V. Serrano	Qro.	Amealco	El picacho, desviación a San Pedro Tenango. A 550 m del camino de San Pedro	*	*	2650 msnm
2	19-ene-91	V. Serrano	Qro.	Amealco	El picacho, 3 km al SE de Amealco, desviación a San Pedro Tenango.	*	*	2650 msnm
3	27-oct-16	Aguilar-Galván	Qro.	Qro.	1 km al E, de la comunidad del Charape	20o 47'32.28"	100o32'35.77"	2582msnm
4	29-mar-95	Hernandez M. et al	Qro.	San Juaquin	Km 16 de la carretera San Juaquin-Casa de las maquinas	*	*	2200 msnm
5	13-ene-93	Lopez García	Hidalgo	Metzquitlán	3 km al este del El Rodeo	*	*	1889 msnm
6	23-nov-04	Hernandez Magaña	Qro.	Cadereyta	El Zothi	20o49'8.9"	99o35'0.9"	2912 msnm
7	21-nov-11	Montaño Campos	Qro.	Qro.	La Joya, delegación Santa Rosa Jáuregui	20o49'25.5"	100o33'05.5"	2600msnm
8	13-nov-07	R. Chávez, Hernández-Oria, L. Torres y E. Sánchez	Qro.	Qro.	La Joya-La Barreta	20o48'57.8"	100o32'15.6"	2532msnm
9	11-nov-13	Andrade Loarca y Trejo Gonzales	Qro.	San Juaquin	Pinalito y Altamirano, Sierra del doctor.	20o47'24.5"	49o34'25.8'	3015msnm
10	11-nov-13	J. Díaz	Qro.	San Juaquin	Entre Pinalito y Altamirano	20o47'24.5"	99o34'25.8'	3015 msnm
11	20-nov-83	Judith E. N. Reynoso	Edo.	Coyotepec	Sierra de Alcaparrosa	*	*	2600-2800 msnm
12	29-ene-00	Dominguez Sanchez y Rico Mancebo	Qro.	Amealco	Laguna de Servín en el km 8 de la carretera Amealco-Humilpan	*	*	2250 msnm
13	03-feb-93	Orozco H., Hernández M. y C. Orozco	Qro.	Cadereyta	Brecha Sn.Javier-Chavarrías	*	*	2700-2800msnm

Anexo 1. Revisión de Herbario QMEX de *Gentiana spathacea* Kunth.  
Coordenadas y localidades.

14	15-mar-12	Mahinda Martínez	Guanajuato.	Tierra Blanca	Cieneguillas, Las Adjuntas Km 27, cañada	20o57'39.6"	100o08'0"	2300 msnm
15	13-nov-90	Rubio Hiram	Qro.	Pinal de amoles	4-5 Km al S de An Gaspar	*	*	2720-2850 msnm
16	23-nov-04	Hernandez Magaña	Qro.	Cadereyta	El Zothí	20o49'8.9"	'99o35'0.9"	2912 msnm
17	27-sep-94	Orozco H., Hernández M. y C. Orozco	Qro.	Cadereyta	Brecha Sn.Javier-Chavarrías	*	*	2500-2600msnm
18	03-mar-94	s. Zamudio R.	Qro.	Cadereyta	km.19 carr. San Juaquín-La Mora, cerca de casa de maquinas.	*	*	1950 msnm
19	16-feb-05	Hernandez Magaña	Qro.	San Juaquin	Barrancas entre El Durazno y San Rafael	20o56'51.4 3"	99o31'29.6 4"	1879 msnm
20	24-feb-12	Mahinda Martínez	Guanajuato.	Tierra Blanca	Puerta el Madroño, Pinal del Zamorano ANP	20o57'13.8"	100o08'49.5"	2610 msnm
21	11-oct-87	Rzedowski	Qro.	Cadereyta	5 km al NW de El Doctor	*	*	2800 msnm
22	22-nov-12	Mrtinez Ramirez	Aguascalientes	San José de Gracia	Parte media de la barranca Juan Francisco	22o12'18.9"	102o37'35.2"	2588 msnm
23	08-nov-13	Ortiz Flores	Aguascalientes	San José de Gracia	Rancho Antrialgo, Barranca Jan Francisco a 4.6km al NW de la congoja	22o11'32.4"	102o35'33.3"	2476 msnm

Anexo 2. Revisión de Herbario QMEX de *Gentiana spathacea* Kunth. Información específica de los ejemplares.

ID	Meses floración	Fructificación	Habitat	Nombre Común	Usos	Observaciones generales
1	Noviembre	Noviembre	Bosque de encino muy perturbado. Área muy abierta.	Juana Mi Pila	Medicinal para la tos, se toma en te	las flores se observa que maduran de abajo hacia arriba, los botones tienen un largo 22.68 mm y ancho 5.78 mm; tiene frutos inmaduros
2	Enero	Enero	Bosque de encino, Madroño	Flor de Hielo	Medicinal para la tos	Foros unicamente en la parte superior, largo 32.82, ancho 9.81 ; presenta frutos en la parte inferior, largo 24.11, ancho 5.06, no presenta daño aparente, y por el tegido se puede observar la presencia de semillas, se encuentra cerrado . El ejemplar cuenta con semillas, 2.66 mm de largo, 0.74 de ancho.
3	Octubre	Sin	En la orrilla del camino, matorral subtropical.	Nochebuena	No presenta	se encontro junto con Verbesina orepola, Heterotheca leptoglusa y Buddlejas cordata. Ladera con exposición O, suelo grisáceo rocoso
4	Marzo	Marzo	Bosque con Fagáceas, cicadaceas, liliaceas, gramineas, asteraceas, vervenaceas y agavaceas principalmente.	no presenta	Planta con potencial ornamental	presenta flores y fruto, con un largo de 20.25mm, ancho de 7.82mm, el fruto se muestra abierto.
5	Enero	Enero	Bosque de Pinus, tecote-Quercus spp.	no presenta	No presenta	Suelos arenosos, profundos de color rojizo, topografía plana, exposición NE. Tnto las flores como los frutos inmaduros presenta daño considerado, posiblemente por algun insecto. Largo 29.28 mm y de ancho 10.28 mm
6	Noviembre	Noviembre	Bosque de Quercus	no presenta	No presenta	Las flores presentan un daño por insectos, presenta frutos inmaduros con un largo de 23.30mm y de ancho 3.17 mm
7	Noviembre	Sin	Vegetacion Secundaria de montaña	Nochebuena	No presenta	El ejemplar solo tiene flores
8	Noviembre	Sin	Bosque de Quercus	no presenta	No presenta	se menciona que es escasa en el habitat. Presenta un nivel bajo de herbivori. a
9	Noviembre	Sin	Bosque de encino, pino, junipero.	no presenta	No presenta	las flores solo se encuentran en la parte superior

Anexo 2. Revisión de Herbario QMEX de *Gentiana spathacea* Kunth. Información específica de los ejemplares.

10	Noviembre	Sin	Bosque de Quercus	no presenta	No presenta	Presenta un nivel menor de daño por alguna enfermedad (patogeno)
11	Noviembre	Sin	Matorral y bosque de Quercus	no presenta	No presenta	las flores muestran daño possiblemnete de un insecto.
12	Enero	Enero	Bosque de encino y pino	no presenta	No presenta	Presenta daño tanto en las flores como en los frutos po alguna enfermedad, los frutos hay maduros e inmaduros, tiene un largo de 17.14, 11.90, 16.27, 20.70, 22.98; de ancho 4.73, 4.19, 4.43, 5.04, 6.59 mm.
13	Febrero	Sin	Bosque de pinaceas, fagaceas, agavaceas, gramineas, leguminosas, asteraceas, gentianaceas y labiadas principalmente	no presenta	No presenta	Las flores presentan un daño por insectos y un nivel bajo por enfermedad.
14	Marzo	Marzo	Matorral de Dodonea, opuntia y Stenocereus	no presenta	No presenta	Presenta frutos maduros e inmaduros, con un largo de 20.09, 23.26, 21.08, 19.22; y de ancho 6.52, 4.35, 3.88, 7.31mm.
15	Noviembre	Sin	Bosque de pino encino, ladera de cerro, cañada.	no presenta	No presenta	Es escasa en la zona, la planta no presenta daños.
16	Noviembre	Noviembre	Bosque de Quercus	no presenta	No presenta	presenta flores y frutos, tanto maduros como inmaduros, con un largo de 15.39, 18.88, 18.22, 17.63 mm; ancho 4.59, 6.31, 4.97, 5.31 mm.
17	Septiembre	Sin	Bosque de pinaceas, fagaceas, agavaceas, gramineas, leguminosas, asteraceas, gentianaceas y labiadas principalmente	no presenta	No presenta	Muestra un nivel bajo de daño por insectos

Anexo 2. Revisión de Herbario QMEX de *Gentiana spathacea* Kunth. Información de los ejemplares

18	Marzo	Sin	Bosque de pinus greggi, Quercus spp.	no presenta	No presenta	Muestra un nivel bajo de daño por insectos
19	Febrero	Febrero	Bosque de Quercus	no presenta	No presenta	Fruto inmaduro de 16.40 mm y ancho de 5.70mm, presenta daño por insectos.
20	febrero	Sin	Bosque de encino alterado	no presenta	No presenta	No muestra ningun daño
21	Octubre	Sin	Ladera caliza con vegetación de bosque bajo de Garrya y Juniperus	no presenta	No presenta	Muestra un nivel muy bajo de daño por insectos
22	Noviembre	sin	Bosque de encino-pino	no presenta	No presenta	Daño mínimo por hervivoría
23	Noviembre	Noviembre	Bosque de encino-pino	no presenta	No presenta	Frutos inmaduros largo 20.66 y ancho de 7.11 mm, no presenta daños de ningún tipo.

Anexo 3. Tabla comparativa de las estaciones meteorológicas en los puntos de colecta promedio de 10 años. Estaciones meteorológicas CONAGUA.

Estación Meteorológica	Municipio	Latitud	Longitud	Altura	Temperatura C°			Humedad %			Precipitación	
					Max	Minima	Prom	Maxima	Mínima	Promedio	Prom (mm)	Máxima (mm)
22001	Amealco de Bonfil	20.1847	-100.1456	2,626	38C°	5C°	23 C°	16.9	0.1	96	55.88	120
22021	Cadereyta	20.6933	-99.8133	2,044	42C°	5C°	24.3C°	13	0.1	79.38	35.56	114.3

Anexo 4. Tabla de datos del fruto: tamaño y color.

Fruto	Color			Fruto	Color		
	Largo (mm)	Ancho (mm)	(Munsell)		Largo (mm)	Ancho (mm)	(Munsell)
1	18.54	9.11	2.5GY 8/4	24	21.29	7.31	2.5GY 8/4
2	14.54	7.05	2.5GY 8/6	25	14.22	8.46	2.5GY 8/6
3	16.35	8.22	2.5GY 8/4	26	23.93	8.13	2.5GY 8/6
4	13.81	8.22	2.5GY 8/4	27	25.94	7.44	2.5GY 8/6
5	19.66	9.23	2.5GY 8/4	28	25.94	7.44	2.5GY 8/6
6	20.68	9.05	2.5GY 8/6	29	31.34	8.65	2.5GY 8/4
7	14.23	7.75	2.5GY 8/6	30	31.86	8.11	2.5GY 8/6
8	20.51	6.55	2.5GY 8/4	31	25.03	9.91	2.5GY 8/4
9	18.26	8.88	2.5GY 8/6	32	23.83	7.68	2.5GY 8/6
10	22.08	8.01	2.5GY 8/4	33	25.7	7.96	2.5GY 8/4
11	25.34	9.06	2.5GY 8/4	34	15.05	6.07	2.5GY 8/6
12	22.13	7.55	2.5GY 8/6	35	28.05	7.12	2.5GY 8/4
13	32.18	6.91	2.5GY 8/4	36	28.33	7.86	2.5GY 8/6
14	22.84	6.23	2.5GY 8/4	37	21.46	9.08	2.5GY 8/4
15	26.04	7.44	2.5GY 8/4	38	25.42	8.45	2.5GY 8/4
16	20.38	8.41	2.5GY 8/6	39	27.52	8.63	2.5GY 8/4
17	26.79	8.12	2.5GY 8/4	40	23.99	7.15	2.5GY 8/6
18	23.29	9.14	2.5GY 8/4	41	21.66	8.4	2.5GY 8/6
19	18.14	9.07	2.5GY 8/6	42	25.42	8.82	2.5GY 8/4
20	16.95	8.02	2.5GY 8/4	43	21.27	8.4	2.5GY 8/6
21	23.66	7.56	2.5GY 8/6	44	19.02	8.15	2.5GY 8/4
22	20.48	8.23	2.5GY 8/4	45	26	7.015	2.5GY 8/6
23	21.16	9.21	2.5GY 8/4	46	25.8	7.83	2.5GY 8/6

Anexo 4. Tabla de datos del fruto: tamaño y color.

Fruto	Color			Fruto	Color		
	Largo (mm)	Ancho (mm)	(Munsell)		Largo (mm)	Ancho (mm)	(Munsell)
47	22.48	9.91	2.5GY 8/6	67	17.59	4.26	5Y 8/2
48	21.28	7.5	2.5GY 8/4	68	21.04	6.18	7.5YR7/6
49	23.76	8.21	2.5GY 8/6	69	19.9	4.45	2.5Y7/8
50	23.99	8.06	2.5GY 8/6	70	18.1	4.77	2.5Y 8/10
51	24.73	10.14	2.5GY 8/4	71	11.06	2.43	2.5Y8/8
52	26.81	7.61	2.5GY 8/4	72	12.59	2.16	2.5Y 8/6
53	21.18	7.71	2.5GY 8/4	73	21.02	4.26	2.5Y 8/6
54	21.64	6.6	2.5GY 8/4	74	21.94	5.54	2.5Y7/8
55	22.63	7.75	2.5GY 8/4	75	12.5	2.84	2.5Y8/8
56	20	7.64	2.5GY 8/6	76	15.56	3.23	5Y 8/2
57	18.7	6	2.5GY 8/6	77	16.71	2.88	7.5YR7/6
58	20.47	7.53	2.5GY 8/6	78	20.15	5.13	7.5 YR6/6
59	19.63	7.76	2.5GY 8/6	79	22.66	8.47	2.5Y8/8
60	17.48	7.44	2.5GY 8/6	80	25.05	7.04	7.5YR7/6
61	20.47	7.65	2.5GY 8/6	81	19.77	6.31	7.5YR7/6
62	19.7	9.78	2.5GY 8/4	82	25.08	7.28	7.5YR7/6
63	24.63	8.52	2.5GY 8/6	83	6.93	2.26	2.5Y 8/8
64	17.14	8.17	2.5GY 8/4	84	6.1	2.14	2.5Y 8/8
65	16.45	5.55	2.5GY 8/6	85	5.47	2.01	2.5Y 8/8
66	17.36	5.23	5Y 8/2				

Anexo 5. Tabla de el peso de los frutos

Fruto	Peso g	Fruto	Peso g
1	0.055	16	0.032
2	0.027	17	0.061
3	0.021	18	0.077
4	0.036	19	0.045
5	0.026	20	0.027
6	0.029	21	0.043
7	0.025	22	0.041
8	0.045	23	0.038
9	0.041	24	0.052
10	0.034	25	0.023
11	0.057	26	0.059
12	0.046	27	0.063
13	0.067	28	0.063
14	0.049	29	0.05
15	0.066	30	0.05

Anexo 6. Tabla del tamaño de la semilla (ala y embrión) .

Semilla	Ala		Embrión	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
1	1.97	0.625	1.07	0.318
2	1.78	0.531	0.886	0.295
4	1.98	0.621	1.04	0.336
5	2.05	0.604	0.92	0.285
6	1.89	0.781	0.85	0.344
7	1.64	0.736	0.985	0.444
8	2.28	0.78	0.986	0.416
9	2.28	0.79	1.07	0.416
10	1.98	0.625	0.972	0.318
11	2.03	0.699	0.886	0.456
12	1.78	0.531	1.14	0.295
13	1.9	0.829	0.998	0.375
14	2.1	0.575	0.96	0.305

Semilla	Ala		Embrión	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
15	1.65	0.5	0.744	0.374
16	1.74	0.598	1.98	0.34
17	1.98	0.61	0.85	0.336
18	1.89	0.781	1.2	0.306
19	1.93	0.682	0.89	0.326
20	1.97	0.683	0.89	0.341
21	2	0.747	0.92	0.385
22	2.05	0.604	1.02	0.285
23	1.9	0.679	0.985	0.341
24	1.64	0.736	1	0.741
25	1.89	0.741	0.87	0.318
26	1.46	0.626	0.895	0.309
27	1.75	0.677	0.817	0.242

Anexo 6. Tabla del tamaño de la semilla (ala y embrión) .

Semilla	Ala		Embrión	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
28	1.9	0.578	0.948	0.295
29	1.98	0.502	0.742	0.365
30	1.79	0.444	0.92	0.361
31	1.95	0.595	0.93	0.364
32	1.54	0.452	1.02	0.566
33	2.35	0.703	1.2	0.309
34	2.11	0.591	0.835	0.362
35	3.2	0.914	1.04	0.459
36	1.76	0.632	1.22	0.4
37	1.85	0.621	0.831	0.31
38	2.04	0.693	0.94	0.403
39	1.86	0.701	0.965	0.345
40	2.26	0.662	0.807	0.17

Anexo 7. Tabla de color de la semilla: ala y embrión, basado en las tablas de Musell (2011).

semilla	Ala	Embrión	semilla	Ala	Embrión
1	7.5YR 8/8	5YR 4/6	22	10YR 8/8	5YR 4/2
2	10YR 8/8	5YR 5/4	23	7.5YR 8/8	5YR 5/4
4	10YR 8/8	5YR 4/8	24	10 YR 6/8	5YR 5/6
5	2.5 GY 7/8	5YR 5/6	25	10YR 8/8	5YR 5/8
6	10YR 8/8	5YR 5/8	26	10YR 8/8	5YR 5/4
7	7.5YR 8/8	5YR 4/8	27	10YR 8/8	5YR 4/8
8	10YR 8/8	5 YR 5/4	28	7.5YR 8/8	5YR 5/4
9	10 YR 7/8	2.5GY 8/4	29	10 YR 6/8	5YR 4/8
10	10 YR 7/8	5YR 5/8	30	10YR 8/8	5YR 4/8
11	7.5YR 8/8	5YR 4/8	31	10YR 8/8	5YR 5/4
12	10 YR 7/8	5YR 4/4	32	10YR 8/8	5YR 4/8
13	7.5YR 8/8	5YR 5/6	33	7.5YR 8/8	5YR 4/8
14	7.5YR 8/8	5YR 4/2	34	7.5YR 8/8	5YR 4/6
15	7.5YR 8/8	5YR 5/8	35	10 YR 6/8	5YR 4/2
16	10YR 8/8	5YR 4/2	36	10 YR 6/8	5YR 5/4
17	10 YR 7/8	5YR 4/4	37	10 YR 7/8	5YR 5/6
18	7.5YR 8/8	5YR 4/6	38	7.5YR 8/8	5YR 5/8
19	10 YR 7/8	5YR 4/8	39	10 YR 7/8	5YR 4/4
20	10YR 8/8	5YR 4/2	40	2.5 GY 7/8	5YR 5/8
21	10 YR 7/8	5YR 5/8			