



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Potencial de conservación *ex situ* de semillas de especies de páramo

Manuela Calderón Hernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2019

Potencial de conservación *ex situ* de semillas de especies de páramo

Manuela Calderón Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias- Biología

Directora:

Luz Marina Melgarejo Muñoz. Ph.D.
Profesora titular, Universidad Nacional de Colombia

Codirector (a):

Laura Victoria Pérez Martínez. M.Sc. Bióloga

Línea de Investigación:

Fisiología de Semillas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2019

Agradecimientos

Gracias a Dios que ha guiado mi vida por el sendero de la ciencia y el estudio de la vida, y ha llenado mi ser de valor para estudiar y culminar esta maestría. Especial agradecimiento al Jardín Botánico de Bogotá por la financiación de la investigación, a la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá por ser el centro de mi formación profesional y a cada uno de los profesores que con su amor y conocimiento me enseñaron y abrieron nuevas puertas de pensamiento. A mi directora Luz Marina Melgarejo y Co-directora Laura Pérez mujeres brillantes que cuentan con mi más profunda admiración por apoyar mi idea de investigación y gracias a su acompañamiento y trabajo hacer de esa idea una realidad. A mis compañeros de trabajo y amigos Carolina Mancipe y Carlos Suárez quienes aportaron con su trabajo y experiencia en diferentes etapas de esta investigación. A Ana Milena Torres por su apoyo operativo en la toma de datos. A mi familia y amigos por brindarme su apoyo y amor incondicional. Mil y mil gracias a las instituciones y personas nombradas y a todas aquellas que no nombro pero que me acompañaron, alentaron y participaron en la realización de esta investigación.

Resumen

El páramo es un ecosistema de alta montaña que alberga una alta diversidad de endemismos y servicios ecosistémicos, pero que paralelamente se encuentra sometido a fuertes presiones antropogénicas. Los Bancos de semillas nacen como una estrategia de conservación *ex situ* que permite salvaguardar la diversidad en forma de semilla por largos periodos de tiempo. Sin embargo, para almacenar una especie de forma adecuada es necesario conocer su ecología reproductiva y tolerancia a la desecación. Con el fin de evaluar el potencial de conservación *ex situ* de las semillas de especies de páramo, nuestros objetivos fueron: evaluar la viabilidad y germinación de 17 especies de diversas familias del páramo; documentar la forma de romper la dormancia previamente documentada de seis especies y determinar la tolerancia a la desecación de 19 especies. Se realizó la descripción morfológica de las semillas, se evaluó la viabilidad por la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación cuyas técnicas fueron comparadas, se realizaron ensayos de germinación bajo condiciones de laboratorio a dos contenidos de humedad (semillas frescas, y al 5%), y para romper la dormancia se realizaron tratamientos adicionales de imbibición en giberelinas y escarificación de testa. El mejor método para evaluar la viabilidad fue por medio de tetrazolio ([1-1,5 %] TZ, 40 °C y 24 horas de exposición). Se identificó la presencia de dormancia física en tres especies y fisiológica en otras tres y se reporta el tratamiento adecuado para romperla. Se encontró un comportamiento ortodoxo en 16 especies e intermedia en tres. En conclusión las especies estudiadas presentan un gran potencial para ser conservadas en bancos de germoplasma lo que contribuye a la conservación de la diversidad de las especies nativas de zonas de páramo, con las cuales se pueden implementar protocolos de germinación para la propagación y reintroducción en programas de restauración.

Palabras clave: Bancos de semillas, conservación *ex situ*, dormancia, germinación, tolerancia a la desecación, viabilidad.

Abstract

The páramo is a high mountain ecosystem that harbors a high diversity of endemisms and ecosystem services, but at the same time it is subjected to strong anthropogenic pressures. Seed Banks are born as an *ex situ* conservation strategy that allows to safeguard diversity in the form of seed for long periods of time. However, to store a species properly, it is necessary to know about its reproductive ecology and desiccation tolerance. In order to evaluate the potential of *ex situ* conservation of seeds of páramo species, our objectives were: to evaluate the viability and germination requirements of 17 species of diverse families of the páramo; document the way to break the previously documented dormancy of six species and to determine the tolerance to desiccation of 19 species. The morphological description of the seeds was carried out, the viability was evaluated by means of the tetrazolium test and the germination test whose techniques were compared, germination tests were carried out under laboratory conditions at two moisture contents (fresh seeds, and 5%), and to break the dormancy, additional imbibition treatments in gibberellins and coat scarification were performed. The best method to evaluate the viability was by means of tetrazolium ([1-1.5%] TZ, 40 ° C and 24 hours of exposure). The presence of physical dormancy was identified in three species and physiological dormancy in three others and the appropriate treatment to break it is reported. Orthodox behavior was found in 16 species and intermediate behavior in three. In conclusion, the species studied have a great potential to be conserved in germplasm banks which contributes to the conservation of the diversity of the native species of páramo zones, with which germination protocols can be implemented for propagation and reintroduction in programs of restoration.

Keywords: Seed banks, *ex situ* conservation, dormancy, germination, desiccation tolerance, viability.

Contenido

| | Pág. |
|---|-----------|
| Resumen | IV |
| Lista de figuras..... | 9 |
| Lista de tablas | 11 |
| Introducción | 12 |
| PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | 14 |
| 1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES | 14 |
| El páramo..... | 14 |
| Los Bancos de Semillas | 16 |
| Bancos de semillas en Colombia..... | 19 |
| 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA..... | 20 |
| 4. HIPÓTESIS | 22 |
| 5. OBJETIVO GENERAL..... | 22 |
| 6. OBJETIVO ESPECÍFICOS | 22 |
| 7. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... | 22 |
| BIBLIOGRAFÍA | 23 |
| | |
| CAPÍTULO 1. Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio..... | 27 |
| RESUMEN | 27 |
| INTRODUCCIÓN | 28 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| <i>Colecta de material vegetal</i> | 30 |
| <i>Prueba de Tetrazolio</i> | 32 |
| <i>Prueba de germinación</i> | 33 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 34 |
| RESULTADOS..... | 34 |
| <i>Prueba de Tetrazolio</i> | 34 |
| <i>Prueba de germinación</i> | 39 |
| <i>Comparación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación</i> | 39 |
| DISCUSIÓN | 41 |
| Bibliografía | 46 |
| | |
| CAPÍTULO 2. Dormancia física y fisiológica en semillas de seis especies de plantas nativas de los páramos en Cundinamarca | 55 |

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 55 |
| INTRODUCCIÓN..... | 56 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 58 |
| <i>Colecta de material vegetal y descripción morfológica</i> | 58 |
| <i>Viabilidad de semillas y germinación</i> | 59 |
| <i>Tratamientos pre-germinativos</i> | 59 |
| <i>Análisis de datos</i> | 60 |
| RESULTADOS | 60 |
| <i>Descripción morfológica</i> | 60 |
| <i>Viabilidad de semillas y germinación</i> | 63 |
| DISCUSIÓN..... | 66 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 68 |
| | |
| CAPÍTULO 3. Potencial de conservación <i>ex situ</i> de semillas de 19 especies de páramo..... | 73 |
| RESUMEN..... | 73 |
| INTRODUCCIÓN..... | 74 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 76 |
| <i>Colecta de material vegetal y descripción morfológica</i> | 76 |
| <i>Pruebas de germinación y tolerancia a la desecación</i> | 76 |
| <i>Análisis de datos</i> | 78 |
| RESULTADOS | 80 |
| <i>Descripción morfológica</i> | 80 |
| <i>Pruebas de germinación y tolerancia a la desecación</i> | 80 |
| DISCUSIÓN..... | 85 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 89 |
| | |
| Consideración finales y Conclusiones generales | 97 |
| | |
| Anexos..... | 99 |
| Anexo 1. Artículo publicado “Evaluación de Viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio”..... | 99 |
| 99 | |
| Anexo 2. Registro fotográfico de la planta y la semilla de 20 especies de páramo. | 116 |

Lista de figuras

Pág.

Figura I. Nueva cartografía de los páramos de Colombia. Tomado de IAvH (2012) ¡Error!
Marcador no definido.

Figura 1.1. Resultados de la prueba de viabilidad con Tetrazolio en una especie por familia evaluada. Para cada especie se presenta la semilla, el embrión viable y el embrión no viable. **a., b., c.** *Puya* sp. nov. aff. *horrida* (Bromeliaceae). **d., e., f.** *E. grandiflora* (Asteraceae). **g., h., i.** *P. prostrata* (Ericaceae). **j., k., l.** *H. prostratum* (Hypericaceae). **m., n., ñ.** *U. myricoides* (Myrtaceae). **o., p., q.** *H. goudotiana* (Rosaceae). **r., s., t.** *X. spiculifera* (Salicaceae). **u., v., w.** *C. buxifolium* (Solanaceae). Escala = 1 mm.....35

Figura 1.2. Viabilidad por la prueba de Tetrazolio y de germinación de 17 especies altoandinas. Letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las pruebas de acuerdo con Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Las verticales indican el error estándar (n=4).....36

Figura 2.1. Morfología externa, interna (corte longitudinal) y embrión de las semillas de seis especies de plantas de páramo, respectivamente. **a., b., c.** *Espeletia summapacis*, **d., e., f.** *Espeletia killipii*, **g., h., i.** *Tibouchina grossa*, **j., k., l.** *Hesperomeles goudotiana*, **m., n., ñ.** *Brugmansia x candida*, **o., p., q.** *Bomarea multiflora*. Abreviaciones, Emb: embrión, End: Endospermo. Escala = 1 mm.....60

Figura 2.2. Porcentaje de germinación (PG) acumulado (\pm ES) y tiempo medio de germinación (TMG, líneas verticales) en semillas de seis especies nativas de páramo sembradas con tratamiento pre-germinativo según su tipo de dormancia; Control (-■-), imbibición en GA₃ [400 mg/ L] (-●-), corte de testa (-O-), surcos en la testa (-Δ-). Letras iguales muestra que no hay diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), letras minúsculas al final de la curva para el PG, y letras mayúsculas en la parte superior de las líneas verticales para el TMG.(n=4)653

Figura 3.1. Porcentaje de germinación medio en 19 especies de páramo a diferentes contenidos de humedad (Barra negra: CHI; barra gris: CHr al 5%). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en la especie entre el PG y el CHI, r de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Las líneas perpendiculares indican el error estándar ($n=4$).

..... 82

Figura 3.2. Tiempo medio de germinación (Días) en 19 especies de páramo a diferentes contenidos de humedad (Barra negra: CHI; barra gris: CHr al 5%). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en la especie entre el TMG y el CHI, r de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Las líneas perpendiculares indican el error estándar ($n=4$).

..... 84

Lista de tablas

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1.1 Listado de las especies de páramo evaluadas con sus respectivos lugares de recolecta y hábito de crecimiento. | 31 |
| Tabla 1.2. Condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba de viabilidad con tetrazolio. Se evaluó la concentración de tetrazolio TZ (0,1 %, 1 % y 1,5 %), el tiempo de exposición a la solución (24 y 48 h) y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. SE= Error estándar. (n=4). | 37 |
| Tabla 1.3. Tiempo medio de germinación (TMG) y variación del error estándar (SE) presentado en las pruebas de viabilidad por tetrazolio y germinación. * = diferencias significativas entre la prueba de germinación y tetrazolio de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). (n=4). | 40 |
| Tabla 1.4. Método y condiciones recomendadas para evaluar la viabilidad en 17 especies altoandinas. En la prueba de Tetrazolio se indica: la concentración del TZ, la temperatura, el tiempo de exposición y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. En germinación se indica: la temperatura día/noche, el fotoperiodo y la humedad relativa. | 43 |
| Tabla 2.1. Especies de páramo evaluadas con sus respectivos lugares de recolecta y hábito de crecimiento. | 58 |
| Tabla 2.2. Rasgos morfológicos en las semillas de seis especies nativas de páramo (n= 10). | 63 |
| Tabla 2.3. Porcentaje de viabilidad de semillas obtenido por la prueba de tetrazolio, y prueba de germinación 30 días después de siembra en medio estándar de germinación sin tratamiento pre-germinativo (control) con un fotoperiodo de 12 horas, y $20/10 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$. Medias seguidas por letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$) (n=4). | 64 |
| Tabla 3.1. Datos de colecta de las 19 especies de páramo estudiadas. | 788 |
| Tabla 3.2. Rasgos morfológicos y contenido de humedad inicial de 19 especies de páramo. (n=10). | 80 |
| Tabla 3.3. Clasificación según la tolerancia a la desecación de las semillas de 19 especies páramo. | 846 |

Introducción

El páramo es un ecosistema distribuido dentro de la zona húmeda de los Andes ecuatoriales entre 11° N y 8° S de latitud; principalmente en Venezuela, Colombia, Ecuador, el norte de Perú, con extensiones en Panamá y Costa Rica (Sklenář, Luteyn, Ulloa, Jorgensen, & Dillon, 2005). Son considerados islas biogeográficas de gran heterogeneidad ambiental por lo cual cuentan con una gran biodiversidad y endemismo (Cortés-Duque & Sarmiento, 2013). Su principal importancia biológica es la regulación de los ciclos hídricos, constituyendo así una importante reserva de agua para diferentes regiones de Suramérica (Sklenář et al., 2005).

Se estima que en los páramos de Colombia hay más de 4.700 especies de plantas que representan cerca del 17% de la diversidad florística del país, ubicada en apenas el 3% del territorio nacional (Marín & Parra, 2015). La presión antrópica, el cambio climático y la lenta recuperación después de un disturbio que presentan los páramos, amenazan su biodiversidad y por ende los servicios ecosistémicos que presta este ecosistema (Cortés-Duque & Sarmiento, 2013). Por esto, es importante emprender acciones en pro de la conservación de la diversidad natural orientadas a la implementación de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

Una de las estrategias de conservación *ex situ* más exitosa de la diversidad fitogenética a largo plazo, es el Banco de Semillas (de Viana, Mosiario, & Morandini, 2009; León-Lobos, Way, Aranda, & Lima-Junior, 2012). Esta estrategia se ha centrado principalmente en especies alimenticias y de cultivo. Menos del 1% de las especies almacenadas en los bancos de germoplasma corresponden a especies nativas (Rao et al., 2007). Ligado a esto, la información sobre la longevidad, las condiciones aptas de almacenamiento (según su tolerancia a la desecación), viabilidad y requerimientos de germinación de las especies silvestres nativas es muy escaso, información vital para establecer planes exitosos de conservación *ex situ* (Gold, León-Lobos, & Way, 2004; Hong & Ellis, 1995; Rao et al., 2007).

La tolerancia a la desecación y el contenido de humedad de las semillas varía con la especie. A su vez, el contenido de humedad dependerá de las condiciones climáticas en las que fue colectado el material y a las que fue sometida la planta madre durante el tiempo de formación de la semilla (efectos de la planta madre). De acuerdo a la tolerancia a la desecación, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, intermedias y recalcitrantes

(Nkang, Omokaro, Egbe, & Amanke, 2003). Para almacenar semillas en el Banco de semillas, es vital conocer qué tipo de semilla presenta cada especie, lo cual permite decidir bajo qué condiciones y aproximar el tiempo por el cual se pueden almacenar las semillas. Además, el conocimiento sobre calidad, tolerancia a la desecación y el comportamiento fisiológico al almacenamiento es importante no solo para la conservación, sino, para la planificación de estrategias de propagación en el mediano y largo plazo, como base para proyectos de restauración y para entender la ecología reproductiva de las poblaciones (Vieira & Silveira, 2010), lo cual incluye el reclutamiento, la formación de bancos de semillas naturales y la fenología reproductiva de la especie.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de conservación *ex situ* de semillas de especies de páramo mediante la estrategia de bancos de semillas, lo cual permitirá no solo identificar el método adecuado de almacenamiento para conservar las semillas, sino además entender parte de la ecología reproductiva de las especies.

El documento está estructurado de la siguiente forma: inicialmente se presenta un contexto general de la investigación, este incluye marco teórico, planteamiento del problema, objetivos e hipótesis. A continuación, cada objetivo específico se desarrolla en un capítulo con la estructura de artículo científico.

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

El páramo

Dentro de los ecosistemas de Colombia resalta el páramo, ya que en él convergen múltiples procesos sociales, económicos y ecológicos que sostienen a las comunidades de la alta montaña y además constituye una de las mayores fuentes hídricas para el País (Cabrera & Ramírez, 2014). Coincidir en una definición que abarque todo lo que es un páramo puede generar una gran controversia (Cabrera & Ramírez, 2014; Cortés-Duque & Sarmiento, 2013; Hofstede, Segarra, & Vásquez, 2003); sin embargo, en general, un páramo es un bioma neotropical, localizado entre el bosque alto andino y el límite inferior de las nieves perpetuas entre los 3.000 a 5.000 m.s.n.m (Cabrera & Ramírez, 2014; Sklenář et al., 2005). Lo que no genera controversia es el hecho de que los páramos son unos de los ecosistemas de alta montaña más ricos en el mundo, donde la mayoría de sus especies son endémicas, esto producto a que es el ecosistema más reciente de los Andes con menos de tres millones de años (Castaño, 2002), y a que las plantas se han tenido que adaptar a las condiciones extremas que lo caracterizan como baja presión del aire y baja temperatura, alta radiación ultravioleta, sequía fisiológica, variabilidad climática diaria y daño físico ocasionado por el granizo o algunos casos por nieve (Sklenář et al., 2005).

Si bien Colombia no es el único país que cuenta con páramos, ya que también se encuentran en Costa Rica, Perú, Venezuela, Ecuador y Panamá, Colombia cuenta con el

50% en cobertura de los páramos del mundo (Fig. I), ocupando un 3% del área continental del territorio nacional (Sarmiento, Cardenas, Sarmiento, & Zapata, 2013). Son numerosos los estudios que se han adelantado en los páramos en los últimos años, involucrando estudio de suelos, ecología y biodiversidad. Véase por ejemplo las publicaciones más recientes de Alzate-Guarín & Murillo-Serna (2016); Cabrera & Ramírez (2014); Castaño (2002); Cortés-Duque & Sarmiento (2013); Hofstede et al. (2003); Llambí et al. (2012); Mora & Vargas (2007); Pedraza-Peñalosa, Betancur, & Franco-Roselli (2004); Pérez-Martínez, Rodríguez, Melgarejo, & Vargas R, (2014); Sarmiento, Cadena, Sarmiento, & Zapata (2013); Sklenář et al. (2005).

A pesar de los avances, la presión antrópica, el cambio climático y la lenta recuperación después de un disturbio, amenazan la biodiversidad y por ende los servicios ecosistémicos que presta este ecosistema (Cortés-Duque & Sarmiento, 2013).

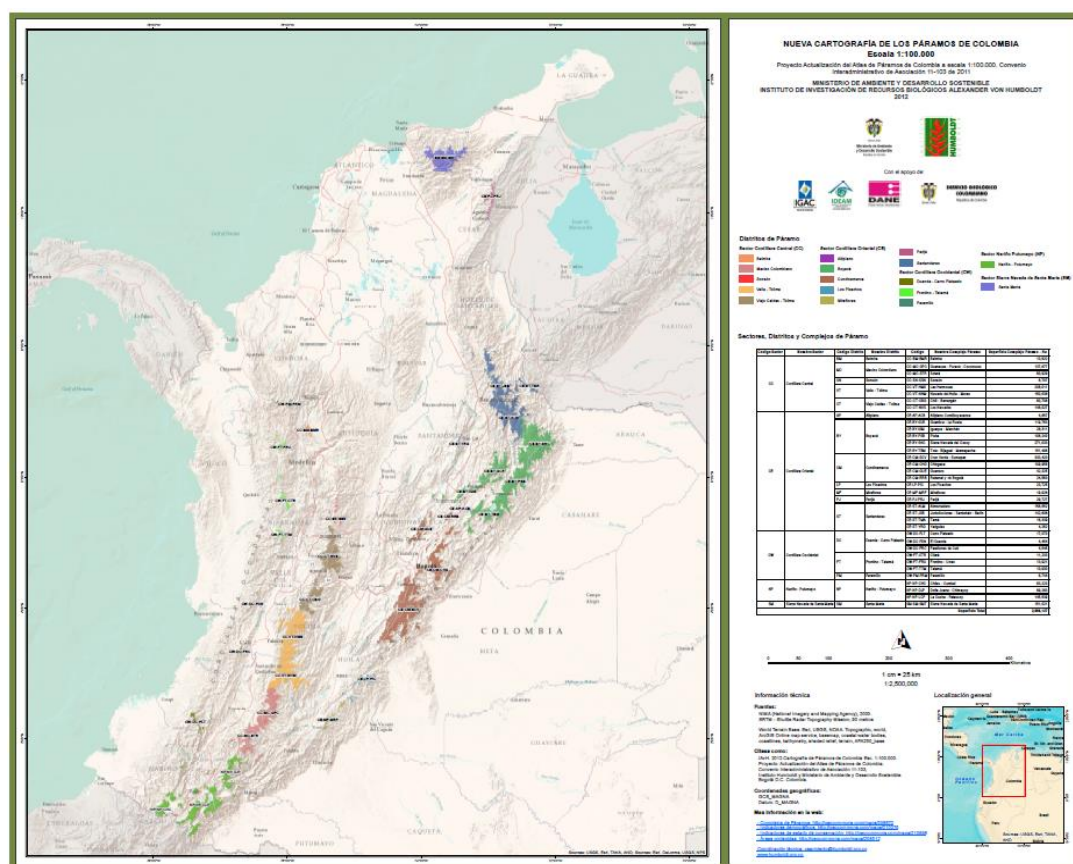


Figura I. Nueva cartografía de los páramos de Colombia. Tomado de IAvH (2012)

Por esto, es importante emprender acciones en pro de la conservación de la diversidad natural orientadas a la implementación de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* y a la restauración del ecosistema.

Los Bancos de Semillas *ex situ*

Los bancos de semillas hacen parte de las estrategias de conservación *ex situ*, la cual hace referencia a la conservación de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural (Rao et al., 2007). Los propósitos de las colecciones *ex situ* para cualquier especie que requiere conservación son (i) servir como soporte del germoplasma en las condiciones actuales de amenaza, (ii) preservar la diversidad genética y (iii) propagar el germoplasma para acciones *in situ* (Guerrant, Havens, Maunder, & Havens, 2004).

Los bancos de semillas representan una de las estrategias más costo-efectivas de la conservación, ya que en un poco espacio se pueden guardar millones de semillas de las especies que se pueden conservar. Esta conservación consiste en almacenar las semillas a bajos niveles de humedad y bajas temperaturas, siempre que la semilla lo tolere, con el fin de prolongar la viabilidad de las semillas, lo que permitirá tener el material almacenado por muchos años (Gold et al., 2004). Este método de almacenamiento es adecuado para una gran número de especies, aproximadamente el 88% de las plantas vasculares (Gold et al., 2004; Hong & Ellis, 1988); sin embargo, faltan muchos estudios para conocer el comportamiento de las semillas de la zona tropical.

Las semillas se clasifican de acuerdo a su tolerancia a la desecación en ortodoxas, intermedias y recalcitrantes (Magnitskiy & Plaza, 2007). Se consideran semillas ortodoxas aquellas que toleran una deshidratación hasta del 5% en el contenido de humedad debido a que la fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, resultado de la separación de funículos entre 40 y 50 días después de la polinización. En este periodo las semillas logran adquirir la tolerancia a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y potencial de almacenamiento (Nkang et al., 2003). Las semillas recalcitrantes no experimentan deshidratación en la planta madre, se dispersan en una condición húmeda y metabólicamente activa, por lo que pierden rápidamente la capacidad de

germinar al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (Kermode & Finch-Savage, 2002), por eso sólo pueden tolerar la deshidratación entre un 15% y 50% de contenido de humedad. Existen semillas con características intermedias entre ortodoxas y recalcitrantes y toleran la deshidratación entre un 10% y 12% de contenido de humedad (Daws, Garwood, & Pritchard, 2005; Hong & Ellis, 1988).

Para almacenar semillas, es vital conocer qué tipo de semilla según su tolerancia a la desecación presenta cada especie, esta información permite decidir bajo qué condiciones y durante cuánto tiempo se pueden almacenar. A continuación, se definen algunos procesos claves que son necesarios para determinar los métodos de almacenamiento de las semillas.

▪ **Contenido de Humedad**

Las semillas están compuestas por diferentes moléculas como grasas, proteínas, agua, entre otros. El contenido de humedad de la semilla (CHS) es la cantidad de agua presente en ella (Rao et al., 2007). Este factor es el más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran y permite, por medio del análisis de tolerancia a la desecación, determinar por cuánto tiempo y en qué condiciones se pueden almacenar las semillas en los Bancos de Germoplasma (Rao et al., 2007).

Para calcular el CHS se utilizan principalmente dos métodos: el secado en horno de circulación forzada o por medio de analizadores de humedad; ambos métodos utilizan el principio de pérdida de peso por secado. El CHS se calcula por medio de la siguiente fórmula donde, **CH (%)** es el contenido de humedad en porcentaje, **Pi** es el peso inicial de las semillas, **Pf** es el peso final de las semillas (ISTA, 2008).

$$CH(\%) = \frac{Pi - Pf}{Pi} * 100$$

▪ **Viabilidad**

La viabilidad de un lote de semillas, no dormantes, hace referencia a su capacidad de germinar y de originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables (Pérez & Pita, 2009; Ranal & Santana, 2006).

Es un parámetro importante para evaluar la habilidad de la colonización de las especies (Pywell et al., 2003) y por ende está ligado con el éxito o fracaso reproductivo de las poblaciones (Borza, Westerman, & Liebman, 2007). A su vez, es una medida vital de la calidad de las semillas que cobra especial importancia para el monitoreo de los cambios durante el almacenamiento como prerrequisito para asegurar el éxito de un programa de conservación *ex situ* (Godefroid, Van de Vyver, & Vanderborght, 2010; Guerrant et al., 2004); hace parte de las herramientas para la selección de especies para proyectos de restauración ya que especies que producen buena cantidad de semillas viables pueden propagarse masivamente en viveros por vía sexual.

Para evaluar la viabilidad se pueden realizar diferentes pruebas entre las que se encuentran la prueba de germinación, la prueba de tetrazolio o la prueba de punción o inspección en la cual un embrión blanco y rígido es clasificado como viable (Baskin & Baskin, 2014; Guerrant et al., 2004).

- **Germinación y dormancia**

Si una semilla es viable, y no presenta dormancia, germinará cuando se encuentre en condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura. Por esto, se acepta que la capacidad germinativa de un lote de semillas es un reflejo directo de su viabilidad (Rao et al., 2007).

La dormancia se da cuando una semilla no puede germinar, a pesar de contar con las condiciones adecuadas para hacerlo (Baskin & Baskin, 2014; Baskin & Baskin, 2004) Según Baskin & Baskin (2004), se pueden diferenciar cinco clases de dormancia: Dormancia fisiológica, es la más común en la naturaleza y se observa cuando el embrión presenta una alta proporción de ácido abscísico y bajos niveles de giberelinas. Dormancia morfológica, es cuando el embrión está diferenciado en órganos pero subdesarrollado en tamaño y necesita tiempo para crecer y madurar. Dormancia morfofisiológica, es una combinación entre la dormancia fisiológica y morfológica. Dormancia física, se presenta en semillas que tienen cubiertas seminales muy gruesas o impermeables que impiden la entrada de agua e intercambio gaseoso en la semilla. Dormancia combinada, que es una combinación de dormancia física y fisiológica. Conocer si una semilla presenta o no

dormancia es un factor clave que permitirá establecer las condiciones adecuadas para la germinación y reproducción de la especie.

Bancos de semillas en Colombia

Como ya se ha mencionado, Colombia es un país megadiverso que cuenta con cerca de 30.000 especies de plantas de diferentes hábitos de vida, que se ensamblan para conformar numerosos ecosistemas y brindar un sin número de servicios ecosistémicos y ambientales (Valencia, Lobo A., & Ligarreto, 2010). Lamentablemente, los servicios que nos brindan las plantas están en peligro y la tasa de extinción de especies es cada día mayor; se calcula que en los próximos cincuenta años se extinguirá la cuarta parte de las especies vegetales del mundo (Amaya-Espinel, Gómez, Amaya-Villarreal, Velásquez-Tibatá, & Renjifo, 2011).

Para evitar tal pérdida, el Gobierno Colombiano permitió la creación del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación para la Alimentación y la Agricultura (SBGNC), que apoyada con recursos públicos, es financiada para ser custodiada por AGROSAVIA, que cuenta con uno de los bancos de semillas agroalimentarias más importantes del país. También a nivel nacional, se destaca el Centro Internacional de Agricultura tropical CIAT que es apoyado por diferentes entidades y fundaciones nacionales e internacionales. Su objetivo es reducir el hambre y la pobreza y mejorar la nutrición humana en los trópicos mediante una investigación que aumente la eco-eficiencia en la agricultura. Dentro de sus estrategias se incluye Bancos de semillas agroalimentarias donde se conserva la colección mundial de yuca y especies relacionadas, frijol y forrajes tropicales (CIAT) .

Existen otros Bancos de semillas en Colombia que al igual que el CIAT y CORPOICA están asociados con agrobiodiversidad, especies forestales y ornamentales; sin embargo, esto demuestra el vacío existente en el estudio de las especies silvestres nativas de nuestro país. Es por esto que el Jardín Botánico de Bogotá es un pionero en la implementación de un Banco de semillas que cuenta con especies con algún grado de amenaza y/o de importancia ecológica con fines de conservación e implementación en programas de restauración y reintroducción principalmente de las especies alto andinas y zonas de páramo.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Diversas causas como el cambio climático, el crecimiento poblacional y la degradación de los ecosistemas, hacen que cada día disminuya la cobertura vegetal y por ende ocasionan la disminución o extinción de especies. Por este motivo es vital emprender acciones de conservación que incluyan tanto estrategias *in situ* como *ex situ* que garanticen la protección de la diversidad. Los bancos de semillas son una de las estrategias de conservación *ex situ* más efectivas a largo plazo ya que permiten almacenar las semillas de las plantas a bajos contenidos de humedad y temperatura por muchos años, siempre y cuando las semillas lo toleren. Para esto es vital conocer los requerimientos específicos de almacenamiento para cada una de las especies. Ya que los bancos de semillas han centrado sus esfuerzos en almacenar semillas agroalimentarias, es poco lo que se sabe sobre el almacenamiento de las semillas nativas silvestres, por eso actualmente para poder almacenar casi cualquier especie nativa de los ecosistemas colombianos se hace necesario primero identificar fuentes semilleras que permitan la obtención de semillas con buena viabilidad, para luego evaluar factores para determinar las condiciones adecuadas de almacenamiento. Así, aunque la estrategia de banco de semillas es de las más exitosas, la etapa inicial de adquisición de una especie que no cuente con información sobre su conservación, puede ser muy lenta en comparación con la rapidez en la pérdida de diversidad. Documentar cuál es el potencial de conservación *ex situ* de las semillas de páramos a través de los estudios de germinación y tolerancia a la desecación en las semillas, contribuye en gran medida a la conservación de las especies, ya que permite identificar métodos adecuados de almacenamiento y a su vez genera conocimiento sobre la historia de vida asociados a la reproducción de especies que pueden contribuir en la selección de especies para restauración y programas de conservación *in situ*.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA

Actualmente factores como la expansión de la frontera agrícola y ganadera, la sobreexplotación de los recursos naturales, la tala de bosques, el calentamiento global,

entre otros, han generado grandes pérdidas y cambios en los diferentes ecosistemas colombianos. Para el caso del departamento de Cundinamarca son los bosques altoandinos y los páramos quienes se han visto más afectados. La importancia de estos ecosistemas radica en la amplia variedad de especies vegetales nativas y endémicas que benefician diversos grupos de fauna; además, actúan en la regulación hídrica la cual aporta gran cantidad de agua a los afluentes cercanos. La disminución y extinción de la diversidad vegetal, trae consigo el deterioro y la pérdida de los servicios ambientales que actualmente brindan estos ecosistemas, por esto se hace necesario abordar la conservación y preservación de las especies desde todos los campos y técnicas posibles, *ex situ* o *in situ*.

Una de las estrategias de la conservación de los recursos fitogenéticos *ex situ*, son los Bancos de Semillas (de Viana et al., 2009); sin embargo, los esfuerzos de conservación se han centrado principalmente en especies alimenticias y de cultivo. Menos del 1% de las especies almacenadas en los bancos de germoplasma corresponden a especies nativas (Hay & Probert, 2013; Rao et al., 2007). Es por esto, que la información sobre la longevidad, tipo de semilla y las condiciones de almacenamiento de estas especies es muy escaso, y se requiere investigar acerca de los requerimientos germinativos, su viabilidad, contenido de humedad, tipos de dormancia y tiempo de almacenamiento (Hong & Ellis, 1988).

El Jardín Botánico de Bogotá cuenta con el primer Banco de semillas especializado en especies nativas de páramo. Para preservar las semillas que se encuentran en estos ecosistemas, de los cuales se sabe muy poco, es necesario evaluar en cada una de las especies aspectos como la viabilidad y calidad de las semillas, los requerimientos de germinación y la tolerancia a la desecación. Este estudio buscó generar conocimiento básico para la toma de decisiones asociadas con la propagación y restauración, así como herramientas clave para almacenar y conservar de forma *ex situ* las semillas de las especies estudiadas dentro del banco de semillas. Además, permitió entender los factores que determinan la distribución y dispersión de especies, y habilidades de colonización identificando especies con dormancia, problemas de reclutamiento, o por el contrario, especies con altos valores de germinación y por ende establecimiento de plántulas en campo.

4. HIPÓTESIS

Las semillas de plantas de páramo presentan un gran potencial de conservación *ex situ* dado por un comportamiento predominantemente ortodoxo.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de conservación *ex situ* de semillas de especies de páramo mediante la estrategia de bancos de semillas.

6. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Evaluar la viabilidad y requerimientos de germinación de las semillas de 17 especies de plantas de páramo, mediante la tinción por tetrazolio y la prueba de germinación.
- Identificar el tipo de dormancia y el pretratamiento adecuado para lograr la germinación en las semillas de seis especies de plantas de páramo.
- Determinar el tipo de semillas según la tolerancia a la desecación en 19 especies de plantas de páramo.

7. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la viabilidad de las semillas de especies de plantas de páramo?
- ¿Cómo romper la dormancia de semillas de seis especies de plantas de páramo?
- ¿Cuál es el potencial de conservación *ex situ* de las semillas de páramo según su tolerancia a la desecación?

BIBLIOGRAFÍA

- Alzate-Guarín, F., & Murillo-Serna, J. S. (2016). Angiosperm flora on the páramos of northwestern Colombia: diversity and affinities. *PhytoKeys*, 70(70), 41–52. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.70.8609>
- Amaya-Espinel, J. D., Gómez, M. F., Amaya-Villarreal, Á. M., Velásquez-Tibatá, J., & Renjifo, L. M. (2011). Guía metodológica para el análisis de riesgo de extinción de especies en Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Pontificia Universidad Javeriana. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4369.9600>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Journal of Chemical Information and Modeling (Second Edi). San Diego, USA: Academic Press/Elsevier. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1079/ssr2003150>
- Borza, J. K., Westerman, P. R., & Liebman, M. (2007). Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Technology*, 21(2), 518–522. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300805180#.XR0PugCgiLc.mendeley>
- Cabrera, M., & Ramírez, W. (Eds.). (2014). *Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación* (Instituto). Bogotá, D.C Colombia. Retrieved from <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31451>
- Castaño, C. (2002). Colombia alto andina y la significancia ambiental del bioma páramo. In C. Jaramillo (Ed.), *Congreso Mundial de Páramos* (pp. 24–48). Paipa.
- CIAT |. (n.d.). Retrieved May 8, 2019, from <http://ciat.cgiar.org/>
- Cortés-Duque, J., & Sarmiento, C. (2013). *Visión ecosistémica de los páramos de alta montaña colombiana: Memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos*. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Daws, M. I., Garwood, N. C., & Pritchard, H. W. (2005). Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panamá: some ecological implications. *Functional Ecology*, 19, 874–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.01034.x>

-
- de Viana, M. L., Mosiario, M. J., & Morandini, M. N. (2009). Tolerancia a la desecación de semillas de dos especies arbóreas del chaco salteño (Argentina): *Erithryna falcata* benth. y *Tecoma garrocha* hieron. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(3), 590–594.
- Godefroid, S., Van de Vyver, A., & Vanderborght, T. (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation*, 19(5), 1365–1383. <https://doi.org/10.1007/s10531-009-9767-3>
- Gold, K., León-Lobos, P., & Way, M. (2004). Manual de recolección de semillas de especies de plantas Silvestres para la conservación a largo plazo y restauración ecológica. La Serena, Chile. Boletín INIA N° 110: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi. Retrieved from http://www.inia.cl/recursosgeneticos/bancobase/semillasnativas/Documentos/m_sem.pdf
- Guerrant, E. O., Havens, K., Maunder, M., & Havens, K. (Eds.). (2004). *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press. Retrieved from <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/ex-situ-plant-conservation-supporting-species-survival-in-the-wil>
- Hay, F. R., & Probert, R. J. (2013). Advances in seed conservation of wild plant species : a review of recent research. *Conservation Physiology*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot030.Introduction>
- Hofstede, R., Segarra, P., & Vásquez, P. M. (Eds.). (2003). *Los Páramos del Mundo. Proyecto Atlas Mundial de los páramos*. Quito. Retrieved from [http://www.portalces.org/sites/default/files/references/038_Hofstede et al. %28eds%29.2003.Los Paramos del Mundo.pdf](http://www.portalces.org/sites/default/files/references/038_Hofstede%20et%20al.%28eds%29.2003.Los%20Paramos%20del%20Mundo.pdf)
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1988). Contrasting seed storage behaviour among different species of Meliaceae. *Seed Science and Technology*, 26(1), 77–95. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2276317>
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1995). A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin. Italy.
- ISTA. (2008). Page 1 of 64 1. Kenya.
- Kermode, A. R., & Finch-Savage, B. E. (2002). Desiccation Sensitivity in Orthodox and Recalcitrant Seeds in Relation to Development. In M. Black & H. W. Pritchard (Eds.), *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (p. 416). Retrieved from <http://books.google.com/books?id=8bMEVRRBWjsC&pgis=1>
- León-Lobos, P., Way, M., Aranda, P. D., & Lima-Junior, M. (2012). The role of ex situ seed banks in the conservation of plant diversity and in ecological restoration in Latin

-
- America. *Plant Ecology & Diversity*, 5(2), 245–258. <https://doi.org/10.1080/17550874.2012.713402>
- Llambí, L. D., Soto, A., Celleri, R., De Bievre, B., Ochoa, B., & Borja, P. (2012). *Ecología, Hidrología y Suelos del Páramo*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/263280481>
- Magnitskiy, S. V., & Plaza, G. a. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 96–103.
- Marín, C., & Parra, S. (2015). *Páramos vivos, Bitácora de flora*. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Mora, F., & Vargas, O. (2007). Germination dynamics, seed dormancy and seedling recruitment in *Puya cryptantha* and *P. trianae*, two giant rosettes of the colombian Páramos, (February 2016).
- Nkang, A., Omokaro, D., Egbe, A., & Amanke, G. (2003). Variations in fatty acid proportions during desiccation of *Telfairia occidentalis* seeds harvested at physiological and agronomic maturity. *African Journal of Biotechnology*, 2(February), 33–39.
- Pedraza-Peñaloza, P., Betancur, J., & Franco-Roselli, P. (2004). *Chisacá, Un recorrido por los páramos andinos. (Second Edi)*. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Ciencias Naturales e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Retrieved from www.unal.edu.co/
- Pérez-Martínez, L. V., Rodríguez, N. A., Melgarejo, L. M., & Vargas R, O. (2014). Propagación por semilla de 13 especies de páramo. In O. Vargas R & L. V. Pérez-Martínez (Eds.), *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica* (pp. 116–174). Bogotá, D.C Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez, F., & Pita, M. (2009). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Madrid. Retrieved from <http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/conservación semillas.pdf>
- Pywell, R. F., Bullock, J. M., Roy, D. B., Warman, L., Walker, K. J., & Rothery, P. (2003). Plant traits as predictors of performance in ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*, 40(1), 65–77. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2003.00762.x>
- Ranal, M. A., & Santana, D. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de*

Germoplasma No. 8. Italia: Biodiversity International. Retrieved from http://books.google.com/books?id=sv_FnxOQiCcC&pgis=1

- Sarmiento, C. E., Cadena, C. E., Sarmiento, M. V., & Zapata, J. A. (2013). Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000. reponame:Repositorio Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Retrieved from <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31406#.XR0GZNq7t58.mendeley>
- Sklenář, P., Luteyn, J. L., Ulloa, C., Jorgensen, P. M., & Dillon, M. O. (2005). Flora genérica de los páramos: guía ilustrada de las plantas vasculares. New York Botanical Garden.
- Valencia, R. A., Lobo A., M., & Ligarreto, G. A. (2010). Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. Corpoica Cienc. Tecnol.Agropecu., 11(1), 85–94.
- Vieira, B., & Silveira, F. A. (2010). Reproductive phenology, seed germination and ex situ conservation of *Pseudananas sagenarius* in a semi-deciduous tropical forest fragment. *Plant Species Biology*, 25(3), 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00292.x>

CAPÍTULO 1. Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio.

Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en el volumen 40 (2): 366-382 de la revista *Caldasia* en el periodo de Julio-Diciembre 2018. En el anexo 1 se presenta el artículo publicado.

RESUMEN

La viabilidad denota el potencial que tiene una semilla para germinar, la cual está ligada al éxito o fracaso reproductivo de las poblaciones y de esta manera es una de las primeras variables a evaluar cuando se trabaja con semillas. Nuestro objetivo fue determinar el mejor método para evaluar la viabilidad en 17 especies altoandinas. Se comparó la viabilidad mediante dos pruebas: Tetrazolio, para la cual se probaron variaciones de concentración, acondicionamiento y tiempo de exposición; y germinación, que se trabajó bajo condiciones controladas a 20/10 °C, fotoperiodo y termoperiodo de 12 horas. Se utilizó la prueba Kruskal- Wallis para evaluar diferencias. Se encontraron diferencias en el valor de viabilidad entre las pruebas. En 11 especies se recomienda la prueba de Tetrazolio, donde la mejor condición de evaluación fue [1-1,5 %] TZ, 40 °C y 24 horas de exposición. En los géneros *Puya*, *Hypericum* y *Gaultheria* la prueba de germinación fue mejor para evaluar la viabilidad. La comparación de las pruebas permitió detectar la presencia de dormancia en algunas especies donde se evidenció una alta viabilidad pero baja germinación. Los resultados permitieron determinar el método más confiable para evaluar

la viabilidad en las diferentes especies, aportar información sobre sus requerimientos germinativos y potencial para la propagación sexual, así como detectar la posible presencia de dormancia y la necesidad de profundizar en la evaluación de los métodos de ruptura que permitan aumentar los porcentajes de germinación en algunas de las especies.

Palabras clave. Calidad de semilla, embrión, páramo, propagación.

INTRODUCCIÓN

La viabilidad denota el potencial que tiene una semilla para germinar (Sawma & Mohler 2002). Es un rasgo importante para evaluar la habilidad de colonización de las especies (Bremholm 1993, Pywell *et al.* 2003) y por ende está ligado al éxito o fracaso reproductivo de las poblaciones (Borza *et al.* 2007). A su vez es una medida de calidad, que cobra especial importancia en el monitoreo periódico de semillas que se encuentran bajo almacenamiento, con el fin de asegurar el éxito de un programa de conservación *ex situ* (Menges *et al.* 2004, Godefroid *et al.* 2010). Mediante una revisión de los métodos utilizados para evaluar la viabilidad en estudios relacionados con bancos de semillas en campo, reclutamiento, bancos de semillas *ex situ* y ecología de la germinación, se encontró que de una muestra de 26 publicaciones científicas, se utilizan los siguientes métodos para su evaluación: germinación, 23,1%; inspección directa del embrión clasificando como viable un embrión rígido y blanco, 15,4%; prueba de Tetrazolio (TZ), 38,5%; germinación y subsiguiente prueba de tetrazolio en las semillas no germinadas, 7,7% y germinación e inspección del embrión subsiguiente en semillas no germinadas, 15,4%.

Cada prueba tiene ventajas y desventajas; la prueba de germinación ligada a la prueba de inspección del embrión puede tomar mucho tiempo si la semilla tiene latencia y no se conocen los requerimientos para romperla (McDonald 1998, Torres & Marcos-Filho 2005), lo cual es usual en especies nativas. Por otro lado, aunque la prueba de inspección del embrión se ha evaluado como equivalente a la prueba de germinación y tetrazolio (Sawma y Mohler 2002, Ooi *et al.* 2004, Borza *et al.* 2007), aún no se considera una prueba estandarizada.

La prueba de TZ es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla; cuando dichos tejidos entran en contacto con la solución, reaccionan formando un

compuesto insoluble de color rosado que indica la viabilidad del tejido (Smith 1952, Moreno 1984, Gaspar-Oliveira *et al.* 2009).

La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración (Ruiz 2009); en general, la estructura clave que debe presentar tinción es la radícula, la ausencia de tinción en ésta inmediatamente clasifica la semilla como no viable (Schmidt 2000). Por esta razón, se necesita de la pericia del analizador para la evaluación, que en semillas pequeñas puede ser muy dispendiosa y la extracción del embrión casi imposible (Howarth & Stanwood 1993, Pradhan & Badola 2008). Sin embargo, muchos autores la consideran el método más exacto (Bradbeer 1988, Sawma & Mohler 2002) y es de gran utilidad en especies cuyas semillas presentan latencia y germinan con lentitud (Willan c1991, Ruiz 2009, Aslam *et al.* 2010).

La semilla de una especie particular puede requerir variaciones en las condiciones para tener resultados precisos (MAPA 2009, Da Silva *et al.* 2012). Numerosos estudios se han realizado para optimizar la prueba de TZ en especies particulares, tanto silvestres como comerciales, mediante la variación de las condiciones de evaluación (Gera *et al.* 1998, Purohit & Bisht 1999, Santos *et al.* 2007, Pinto *et al.* 2009, Zeng & Wang 2009, Hosomi *et al.* 2011, Lazarotto *et al.* 2011, Grzybowski *et al.* 2012, Kaiser *et al.* 2014, Lamarca & Barbedo 2014), donde se prueban acondicionamientos para facilitar la entrada del tetrazolio; corte, escarificación de la testa; tiempos y métodos de imbibición, imbibición directa o con toallas de papel; tiempos de sometimiento a la solución, entre dos y 48 horas; concentraciones de la solución, entre 0,075 y 1,0 %; y temperaturas entre 30 y 45 °C. El uso de la concentración, tiempo de tinción, la temperatura y la adecuada interpretación de la tinción en las semillas son factores cruciales para asegurar una prueba exitosa (Abbade & Takaki 2014).

Hay muy pocos estudios de viabilidad en especies nativas (Godefroid *et al.* 2010) y, específicamente, de especies tropicales altoandinas (Baskin & Baskin 1998), que hacen parte de los ecosistemas de bosque altoandino y páramo que prestan servicios ecosistémicos de abastecimiento hídrico, regulación, de secuestro de carbono en suelos, calidad de aire para las ciudades y además, presentan altos niveles de endemismo (Rodríguez *et al.* 2006).

En ecosistemas andinos de Suramérica de zonas templadas de Chile y Argentina, se referencian estudios en los cuales se evalúa la viabilidad de bancos de semillas en campo (Kalin *et al.* 1999, Cavieres & Arroyo 2000) o regeneración natural (Renison *et al.* 2004) por la prueba de TZ. En ecosistemas altoandinos de Perú se referencia un estudio de

viabilidad de *Puya raimondii* en condiciones de laboratorio y un análisis de bancos de semillas naturales en páramo (Mora & Vargas 2007), en los cuales se utiliza la prueba de TZ. Por su parte Pico-V (2016), en un estudio en *Puya loca* evalúa la viabilidad por medio de la germinación. Esto evidencia la necesidad de (1) Conocer los métodos más efectivos para la evaluación correcta de rasgos reproductivos como la viabilidad de las semillas, y (2) Evaluar la viabilidad y germinación de semillas de especies altoandinas tropicales para conocer su potencial de colonización y utilizarlo como herramienta en la toma de decisiones. En este marco, la presente investigación tuvo como objetivo comparar la prueba de germinación y tetrazolio para determinar el mejor método para la evaluación de la viabilidad en semillas de 17 especies tropicales altoandinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal

Entre 2014 y 2015 se recolectaron frutos y semillas de 17 especies de diversos bosques altoandinos y páramos cercanos a la ciudad de Bogotá D.C., Colombia (Tabla 1.1, anexo 2). Se verificó que los frutos se encontraran en madurez fisiológica a partir del color del exocarpo del fruto y de la dureza de la testa de la semilla. Se recolectó material de al menos 20 individuos por especie con condiciones fitosanitarias adecuadas. La taxonomía de cada especie fue verificada y los especímenes se ingresaron al Herbario del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (JBB). Los frutos y semillas se transportaron el mismo día de la colecta al Laboratorio de Conservación de Semillas del JBB y se realizó la limpieza de acuerdo al tipo de fruto. Se verificó la presencia de embrión en 100 semillas por especie por medio de inspección con un estereoscopio Motic® SMZ-168 (Hong Kong, China).

Tabla 1.1 Listado de las especies de páramo evaluadas con sus respectivos lugares de recolecta y hábito de crecimiento.

| Familia | Especie | Hábito | Lugar de colecta | Coordenadas |
|--------------|--|--------|-------------------------|------------------------------|
| Asteraceae | <i>Espeletia barclayana</i> Cuatrec. | C | Páramo Subachoque | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia cayetana</i> (Cuatrec.) Cuatrec. | C | Páramo Subachoque | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia grandiflora</i> Humb. & Bonpl. | C | Páramo Chingaza | 4°46' Norte, 73°51' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia killipii</i> Cuatrec. | C | Páramo Chingaza | 4°17' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Pentacalia ledifolia</i> (Kunth) Cuatrec. | A | Páramo San Francisco | 4°35' Norte, 73°59' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya nitida</i> Mez | H | Páramo Subachoque | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya santosii</i> Cuatrec. | H | Páramo Pasquilla | 4°25' Norte, 74°11' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | H | Páramo Curubital | 4°22' Norte, 74°06' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya trianae</i> Baker | H | Páramo Sumapaz | 4°10' Norte, 74°13' Oeste |
| Ericaceae | <i>Gaultheria anastomosans</i> (Mutis ex L.f.) Kunth | A | Páramo San Francisco | 4°35' Norte, 74°00' Oeste |
| Ericaceae | <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. | A | Páramo San Francisco | 4°35' Norte, 73°59' Oeste |
| Ericaceae | <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth | A | Páramo San Francisco | 4°35' Norte, 74°00' Oeste |
| Hypericaceae | <i>Hypericum prostratum</i> Cuatrec. | H | Páramo Sumapaz | 4°17' Norte, 74°12' Oeste |
| Myrtaceae | <i>Ugni myricoides</i> (Kunth) O.Berg | A | Páramo Subachoque | 4°26' Norte, 74°10' Oeste |
| Rosaceae | <i>Hesperomeles goudotiana</i> (Decne.) Killip | A | Páramo Romeral | 4°27' Norte, 74°13' Oeste |

| | | | | |
|------------|--|---|----------------|------------------------------|
| Salicaceae | <i>Xylosma spiculifera</i> (Tul.) Triana & Planch. | A | Páramo Romeral | 4°28' Norte, 74°14' Oeste |
| Solanaceae | <i>Cestrum buxifolium</i> Kunth | A | Páramo Romeral | 4°27' Norte, 74°13' Oeste |

A. Arbusto. C. Caulirosula. H. Hierba.

Prueba de Tetrazolio

Se revisaron numerosos artículos en los cuales se aplicó la prueba de tetrazolio para identificar las condiciones más utilizadas. A partir de esto, se evaluaron primero condiciones de 30, 35 y 40 °C y de tiempos de sometimiento a la solución de tetrazolio de una, tres y 24 horas en tres especies de páramo.

En estas pruebas preliminares se descartaron los tiempos de una y tres horas y la mejor temperatura fue de 40 °C por lo cual se evaluó la prueba bajo estas condiciones. Todas las semillas fueron embebidas en agua destilada durante 24 horas antes de la prueba, que se realizó en condiciones de oscuridad; la temperatura se alcanzó con un horno de secado Binder ED 53-UL (Tuttlingen, Alemania). El ajuste del tiempo de inmersión y la concentración del TZ se realizó en dos fases; en la primera se evaluó una concentración de 0,1 % de TZ y, de acuerdo con la morfología, se realizó un acondicionamiento en la semilla para permitir la entrada de la solución, a continuación se describen los tipos de acondicionamientos que se utilizaron:

- Sin acondicionamiento (Prueba directa en semillas): Después de embebidas las semillas es agua, estas fueron sumergidas directamente en el tetrazolio para realizar la prueba, esto se realizó en semillas muy pequeñas o con testas delgadas.
- Prueba en embriones: Después de embebidas las semillas es agua, se eliminó la testa y el endospermo, cuando estuviera presente en la semilla, para aplicar la prueba de tetrazolio directamente a los embriones.
- Ruptura de la testa: Después de embebidas las semillas es agua, se realizó un orificio en la testa con ayuda de un objeto corto punzante como pinzas de punta fina.
- Corte basal: Después de embebidas las semillas es agua, se realizó un corte con un bisturí en el extremo del funículo de la semilla.

-
- Corte dorsal: Después de embebidas las semillas en agua, se realizó un corte longitudinal de la semilla sin afectar el embrión.

En la segunda fase, de acuerdo con los resultados en la prueba anterior, se aumentó la concentración de tetrazolio a 1,0 ó 1,5 % y se varió el método de acondicionamiento (Tabla 1.2). En las especies que se presentó tinción en la primera fase no se realizó la segunda fase. La tinción se consideró adecuada cuando la zona radicular y los cotiledones presentaron color rosa; se prestó especial atención a la zona radicular y, seguidamente, a los cotiledones; si el embrión presenta una tinción no homogénea puede significar un menor vigor, pero no ausencia de viabilidad (Da Silva *et al.* 2012). Un color rosa claro, no homogéneo en la radícula o ausencia de coloración de los embriones los clasificó como no viables.

En la mayoría de las especies se realizaron las pruebas en cuatro réplicas de 50 semillas; debido a poca disponibilidad de material vegetal en *U. myricoides* se utilizaron tres réplicas de 25 semillas, en *H. goudotiana* cuatro réplicas de 20 semillas y en *C. buxifolium* cuatro réplicas de 15 semillas.

Prueba de germinación

La germinación se evaluó en cajas de Petri con doble papel de filtro en condiciones controladas por medio de una cámara de germinación Thermoline (New South Wales, Australia). Las condiciones de germinación fueron 20/10 °C día/noche, con un fotoperiodo y un termoperíodo de doce horas (Pérez-Martínez, Rodríguez, Melgarejo, & Vargas R, 2014). La humedad relativa, aunque no fue controlada, se mantuvo alrededor de 75±5 % y fue monitoreada con un Data Logger EBCHQ 94150 (China). Una semilla se consideró germinada cuando se evidenció la emergencia de la radícula de 2 mm o más de longitud. Se utilizaron cuatro réplicas de 50 semillas. La germinación fue evaluada cada tres días hasta que cesó la germinación por tres semanas consecutivas después de haber germinado la mayor parte de las semillas. Al final de los ensayos se examinó la presencia del embrión en las semillas no germinadas.

El porcentaje de germinación (PG) se calculó sobre el número de semillas con embrión y el tiempo de germinación mediante el índice de tiempo medio de germinación (TMG) por medio de la ecuación (Tompsett & Pritchard 1998, Ranal & Santana 2006):

$$PG = \left(\frac{N}{N_s} \right) * 100$$

$$TMG = \frac{\sum_{t=1}^k ni \cdot ti}{\sum_{t=1}^k ni}$$

Donde N es el número de semillas germinadas y N_s el número total de semillas con embrión, ni es el número de semillas germinadas en la medida i ésima; ti es el tiempo en días en la medida i ésima y k es el tiempo total de germinación en días.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro- Wilk en cada conjunto de datos, seguida de un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con una confianza del 95 % para evaluar diferencias significativas entre el porcentaje germinación y el porcentaje de semillas viables según la prueba de Tetrazolio. Para la comparación con la prueba de germinación se utilizaron los datos que arrojaron los mejores resultados en la prueba de TZ. La prueba de Tetrazolio se consideró estandarizada cuando el porcentaje de embriones teñidos fue igual o superior al porcentaje de semillas germinadas. Se utilizó el programa estadístico StatGraphics® Centurion XVI versión 16.1.11.

RESULTADOS

Prueba de Tetrazolio

La tinción obtenida en los embriones que indicó viabilidad de la semilla fue rosa oscuro, mientras que los embriones inviables registraron ausencia de coloración en la radícula y colores rosa pálidos esparcidos por los cotiledones sin un patrón homogéneo (Fig. 1.1).

Las condiciones para realizar la prueba de tetrazolio presentaron similitud a nivel de género y familia. En *Espeletia* la consistencia quebradiza de la testa facilita realizar una ruptura

ligera para permitir la entrada del TZ sin necesidad de extraer los embriones; para el género el factor que más influye en el proceso de tinción es la concentración; al utilizar tetrazolio al 1 % por 24 horas se alcanzaron viabilidades superiores a 76 % (Tabla 1.2). Estas mismas condiciones permitieron una tinción superior al 80 % en *P. ledifolia*, por otro lado, gracias a la consistencia delgada y papirácea de la testa la prueba se puede realizar directamente en las semillas sin realizar un acondicionamiento previo (Tabla 1.2).

En *Puya* la tinción fue inferior al 12 % en todas las especies, incluso al evaluar la prueba directamente en el embrión, aumentando el tiempo de exposición y la concentración del tetrazolio (Tabla 1.2, Fig. 1.2).

Para las Ericáceas *G. anastomosans*, *P. prostrata* y *V. floribundum*, las cuales poseen una testa delgada pero dura, es necesario realizar un corte basal en la testa que asegure la entrada de Tetrazolio, así como aumentar la concentración hasta el 1,5 % para obtener viabilidades superiores al 40 % (Tabla 1.2).

En *H. prostratum* no se pudo realizar un acondicionamiento previo en las semillas debido a su pequeño tamaño (Figs. 1.1j-l), y pese a los cambios utilizados en la prueba sólo se alcanzó una tinción de 13,2 %. Por su parte, *U. myricoides* presenta un cambio radical en los resultados en la prueba uno y dos pasando de 0 % al 100 % de tinción, donde, si bien se modificó la concentración del TZ, el factor crucial para obtener tinción es realizar un corte dorsal en la semilla ya que esta presenta una testa extremadamente dura y probablemente poco permeable (Fig. 1.1, Tabla 1.2).



Figura 1.1. Resultados de la prueba de viabilidad con Tetrazolio en una especie por familia evaluada. Para cada especie se presenta la semilla, el embrión viable y el embrión no viable. **a., b., c.** *Puya* sp. nov. aff. *horrida* (Bromeliaceae). **d., e., f.** *E. grandiflora* (Asteraceae). **g., h., i.** *P. prostrata* (Ericaceae). **j., k., l.** *H. prostratum* (Hypericaceae). **m., n., ñ.** *U. myricoides* (Myrtaceae). **o., p., q.** *H. goudotiana* (Rosaceae). **r., s., t.** *X. spiculifera* (Salicaceae). **u., v., w.** *C. buxifolium* (Solanaceae). Escala = 1 mm.

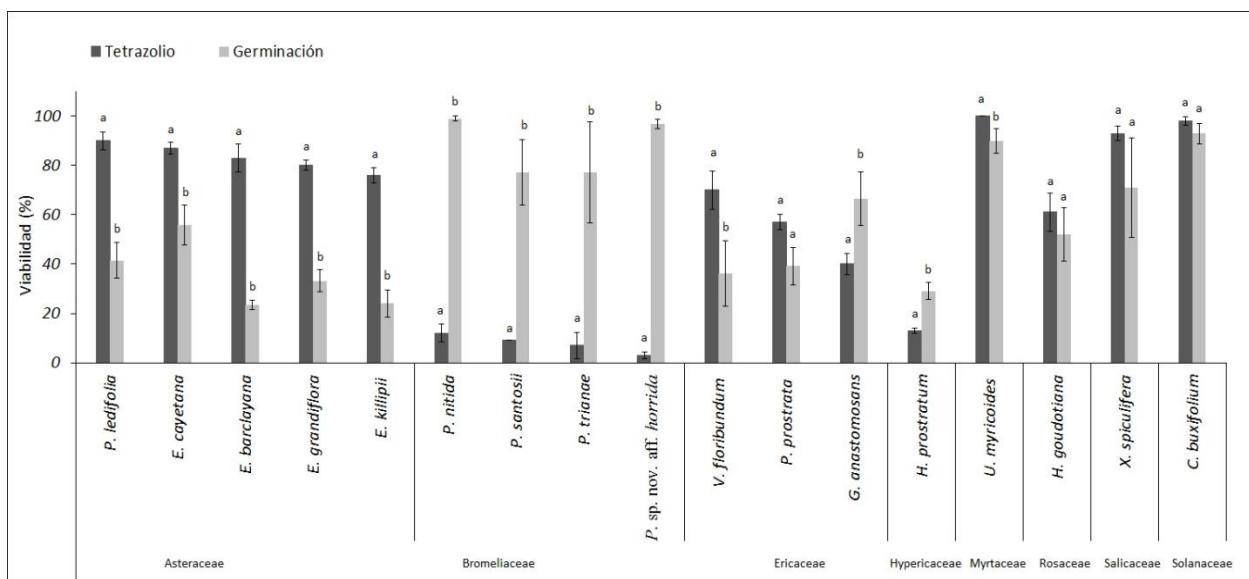


Figura 1.2. Viabilidad por la prueba de Tetrazolio y de germinación de 17 especies altoandinas. Letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las pruebas de acuerdo con Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Las verticales indican el error estándar ($n=4$).

Finalmente *H. goudotiana*, *C. buxifolium* y *X. spiculifera* presentan testas gruesas, duras y para el caso de las dos últimas especies, un abundante endospermo por lo que es necesario realizar la prueba directamente en los embriones, con una concentración del 1 % para lograr tinciones superiores al 60 % (Fig. 1.1, Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba de viabilidad con tetrazolio. Se evaluó la concentración de tetrazolio TZ (0,1 %, 1 % y 1,5 %), el tiempo de exposición a la solución (24 y 48 h) y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. SE= Error estándar. ($n=4$).

| Especie | Prueba 1 | | Prueba 2 | |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | Condiciones | Viabilidad (% \pm SE) | Condiciones | Viabilidad (% \pm SE) |
| <i>E. barclayana</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 51,2 \pm 2,7 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 83 \pm 5,6 |

| | | | | |
|---|--|----------|--|----------|
| <i>E. cayetana</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 12±1,5 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 86,6±2,5 |
| <i>E. grandiflora</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 34,3±2,3 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 79,6±2,0 |
| <i>E. killipii</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 15,9±0,7 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 76,3±3,0 |
| <i>P. ledifolia</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 86,6±3,5 | | |
| <i>P. nitida</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 3,7±3,1 | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 11,5±4 |
| <i>P. santosii</i> | 1,5 % TZ-24 h / Embriones | 9 | | |
| <i>Puya sp. nov.</i> <i>aff. horrida</i> | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 0 | 1,0 % TZ-48 h / Embriones | 3±1,3 |
| <i>P. trianae</i> | 1,5 % TZ-24 h / Embriones | 6,5±5,3 | | |
| <i>G. anastomosans</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 0±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 40,1±4,4 |
| <i>P. prostrata</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 2,5±1,0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 57,2±3,2 |
| <i>V. floribundum</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 12,2±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 79,1±7,6 |
| <i>H. prostratum</i> | 0,1 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 4,7±1,7 | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 13,2±1,2 |
| <i>U. myricoides</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 0±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte dorsal | 100±0 |
| <i>H. goudotiana</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 61,3±7,7 | | |
| <i>X. spiculifera</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 97±2,9 | | |
| <i>C. buxifolium</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 98,3±1,7 | | |

Prueba de germinación

El porcentaje de germinación varió drásticamente entre las especies, a pesar de esto se observa un comportamiento similar a nivel de familia. Asteraceae fue la familia que presentó la menor germinación donde las especies no superaron el 56 %, además reporta los valores más bajos como en *E. barclayana* 23 % y *E. killipii* 24 % (Fig. 1.2). En cuanto al tiempo medio de germinación este varió entre 24 y 36 días según la especie (Tabla 1.3).

La familia Bromeliaceae presentó los mayores valores de germinación, con valores que van desde el 77 al 99 % (Fig. 1.2), con un tiempo medio de germinación promedio de 36 días (Tabla 1.3).

En Ericaceae las especies más similares fueron *V. floribundum* y *P. prostrata* con un PG promedio del 37 % y un TMG de 27 días, valores que aumentaron en *G. anastomosans* (Tabla 1.3 y Fig. 1.2).

En las especies restantes los mayores valores de germinación los presentaron *C. buxifolium* y *U. myricoides*, seguidas de *X. spiculifera* y *H. goudotiana* todas con valores superiores al 50 %; *H. prostratum* fue la especie que presentó la menor germinación (Fig. 1.2). En cuanto al TMG este fue muy variable y dependiente de la especie (Tabla 1.3).

Comparación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación

Para la mayoría de las especies se presenta una diferencia en los resultados de viabilidad obtenidos por las diferentes pruebas, aunque en general en la prueba de tetrazolio se presentan los valores más altos de viabilidad.

En las especies de la familia Asteraceae se presentaron diferencias entre la viabilidad obtenida por tetrazolio y con germinación ($P < 0,05$) (Tabla 1.3), siendo tetrazolio la prueba en la cual se presentó una mayor viabilidad, duplicando o triplicando los resultados por germinación (Fig. 1.2).

Tabla 1.3. Tiempo medio de germinación (TMG) y variación del error estándar (SE) presentado en las pruebas de viabilidad por tetrazolio y germinación. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre la prueba de germinación y tetrazolio de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), (n=4).

| Especie | TMG (Días) | TMG (SE) | Tetrazolio (SE) | Germinación (SE) | P |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|-------------------------|----------|
| <i>E. barclayana</i> | 33 | 2,98 | 5,58 | 1,99 | 0,02* |
| <i>E. cayetana</i> | 36 | 1,70 | 2,50 | 8,15 | 0,02* |
| <i>E. grandiflora</i> | 27 | 6,22 | 2,04 | 4,50 | 0,02* |
| <i>E. killipii</i> | 24 | 1,91 | 3,02 | 5,49 | 0,02* |
| <i>P. ledifolia</i> | 30 | 3,99 | 3,55 | 7,37 | 0,02* |
| <i>P. nitida</i> | 33 | 0,90 | 3,59 | 1,04 | 0,01* |
| <i>P. santosii</i> | 25 | 0,67 | 0,00 | 13,20 | 0,01* |
| <i>Puya sp. nov. aff. horrida</i> | 38 | 0,58 | 1,30 | 1,84 | 0,02* |
| <i>P. trianae</i> | 48 | 2,00 | 5,25 | 20,58 | 0,04* |
| <i>G. anastomosans</i> | 37 | 3,23 | 4,35 | 10,84 | 0,04* |
| <i>P. prostrata</i> | 25 | 4,55 | 3,16 | 7,68 | 0,06 |
| <i>V. floribundum</i> | 29 | 0,48 | 7,64 | 13,11 | 0,04* |
| <i>H. prostratum</i> | 64 | 1,59 | 1,08 | 4,79 | 0,04* |
| <i>U. myricoides</i> | 57 | 2,54 | 0,00 | 4,91 | 0,03* |
| <i>H. goudotiana</i> | 27 | 1,62 | 7,74 | 10,74 | 0,56 |
| <i>X. spiculifera</i> | 75 | 9,44 | 2,87 | 20,09 | 0,56 |

| | | | | | |
|----------------------|----|------|------|------|------|
| <i>C. buxifolium</i> | 42 | 2,67 | 1,67 | 4,12 | 0,31 |
|----------------------|----|------|------|------|------|

En Bromeliaceae también se presentaron diferencias entre las pruebas ($P < 0,05$) (Tabla 3), pero en este caso la prueba de germinación registró los mejores resultados de viabilidad con diferencias entre el 7 y el 77 % entre pruebas (Fig. 1.2).

En las especies *V. floribundum*, *P. prostrata* y *U. myricoides* se obtuvo mejor viabilidad por la prueba de tetrazolio; sin embargo, solo en *V. floribundum* y *U. myricoides* estas diferencias fueron significativas ($P < 0,05$) (Tabla 1.3). Para el caso de *G. anastomosans* e *H. prostratum* también se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), pero el mayor valor de viabilidad se presentó por el método de germinación (Tabla 1.3, Fig. 1.2).

Finalmente, en *H. goudotiana*, *X. spiculifera* y *C. buxifolium* no se presentaron diferencias entre las pruebas ($P > 0,05$) (Tabla 1.3), pero la prueba recomendada por presentar mejores valores de viabilidad es tetrazolio (Fig. 1.2).

En conjunto los resultados de la prueba por tetrazolio fueron más precisos ya que en general se observaron variaciones entre cero y siete de error estándar, mientras en la germinación estuvieron entre uno y 20 (Tabla 1.3).

DISCUSIÓN

Se logró estandarizar la prueba de tetrazolio en 11 de las 17 especies evaluadas, cuyas condiciones específicas se ilustran en la Tabla 1.4. En nuestro caso, las especies estandarizadas respondieron mejor a la siguiente condición de evaluación: [1-1,5 %] TZ, 40 °C y 24 horas de exposición. Dichas condiciones presentan diferencias frente a lo propuesto por Don (2009), quien recomienda una temperatura de 30 °C y 18 horas de exposición; estas condiciones son efectivas para especies cultivadas, sin embargo no fueron efectivas en las especies altoandinas evaluadas, lo cual soporta la necesidad de establecer nuevos protocolos para evaluar con precisión la viabilidad en los diferentes grupos de especies (Da Silva *et al.* 2012).

A pesar de que los menores valores de viabilidad por tetrazolio se presentaron en la concentración 0,1 %, no se descarta que puedan ser utilizados en otras especies altoandinas, ya que en diferentes estudios se han obtenido buenos resultados con esta concentración (De Oliveira *et al.* 2005, Grzybowski *et al.* 2012, Da Silva *et al.* 2012, Kaiser *et al.* 2014), lo cual es positivo ya que el uso de menores concentraciones de TZ conlleva a menores costos y posibilita una mejor visualización de patrones de coloración e identificación de diferentes tipos de daño (França Neto *et al.* 1998).

Un cuarto factor determinante es el acondicionamiento que se realice en la semilla antes de su exposición a la solución, lo cual permitirá un contacto directo entre el tetrazolio y el embrión y disminuirá el tiempo necesario para la tinción (Rao *et al.* 2007). Este acondicionamiento dependerá de la morfología y tamaño de la semilla; en nuestro caso se observó un agrupamiento a nivel de familia y género, lo cual sugiere que las condiciones reportadas en esta investigación pueden ser utilizadas en la evaluación de otras especies de la familia o el género (Tabla 1.4).

No obstante, es de destacar que el pequeño tamaño de las semillas obliga al analista o investigador a desarrollar habilidad en el proceso de acondicionamiento y evaluación ya que es posible que al realizar un corte o extraer directamente el embrión ocasione daños al mismo afectando la lectura de la prueba, de hecho, algunos autores señalan el tamaño de la semilla como una razón para no realizar acondicionamiento al aplicar la prueba (Tielbörger & Prasse 2009, Pradhan & Badola 2012), tal fue el caso de *H. prostratum* y *G. anastomosans*, especies para las cuales no se logró la estandarización de la prueba; se recomienda ampliar los estudios hasta identificar las mejores condiciones de la prueba ya que estas especies pertenecen a las familias Hypericaceae y Ericaceae muy bien representadas en ecosistemas altoandinos (Galindo-T *et al.* 2003, Sklenář *et al.* 2005, Avella-M *et al.* 2014).

De igual manera se recomienda aumentar la concentración y tiempo de exposición para las especies del género *Puya*, que tras probar diferentes condiciones no presentaron la tinción esperada. En cuanto a la germinación también se observó un comportamiento similar entre géneros y familias.

Tabla 1.4. Método y condiciones recomendadas para evaluar la viabilidad en 17 especies altoandinas. En la prueba de Tetrazolio se indica: la concentración del TZ, la temperatura, el tiempo de exposición y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. En germinación se indica: la temperatura día/noche, el fotoperiodo y la humedad relativa.

| Especie | Prueba recomendada | Condiciones |
|---|---------------------------|--|
| <i>E. barclayana</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. cayetana</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. grandiflora</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. killipii</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>P. ledifolia</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Sin acondicionamiento |
| <i>P. nitida</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. santosii</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. trianae</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>G. anastomosans</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. prostrata</i> | Tetrazolio | [1,5%] ;40°C; 24h; Corte basal |
| <i>V. floribundum</i> | Tetrazolio | [1,5%] ;40°C; 24h; Corte basal |
| <i>H. prostratum</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>U. myricoides</i> | Tetrazolio | [1,5%] ;40°C; 24h; Corte dorsal |
| <i>H. goudotiana</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Embriones |
| <i>X. spiculifera</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Embriones |
| <i>C. buxifolium</i> | Tetrazolio | [1%]; 40°C; 24h; Embriones |

Abreviaturas: **h.** Horas. **HR.** Humedad relativa

En el caso de los géneros *Espeletia* y *Pentacalia* se obtuvo una germinación menor al 56 % (Fig. 1.2), estos resultados pueden indicar que las semillas presentan algún tipo de dormancia, en este caso fisiológica, una de las más frecuentes (Baskin & Baskin 2004, 2014) y que ha sido ampliamente reportada para su orden (Baskin & Baskin 2004).

Esta forma de dormancia proporciona indicaciones estacionales, asegurando que la germinación ocurra solo después de eventos ambientales específicos (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006). Este fenómeno indica que las semillas deben ser sometidas a tratamientos pregerminativos para lograr una buena germinación, entre ellos se sugiere la inmersión en hormonas de crecimiento o la estratificación en frío (Baskin & Baskin 2014). Por otro lado, un estudio realizado por Guariguata y Azocar (1988) en *Espeletia timotensis* reportó germinaciones de hasta el 80 % a temperaturas constantes inferiores a 16 °C, lo cual indica que es recomendable evaluar condiciones de siembra diferentes a las abordadas en este estudio, teniendo en cuenta que estas especies pertenecen a la familia mejor representada y abundante en las zonas de páramo (Sklenář *et al.* 2005).

Por el contrario, uno de los mejores resultados de germinación los presentó el género *Puya*, donde se reportaron PG superiores al 77 % con tiempos medios de germinación relativamente cortos (36 días), esto concuerda con lo referenciado por Vadillo *et al.* (2004) en *P. raimondii*, Franco (2014) en *P. nitida* y Pico-V (2016) en *P. loca*, quienes encontraron PG entre el 60 % y el 80 %. Esto indica que las condiciones de germinación utilizadas son adecuadas para las especies que evaluamos y posiblemente para el género (Tabla 1.4); sin embargo es importante resaltar que para algunas especies la germinación en condiciones de laboratorio tiende a ser mayor que en condiciones de campo (Guariguata & Azocar 1988), lo cual explica por qué Mora & Vargas (2007) registraron valores de germinación en bancos de semillas por debajo del 1 % en *Puya cryptantha* y *P. trianae* en los páramos colombianos. Estos resultados evidencian la importancia de implementar estrategias de propagación *ex situ* en aquellas especies que de forma *in situ* presenten problemas en su germinación o reclutamiento como es el caso de las del género *Puya* las cuales en su mayoría son endémicas y presentan alguna categoría de amenaza (Betancur c2015).

La familia Ericaceae se caracteriza por presentar frutos pequeños en bayas o cápsulas con un alto número de semillas pequeñas, lo cual, sumado a la dispersión principalmente zoócora, le permite contar con una amplia dispersión, que favorece junto a su rápida germinación la colonización de nuevos lugares (Luteyn 2002). Esta rápida germinación se evidenció en las especies evaluadas, donde los tiempos medios de germinación oscilaron entre 25 y 37 días. La especie con menor PG fue *V. floribundum* con 36 %, mientras *G. anastomosans* presentó el mayor PG con 66 % (Fig. 1.2), los valores encontrados concuerdan con lo reportado por Pérez-Martínez *et al.* (2014) en su estudio de propagación en especies de páramo. En ericáceas la germinación se ve afectada por dos factores principales: la baja viabilidad de los embriones (La Rosa *et al.* 2017) la cual puede estar influenciada por la variación en el tamaño y los estados de maduración de las semillas dentro de un fruto (Chaparro & Becerra 1999, Kloet & Cabilio 2010, Castro *et al.* 2012) y la presencia de dormancia fisiológica en las semillas (Baskin & Baskin 2004, Hernández *et al.* 2009), lo que hace necesario aplicar tratamientos pregerminativos (Magnitskiy & Ligarreto 2007, Hernández *et al.* 2009).

H. prostratum fue una de las especies que presentó la menor germinación (29 %) y un TMG de 64 días (Fig. 1.2), este comportamiento ha sido reportado en otras especies del género (Macchia *et al.* 1983, Çirak *et al.* 2007), donde la baja capacidad germinativa está relacionada con la presencia de dormancia en las semillas y sus altos requerimientos lumínicos (Thompson & Whatley 1984), por tal motivo se recomienda incluir tratamientos pregerminativos que permitan romper la dormancia en la especie.

El resultado de la germinación en *U. myricoides* fue similar al encontrado por Figueroa *et al.* (1996) en *U. molinae*, donde obtuvieron una germinación de 82 %. En la especie *H. goudotiana* la germinación fue mucho menor a lo esperado (Pérez-Martínez *et al.* 2014), de acuerdo con las características que se observaron en las semillas, presentan un embrión bien desarrollado con cotiledones gruesos que pueden favorecer la germinación, sin embargo, la presencia de una testa gruesa y dura presenta a su vez un impedimento para la germinación (Fig. 1.1), por lo cual se considera que un corte podría aumentar este porcentaje.

Finalmente, en *X. spiculifera* y *C. buxifolium* se presentó una alta germinación (Fig. 1.2), lo que es de esperarse ya que estas especies presentan un hábito herbáceo o arbustivo,

amplia distribución (Alford c2018, Canal c2018), alta tolerancia a los disturbios y tendencia a ser pioneras en los estadios sucesionales, por lo cual diferentes autores recomiendan su uso en programas de restauración (Acero-Nitola & Cortés-Pérez 2014, Cabrera & Ramírez 2014).

En conclusión, los resultados permitieron comparar cuál método es el más adecuado para evaluar la viabilidad de cada una de las especies (Tabla 1.4), sin embargo, la elección del método dependerá del objetivo de la investigación, si solo se requiere conocer la viabilidad será suficiente utilizar la prueba de tetrazolio siempre que se conozcan las condiciones adecuadas para evaluarla, pero esta no permite conocer los requerimientos y potencial de germinación de las especies.

En conjunto estas pruebas permiten identificar condiciones fisiológicas de las semillas que no podrían ser detectadas al usarlas de manera individual, por ejemplo la detección de una germinación menor a la viabilidad reportada en tetrazolio podría sugerir la presencia de dormancia no unificada en las semillas, tal como sucedió en las familias Asteraceae y Ericaceae (Fig. 1.1) y sucede en diferentes familias presentes en los bosques altoandinos (Baskin & Baskin 2004) usada como una estrategia que le confiere a las especies la capacidad de distribuir la germinación en el tiempo y adaptarse a las condiciones variables del ambiente, favoreciendo la supervivencia y establecimiento de nuevas poblaciones (Snyder 2006).

Bibliografía

- Abbate LC, Takaki M. 2014. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. Rev. Árvore. 38(2): 233-240.
- Acero-Nitola AM, Cortés-Pérez F. 2014. Propagación de especies nativas de la microcuenca del río La Vega, Tunja, Boyacá, con potencial para la restauración ecológica. Rev. Acad. Colomb. Ciencias 38(147):195-205. doi:10.18257/raccefyn.76.

-
- Alford MH. c2018. *Xylosma spiculifera* (Tul.) Triana y Planch. Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia [Revisada en: 19 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Aslam M, Reshi ZA, Siddiqi TO. 2010. Standardization of seed viability protocol for *Pinus wallichiana* A.B. Jackson in Kashmir, India. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 4(3):93-98.
- Avella-M A, Torres-R S, Gómez-A W, Pardo-P M. 2014. Los páramos y bosques altoandinos del pantano de Monquentiva o pantano de Martos (Guatavita, Cundinamarca, Colombia): caracterización ecológica y estado de conservación. *Biota Colomb.* 15(1):3-39.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination.* Lexington: Universidad de Kentucky.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14(1):1-16. doi:10.1079/SSR2003150.
- Baskin C, Baskin J. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.* Segunda ed. San Diego, CA, USA: Academic/Elsevier.
- Betancur J. c2018. *Puya* spp. Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. [Revisada en: 24 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>.
- Borza JK, Westerman PR, Liebman M. 2007. Comparing Estimates of Seed Viability in Three Foxtail (*Setaria*) Species Using the Imbibed Seed Crush Test with and Without Additional Tetrazolium Testing. *Weed. Technol.* 21(2):518-522. doi:10.1614/WT-06-110.
- Bradbeer JW. 1988. *Seed Dormancy and Germination.* Primera edición. New York: Blackie and Son.
- Bremholm T. 1993. Evaluation of techniques for establishing sedge meadow vegetation. [Tesis]. [Ames, Iowa]: Iowa State University.
- Cabrera M, Ramírez W, editores. 2014. Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Canal D. c2018. *Cestrum buxifolium* Kunth. Bernal R, Gradstein SR Celis M, editores. Catálogo de las plantas y líquenes de Colombia [Revisada en: 19 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Castro C, Olarte Y, Rache L, Pacheco J. 2012. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agron. Colomb.* 30(2):196-203.

-
- Cavieres LA, Arroyo MTK. 2000. Seed germination response to cold stratification period and thermal regime in *Phacelia secunda* (Hydrophyllaceae): Altitudinal variation in the mediterranean Andes of central Chile. *Plant Ecol.* 149(1):1-8. doi:10.1023/A:1009802806674.
- Chaparro M, Becerra N. 1999. Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Act. Biol. Colomb.* 4(1):47-60.
- Çirak C, Kevseroğlu K, Ayan AK. 2007. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. *J. Arid. Environ.* 68(1): 159-164. doi:10.1016/j.jaridenv.2006.03.027.
- Da Silva CB, Barbosa RM, Vieira RD. 2012. Evaluating Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) Seed Viability Using the Tetrazolium Test. *Seed Technol.* 34(2):263-272. doi: 10.13140/RG.2.1.2422.8883.
- De Oliveira L, De Carvalho M, Nery M. 2005. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A.P. de Candolle) Standley – Bignoniaceae. *Rev. Ciênc. Agron.* 36(2):169-174.
- Don R, editor. 2009. Handbook of Seedling Evaluation. Zürich: International Rules for Seed Testing.
- Figueroa J, Armesto JJ, Hernández JF. 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69:243-251.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 69: 243-251. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.
- França Neto J, Krzyzanowski F, Da Costa N. 1998. O teste de tetrazólio em sementes de soja. EMBRAPA-CNPSo Documento. 116:72.
- Franco A. 2014. Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia). [Tesis]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia.
- Galindo-T R, Betancur J, Cadena-M JJ. 2003. Estructura y composición florística de cuatro bosques andinos del Santuario de Flora y Fauna Guanentá-Alto Río Fonce, Cordillera Oriental Colombiana. *Caldasia* 25(2):313-335.

-
- Gaspar-Oliveira C, Martins C, Nakagawa J. 2009. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. Rev. Bras. Sementes. 31(1):160-167.
- Gera N, Gera M, Purohit M. 1998. Tetrazolium test for the seeds of *Acacia nilotica* Willd. ex. Del. Indian For. 124(12):1039-1042.
- Godefroid S, Vyver A, Vanderborgh T. 2010. Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. Biodivers. Conserv. 19(5):1365-1383. doi:10.1007/s10531-009-9767-3.
- Grzybowski CR de S, Ohlson O de C, Silva RC da, Panobianco M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. Rev. Bras. Sementes 34(1):47-54. doi:10.1590/S0101-31222012000100006.
- Guariguata M, Azocar A. 1988. Seed Bank Dynamics and Germination Ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an Andean Giant Rosette. Biotropica 20(2):54-59. doi:10.2307/2388426.
- Hernández M, Lobo M, Medina C, Cartagena J, Delgado O. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). Agron. Colomb. 27(1):15-23.
- Hosomi ST, Santos RB, Custodio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. Seed Sci. Technol. 39(1):178-189. doi:10.15258/sst.2011.39.1.15.
- Howarth MS, Stanwood PC. 1993. Measurement of seedling growth rate by machine vision. Transactions of the ASAE. 36(3):959-963. doi: 10.13031/2013.28422.
- Kaiser D, Freitas L, Biron R, Simonato S, Bortolini M. 2014. Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage. J. Seed Sci. 36(3):344-351. doi: 10.1590/2317-1545v36n31022.
- Kalin M, Cavieres A, Castor C, Humaña A. 1999. Persistent soil seed bank and standing vegetation at a high alpine site in the central Chilean Andes. Oecologia 119(1):126-132. doi: 10.1007/s004420050768.
- Kloet S., Cabilio P. 2010. Magnitudinal Asymmetries in Seed Production in *Vaccinium corymbosum*: Anomaly or Not? Am. Midl. Nat. 163(2):463-472. doi:10.2307/40730940.
- La Rosa R, Sánchez M, Pérez E. 2017. Morfología interna e histología de arándano *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) en Lima, Perú. Agron. Colomb. 35(2):176-181. doi:10.15446/agron.colomb.v35n2.63146.

-
- Lamarca E V, Barbedo CJ. 2014. Methodology of the tetrazolium test for assessing the viability of seeds of *Eugenia brasiliensis*. J. Seed Sci. 36(4):427-434. doi:10.1590/2317-1545v36n41029.
- Lazarotto M, Piveta G, Muniz M, Reiniger L. 2011. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. Semin. Agrar. 32(4):1243-1250. doi:10.5433/1679-0359.2011v32n4p1243.
- Luteyn JL. 2002. Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. Bot. Rev. 68(1):55-87. doi:10.1663/0006-8101(2002)068[0055:DAAEIN]2.0.CO;2.
- Macchia N, Benvenuti A, Angelini L. 1983. Germination characteristics of some seeds of medicinal plants. Rastitel'nye-resursy 21:461-463.
- Magnitskiy S, Ligarreto G. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). Rev. Colomb. Cienc. Hortic. 1(2):137-141.
- McDonald MB. 1998. Seed quality assessment. Seed Sci. Res. 8(2):265-276.
- Menges ES, Guerrant EO, Hamze S. 2004. Effects of seed collection on extinction risk of perennial plants. In: Guerrant EO, Havens K, Maunder M, editores. Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild. Washington (DC): Island Press.
- MAPA (Ministerio de agricultura, pecuaria y abastecimiento). 2009. Regras para análise de sementes. Primera edición. Brasilia: Ministerio de agricultura, pecuaria y abastecimiento.
- Mora F, Vargas O. 2007. Germination dynamics, seed dormancy and seedling recruitment in *Puya cryptantha* and *P. trianae*, two giant rosettes of the Colombian Páramos. Ecotropicos. 20(1):31-40
- Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Primera edición. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ooi M, Auld T, Whelan R. 2004. Comparison of the cut and tetrazolium tests for assessing seed viability: a study using Australian native *Leucopogon* species 5(2):141-143. Ecol. Manag. Restor. doi: 10.1111/j.1442-8903.2004.201-6.x
- Pérez-Martínez LV, Rodríguez NA, Melgarejo LM, Vargas RO. 2014a. Propagación por semilla de 13 especies de páramo. En: Vargas RO, Pérez-Martínez LV, editores. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Bogotá. D.C.: Universidad Nacional de Colombia. p. 115–124.

-
- Pérez-Martínez LV, Rodríguez NA, Melgarejo LM, Vargas RO. 2014b. Fichas técnicas por especie. En: Vargas RO, Pérez-Martínez LV, editores. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Bogotá. D.C.: Universidad Nacional de Colombia. p. 126–174.
- Pico-V A. 2016. Conservación *ex situ* de *Puya loca* Madriñan (Bromeliaceae) y registro de una segunda localidad en los páramos de Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 40(157): 637-643. doi: 10.18257/raccefyn.374.
- Pinto T, Marcos J, Fortil V, Cristiane C, Gomes S. 2009. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. Rev. Bras. Sementes 31(2):195-201.
- Pradhan BK, Badola HK. 2008. Seed Germination Response of Populations of *Swertia chirayita* [(Roxb. ex Fleming) H. Karst] Following Periodical Storage. Seed Technol. 30(1)63-69.
- Pradhan BK, Badola HK. 2012. Effect of Storage Conditions and Storage Periods on Seed Germination in Eleven Populations of *Swertia chirayita*: A Critically Endangered Medicinal Herb in Himalaya. Sci. World J. 2012:1-9. doi:10.1100/2012/128105.
- Purohit M, Bisht S. 1999. Use of TTC for Interpretation of Viability of Seeds of *Albizia procera* (ROXB.) Benth. Indian For. 125(8):828-834.
- Pywell RF, Bullock JM, Roy DB, Warman LIZ, Walker KJ, Rothery P. 2003. Plant traits as predictors of performance in ecological restoration. J. Appl. Ecol. 40(1):65-77. doi: 10.1046/j.1365-2664.2003.00762.x.
- Ranal M, Santana D. 2006. How and why to measure the germination process. Rev. bras. Bot. 29(1):1-11. doi:10.1590/S0100-84042006000100002.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Novell D, Larinde M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Roma, Italia: Biodiversity International.
- Renison D, Hensen I, Cingolani AM. 2004. Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Polylepis australis* mountain forests of central Argentina. For. Ecol. Manage. 196(2-3):327-333. doi: 10.1016/j.foreco.2004.03.025.
- Rodríguez M, Puentes J, Cortés F. 2006. Caracterización temporal de la lluvia de semillas en un bosque nublado del cerro de Mamapacha (Boyacá-Colombia). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 30(117):619-624.
- Ruiz MA. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Publicación técnica no. 77. EEA INTA Anguil.

- Santos M, Novembre A, Marcos-Filho J. 2007. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Sci. Technol.* 35(1):213-223. doi:10.15258/sst.2007.35.1.19.
- Sawma JT, Mohler CL. 2002. Evaluating Seed Viability by an Unimbibed Seed Crush Test in Comparison with the Tetrazolium Test 1. *Weed Technol.* 16(4):781-786. doi:10.1614/0890-037X(2002)016[0781:ESVBAU]2.0.CO;2.
- Schmidt L. 2000. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre.
- Sklenář P, Luteyn JL, Ulloa C, Jorgensen PM, Dillon MO. 2005. Flora genérica de los páramos: guía ilustrada de las plantas vasculares. New York: New York Botanical Garden Press.
- Smith CH. 1952. Heritable differences in germination of sugar-beet seed at low temperatures. *Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 7:411-414.
- Snyder RE. 2006. Multiple risk reduction mechanisms: can dormancy substitute for dispersal? *Ecol. Lett.* 9(10):1106-1114. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00962.x.
- Thompson K, Whatley JC. 1984. A thermogradient bar apparatus for the study of the germination requirements of buried seeds in situ. *New. Phytol.* 96(3):459-471. doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb03580.x
- Tielbörger K, Prasse R. 2009. Do seeds sense each other? Testing for density-dependent germination in desert perennial plants. *Oikos* 118(5):792-800. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17175.x
- Tompsett P, Pritchard H. 1998. The Effect of Chilling and Moisture Status on the Germination, Desiccation Tolerance and Longevity of *Aesculus hippocastanum* L. Seed. *Ann Bot.* 82:249–261.
- Torres SB, Marcos-Filho J. 2005. Physiological potential evaluation in melon seeds (*Cucumis melo* L.). *Seed Sci. Technol.* 33(2):341-350. doi: 10.15258/sst.2005.33.2.07.
- Vadillo G, Suni M, Cano A. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Rev. Peru. Biol.* 11(1):71-78. doi: 0.15381/rpb.v11i1.2435.
- Willan RL. c1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. FAO, Roma (Italia). [Revisada en: 21 Sep 2017]. <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/ad232s00.htm#TOC>

Zeng YJ, Wang YR. 2009. Methods of topographical tetrazolium testing for seed viability of *Nitraria tangutorum* Bobr. and *N. sibirica* Pall. *Seed Sci. Technol.* 37(3):691-698. doi: 10.15258/sst.2009.37.3.16.

CAPÍTULO 2. Dormancia física y fisiológica en semillas de seis especies de plantas nativas de los páramos en Cundinamarca

RESUMEN

El páramo es uno de los ecosistemas de alta montaña más diversos en el mundo, cuenta con una gran variedad de especies endémicas y brinda un sin número de servicios ecosistémicos de los cuales la regulación del agua es el más representativo. Las plantas que se encuentran en este ecosistema han tenido que adaptarse a las condiciones extremas que lo caracterizan y que limitan la germinación, el reclutamiento y la supervivencia de las poblaciones vegetales. La dormancia es una adaptación que le permite a las semillas regular su germinación en el tiempo de acuerdo a las condiciones externas. Este estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de dormancia en semillas de seis especies nativas de páramo, así como, los tratamientos adecuados para romperla. Para esto se describió la morfología interna y externa de las semillas, seguido por la evaluación de la viabilidad por tetrazolio usando una concentración del 1% y una temperatura de 40° C por 24 horas. Se evaluó la germinación con un tratamiento control y un tratamiento pregerminativo basados en la morfología. Se utilizó una ANOVA para analizar los datos. *E. summapacis*, *E. killipii* y *T. grossa* presentan dormancia fisiológica, donde la imbibición en GA₃ a 400mg/L aumentó en más del 50% su germinación. *B. x candida*, *H. goudotiana* y *B. multiflora* presentan dormancia física y respondieron significativamente al corte de testa aumentando la germinación y disminuyendo tiempos medios de germinación. En conclusión, se documenta la morfología de las semillas y con ella los rasgos descriptores de su tipo de dormancia. Se reporta la presencia de dormancia y los métodos para romperla en semillas de seis especies nativas y varias de ellas endémicas de los páramos del departamento de Cundinamarca, información que brinda

herramientas para continuar con procesos de conservación *ex situ* e *in situ* en estas especies.

Palabras clave: Ácido giberélico, corte de testa, germinación, semillas, tetrazolio, viabilidad.

INTRODUCCIÓN

El páramo es un bioma neotropical, localizado entre el bosque alto andino y el límite inferior de las nieves perpetuas entre los 3.000 a 5.000 m.s.n.m (Cabrera & Ramírez, 2014; Sklenář, Luteyn, Ulloa, Jorgensen, & Dillon, 2005). Es uno de los ecosistemas de alta montaña más diversos en el mundo, donde la mayoría de sus especies son endémicas, esto producto de ser el ecosistema más reciente de los Andes con menos de tres millones de años de formación (Castaño, 2002), y a que las plantas se han tenido que adaptar a las condiciones extremas que lo caracterizan; baja presión del aire y baja temperatura, alta radiación ultravioleta, sequía fisiológica, variabilidad climática diaria y daño físico ocasionado por el granizo o algunos casos por nieve (Sklenář et al., 2005). La germinación y reclutamiento de plántulas son unas de las etapas más sensibles en el mantenimiento de las poblaciones vegetales (Bliss, 1971; Penfield, 2017).

Según Baskin y Baskin (2004), una semilla dormante es aquella que por un periodo determinado de tiempo no tiene la capacidad de germinar pese a que existan las condiciones ambientales ideales para su germinación. La dormancia en semillas se ha reportado como una de las estrategias adaptativas que ha permitido la regeneración y supervivencia en las condiciones drásticas presentes en los ecosistemas de alta montaña (Bliss, 1971; Kaye, 1997; Mora & Vargas, 2007; Schwienbacher, Navarro-Cano, Neuner, & Erschbamer, 2011). Además, en lugares de ambientes extremos, los niveles de dormancia tienden a aumentar y registrar variaciones intra-específicas (Venable, 2007).

Diferenciar semillas inviables o sin embrión de semillas dormantes, es crucial para la interpretación e implementación adecuada de procesos de conservación, propagación o restauración (Hoyle, Steadman, Daws, & Adkins, 2008). Una vez se determina que la semilla es dormante es necesario continuar con la identificación del tipo de dormancia y el tratamiento adecuado para romperla y así promover la germinación (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Con base en la clasificación propuesta por Baskin & Baskin

(2004, 2014b), existen cinco clases de dormancia: Fisiológica (PD), es la más abundante en la naturaleza y se debe a razones fisiológicas en el embrión que permiten detectar cambios ambientales (i.e. Luz, temperatura, sustancias químicas) que a su vez producen cambios en el balance hormonal para dar altos niveles de ácido abscísico (ABA) y bajos niveles de giberelinas GA (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Shu, Liu, Xie, & He, 2016); dormancia morfológica (MD), se presenta en semillas con embriones diferenciados pero subdesarrollados en términos de su tamaño (Baskin & Baskin, 2014b); dormancia morfofisiológica (MPD), presente en semillas con embriones subdesarrollados y adicionalmente con dormancia fisiológica; física (PY), causada por la presencia de testas o cubiertas de la semilla impermeables al agua; y combinada (PY+PD), evidente en semillas con capas impermeables y dormancia fisiológica (Baskin & Baskin, 2004).

Aunque son pocos los trabajos que reportan el comportamiento de la dormancia en las semillas de plantas de páramo, sí se ha documentado la presencia de dormancia en diferentes especies alpinas (Cavieres & Sierra-Almeida, 2018; Giménez-Benavides, Escudero, & Pérez-García, 2005; Schwienbacher et al., 2011; Ulian, Mattana, Pritchard, & Skwierinski, 2013), donde se presenta condiciones ambientales y altitudinales similares. Además, la presencia de dormancia ha sido referenciada en algunas de las familias más representativas del páramo como Asteraceae (Cavieres & Sierra-Almeida, 2018; Dayrell et al., 2017; Hoyle et al., 2008; Schwienbacher et al., 2011), Rosaceae, Solanaceae, (Cavieres & Sierra-Almeida, 2018; Schwienbacher et al., 2011) y Melastomataceae (Dayrell et al., 2017; Silveira, Ribeiro, Oliveira, Fernandes, & Lemos-Filho, 2012).

Por consiguiente, y con el fin de enriquecer la información base sobre la germinación y dormancia en ecosistemas alto andinos, este estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de dormancia en semillas de seis especies nativas de páramo, las cuales en estudios pilotos mostraron bajos porcentajes de germinación, pero altos valores de viabilidad en las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal y descripción morfológica

Frutos y semillas de seis especies nativas fueron recolectadas entre junio de 2017 y noviembre de 2018 en páramos de Cundinamarca- Colombia (Tabla 2.1, Anexo 2), las especies seleccionadas para este estudio fueron aquellas que comparando los resultados de viabilidad por tetrazolio y germinación, se evidenció que podrían presentar algún tipo de dormancia (Ver capítulo 1). Los frutos fueron colectados en su punto óptimo de maduración de mínimo cinco plantas madre por especie. En el caso de las Espeletias se colectó material de al menos 100 individuos debido a la alta densidad poblacional. Ejemplares botánicos fueron colectados para la identificación taxonómica y depositados en el herbario del JBB.

El material recolectado fue transportado al Laboratorio de Germinación del Jardín Botánico de Bogotá (JBB), donde se realizó el beneficio y limpieza de las semillas. Posteriormente se realizó la descripción morfológica externa e interna basada en Niembro (1989) a diez semillas por especie, con ayuda de un estereoscopio Motic SMZ-171(Hong Kong) y el software Motic Images 3.3.

Tabla 2.1. Especies de páramo evaluadas con sus respectivos lugares de recolecta y hábito de crecimiento.

| Familia | Especie | Origen ^a | Hábito | Lugar de colecta | Coordenadas |
|-----------------|---------------------------------|---------------------|--------|------------------|---------------|
| Asteraceae | <i>Espeletia summapacis</i> | Nativa | C | Páramo | 4° 16' Norte |
| | Cuatrec. | (Endémica) | | Sumapaz | 74° 12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia killipii</i> | Nativa | C | Páramo | 4° 25' Norte |
| | Cuatrec. | (Endémica) | | Pasquilla | 74° 10' Oeste |
| Melastomataceae | <i>Tibouchina grossa</i> (L.f.) | Nativa | C | Páramo | 4° 22' Norte |
| | Cogn. | | | Curubital | 74° 06' Oeste |
| Rosaceae | <i>Hesperomeles</i> | Nativa | A | Páramo | 4° 27' Norte |
| | <i>goudotiana</i> (Decne.) | | | (Endémica) | Romeral |
| | <i>Killip</i> | | | | |

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------------|---|----------------------|-------------------------------|
| Alstromeriaceae | <i>Bomarea multiflora</i> (L. f.) Mirb. | Nativa (Casi Endémica) | T | Páramo Calderitas | 4° 25' Norte 74° 08' Oeste |
| Solanaceae | <i>Brugmansia x candida</i> Pers. | Nativa | A | Páramo Verjones | 4° 39' Norte 74° 00' Oeste |

A. Arbusto. C. Caulirosula. T. Trepadora

^a(Bernal, Gradstein, & Celis, 2019; POWO,2019)

Viabilidad de semillas y germinación

La prueba de viabilidad se realizó mediante la tinción con tetrazolio (TZ), en cuatro réplicas de 50 semillas por especie utilizando la metodología descrita por Mancipe-Murillo et al., (2018). Las semillas se hidrataron en agua microfiltrada durante 24 horas, posteriormente se realizó un corte lateral en la testa y se colocaron en una solución de TZ al 1% a 40°C en un horno Binder ED 53-UL (Alemania) en oscuridad durante 24 horas. Se consideró una semilla viable cuando el embrión obtuvo una coloración uniforme roja o rosa oscuro.

Para la prueba de germinación se utilizaron cuatro réplicas de 50 semillas, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5%, lavadas con abundante agua antes del montaje de los experimentos (Muñoz & Ackerman, 2011), fueron sembradas en cajas Petri con doble papel filtro y agua destilada (medio estándar de germinación) y estuvieron bajo condiciones controladas en una cámara de germinación Thermoline (Australia) con un fotoperiodo de 12 horas, y una temperatura de 20/10 ± 2.5°C (Pérez-Martínez, Rodríguez, Melgarejo, & Vargas R, 2014) y una humedad de 75 ±5 %. La germinación fue tomada como la emergencia de la radícula de la cubierta seminal (Salisbury & Ross, 1992). Finalizada la evaluación, se realizó la prueba de corte en las semillas no germinadas para evaluar la presencia de embrión; las semillas vacías se excluyeron del porcentaje de germinación (Hoyle et al., 2008).

Tratamientos pre-germinativos

Con base en la diferencia obtenida en la viabilidad por la prueba de TZ y germinación, sumado a los rasgos morfológicos descritos para las semillas evaluadas con los que se observan probables indicios de dormancia (Tabla 2.2), se aplicaron pre-tratamientos de

germinación: Imbibición en una solución de ácido giberélico (GA₃) a 400 ppm (Amri, 2010; Mukherjee, 2018; Sarihan, Ipek, Khawar, Atak, & Gurbuz, 2005) durante 24 horas para *E. summapacis*, *E. killipii* y *T. grossa*. En *B. x candida*, *H. goudotiana* y *B. multiflora* se escarificó la testa por medio de un corte lateral (Baskin, Baskin, & Li, 2000); en *B. multiflora* debido a que se registró contaminación por hongos debido al corte, se realizaron únicamente surcos en la testa de forma manual con la ayuda de una cuchilla de laboratorio.

Análisis de datos

Se determinó el porcentaje de germinación (PG) sobre las semillas con embrión y el tiempo medio de germinación (TMG) utilizando las siguientes ecuaciones (Tompsett & Pritchard, 1998; Ranal & Santana, 2006):

$$PG = \left(\frac{N}{N_s} \right) \times 100 \quad TMG = \frac{\sum_{t=1}^k ni \, ti}{\sum_{t=1}^k ni}$$

Donde, N es el número de semillas germinadas y N_s el número total de semillas sembradas con embrión en medio estándar de germinación, *ni* es el número de semillas germinadas en la medida *i*ésima; *ti* es el tiempo en días en la medida *i*ésima y *k* es el tiempo total de germinación en días.

Se realizó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, y un análisis de varianza a una vía (ANOVA) para evaluar diferencias entre la viabilidad por TZ y la germinación de semillas sin tratamientos pre-germinativos, así como para evaluar las diferencias en el PG y TMG entre los tratamientos de germinación evaluados en cada especie, seguido de la prueba de rangos múltiples Tukey cuando fue necesario. En todos los análisis estadísticos se utilizó una confianza del 95% y el paquete estadístico StatGraphics Centurion versión 16.1.11.

RESULTADOS

Descripción morfológica

Las semillas de las especies evaluadas se pueden dividir en dos grandes grupos según sus características morfológicas. El primer grupo, compuesto por *E. summapacis*, *E. killipii*

y *T. grossa*, se caracteriza por presentar semillas pequeñas con un tamaño promedio de 2,5 x 0,9 mm, tienen una superficie lustrosa, consistencia papirácea y un peso de 0,001, 0,001 y 0,00001 g respectivamente (Fig. 2.1). En cuanto a los rasgos morfológicos que permiten diferenciar preliminarmente entre las clases de dormancia, se encuentra que, estas especies presentan semillas con testas delgadas y blandas, no presentan endospermo y el embrión está totalmente desarrollado y cubre todo el interior de la semilla (Tabla 2.2, Fig. 2.1).

En el segundo grupo está *B. x candida*, *H. goudotiana* y *B. multiflora*, con semillas más grandes en promedio de 6,2 x 5,1 mm, superficie lustrosa y opaca solo en *B. x candida*, con consistencia fuerte entre coriácea y leñosa, con un peso de 0,084, 0,019 y 0,048 g, respectivamente (Fig. 2.1); en cuanto a características morfológicas, presentan testas gruesas y duras, un embrión totalmente desarrollado en *B. x candida*, *H. goudotiana*, mientras en *B. multiflora* el embrión no es desarrollado, solo *B. x candida* y *B. multiflora* presentan un endospermo abundante (Tabla 2.2, Fig. 2.1).

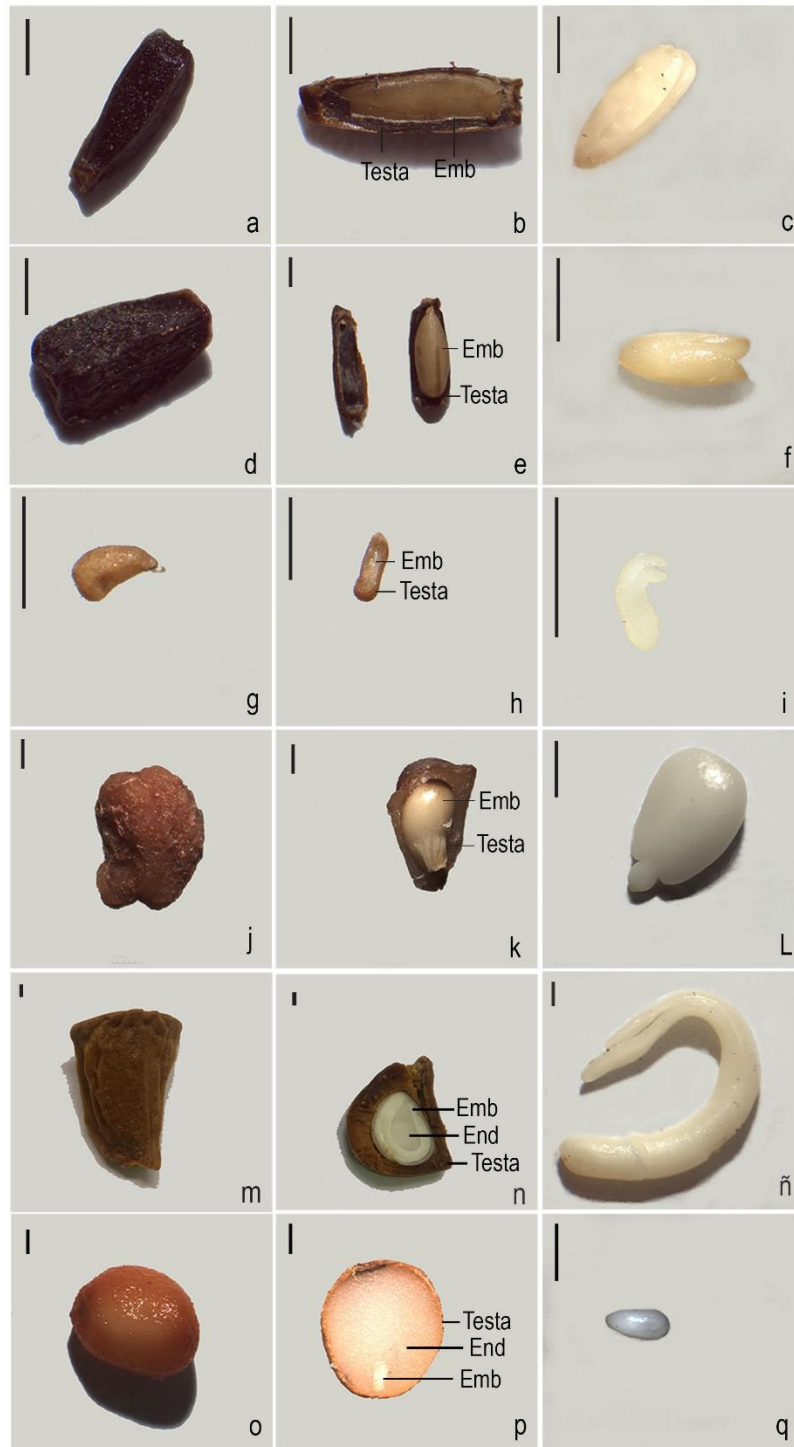


Figura 2.1. Morfología externa, interna (corte longitudinal) y embrión de las semillas de seis especies de plantas de páramo, respectivamente. **a., b., c.** *Espeletia summapacis*, **d., e., f.** *Espeletia killipii*, **g., h., i.** *Tibouchina grossa*, **j., k., l.** *Hesperomeles goudotiana*, **m., n., ñ.** *Brugmansia x candida*, **o., p., q.** *Bomarea multiflora*. Abreviaciones, Emb: embrión, End: Endospermo. Escala = 1 mm.

Tabla 2.2. Rasgos morfológicos en las semillas de seis especies nativas de páramo (n=10).

| ESPECIE | TESTA | | ENDOSPERMO | EMBRIÓN | | | TIPO DE DORMANCIA |
|--------------------------------|--------------|-------------|-------------------------------|-----------------|----------|-------------------------------------|-------------------|
| | Consistencia | Grosor (mm) | | Tipo de embrión | Posición | Cotiledones | |
| <i>Espeletia summapacis</i> | Blanda | D 0,05 | Ausente | Lineal-Recto | Central | Diferenciados y aciculares | Fisiológica |
| <i>Espeletia killipii</i> | Blanda | D 0,05 | Ausente | Lineal-Recto | Central | Diferenciados y aciculares | Fisiológica |
| <i>Tibouchina grossa</i> | Blanda | D 0,01 | Ausente | Lineal-Recto | Central | Diferenciados y aciculares | Fisiológica |
| <i>Hesperomeles goudotiana</i> | Dura | G 0,64 | Ausente | Espatulado | Central | Diferenciados, delgados y foliáceos | Física |
| <i>Bomarea multiflora</i> | Dura | G 0,1 | Más de la mitad de la semilla | Lineal-recto | Basal | Diferenciados y aciculares | Física |
| <i>Brugmansia x candida</i> | Dura | G 2,50 | La mitad de la semilla | Lineal-anular | Central | Diferenciados, delgados y foliáceos | Física |

D. Delgada, G. Gruesa

Viabilidad de semillas y germinación

Se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad en las semillas de cinco especies por la prueba de tetrazolio, solo *T. grossa* presentó una baja viabilidad (22%). La germinación de las semillas sin tratamientos pre-germinativos (Control) tras 30 días de evaluación en las seis especies, fue significativamente menor ($P < 0,05$) a lo obtenido en la prueba de TZ (Tabla 2.3), lo que indica que presencia de dormancia en las semillas de las especies evaluadas.

Tabla 2.3. Porcentaje de viabilidad de semillas obtenido por la prueba de tetrazolio, y prueba de germinación 30 días después de siembra en medio estándar de germinación sin tratamiento pre-germinativo (control) con un fotoperiodo de 12 horas, y $20/10 \pm 2.5^\circ\text{C}$. Medias seguidas por letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$) ($n=4$).

| ESPECIE | PORCENTAJE DE VIABILIDAD (media \pm ES) | |
|--------------------------------|---|----------------|
| | Germinación 30 dds | Tetrazolio |
| <i>Espeletia sumapacis</i> | 11 \pm 6 a | 69 \pm 1,9 b |
| <i>Espeletia killipii</i> | 35 \pm 8 a | 88 \pm 2,4 b |
| <i>Tibouchina grossa</i> | 0 a | 22 \pm 3,6 b |
| <i>Hesperomeles goudotiana</i> | 0 a | 61 \pm 7,7 b |
| <i>Bomarea multiflora</i> | 0 a | 91 \pm 2,1 b |
| <i>Brugmansia x candida</i> | 5 \pm 1,7 a | 79 \pm 3,1 b |

dds. Días después de la siembra en medio estándar de germinación. **ES.**

Error estándar

La presencia de dormancia es confirmada por los resultados en la prueba de germinación, como se observa en la figura 2.2, el incluir un tratamiento pre-germinativo antes de la siembra de las semillas potenció el porcentaje de germinación en promedio en un 50% (Porcentaje de germinación acumulada). En *E. summapacis* ($F_{1,6}= 0,78$; $P= 0,41$) y *E. killipii* ($F_{1,6}= 3,91$; $P=0,09$) no se presentó diferencia estadística en el PG obtenido entre los tratamientos (Fig. 2.2), esto debido principalmente a la gran variación del error estándar, el cual se pudo ver afectado por la fácil contaminación por hongos que presentan las semillas de este género. Sin embargo, se evidencia que efectivamente se logra una mayor germinación con la imbibición de las semillas en 400 mg/L GA_3 y además se disminuye el TMG.

En *T. grossa* se presentaron diferencias en el PG ($F_{1,6}=7,93$; $P= 0,03$) y el TMG ($F_{1,6}=265$; $P < 0,05$). No se registró germinación sin tratamiento pre-germinativo mientras que con la aplicación de 400 mg/L de GA_3 se obtuvo una germinación del 22% (Fig. 2.2).

En *B. x candida* ($F_{1,6}= 14,73$; $P= 0,008$) y en *B. multiflora* ($F_{2,9}= 5,82$; $P= 0,02$) la escarificación de la testa permitió el aumento de la germinación y la disminución de los tiempos de germinación ($P < 0,05$). En *H. goudotiana* el uso de la escarificación aunque

aumentó el PG no presentó diferencias significativas ($F_{1,6}= 1,07$; $P= 0,34$), sin embargo, si disminuyó significativamente el TMG ($F_{1,6}= 486$; $P<0,05$), que pasó de ser 103 a 26 días.

Los resultados obtenidos sugieren que *E. summapacis*, *E. killipii* y *T. grossa* presentan dormancia fisiológica leve o poco profunda que puede romperse con el uso de ácido giberélico. Por su parte *B. x candida*, *B. multiflora* y *H. goudotiana* presentan dormancia física, la cual puede ser superada por medio de la escarificación mecánica en la testa.

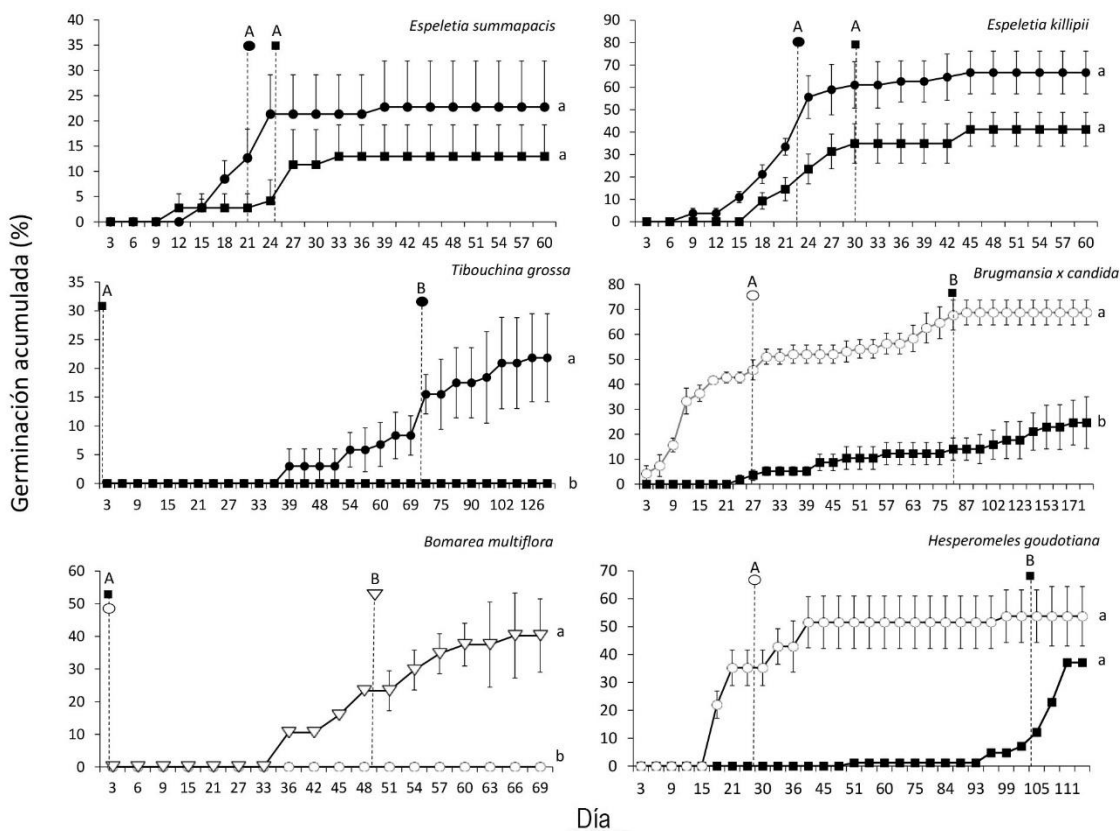


Figura 2.2. Porcentaje de germinación (PG) acumulado (\pm ES) y tiempo medio de germinación (TMG, líneas verticales) en semillas de seis especies nativas de páramo sembradas con tratamiento pre-germinativo según su tipo de dormancia; Control (-■-), imbibición en GA_3 [400 mg/ L] (-●-), corte de testa (-○-), surcos en la testa (-△-). Letras iguales muestra que no hay diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey ($P< 0.05$), letras minúsculas al final de la curva para el PG, y letras mayúsculas en la parte superior de las líneas verticales para el TMG. (n=4).

DISCUSIÓN

La morfología de las semillas tiene importantes aplicaciones para entender la presencia de dormancia y el comportamiento germinativo de las especies (Baskin & Baskin, 2007; Forbis, Floyd, & De Queiroz, 2002; Mattana, Stuppy, Fraser, Waller, & Pritchard, 2014). Los rasgos descriptores de dormancia como el tamaño, el grosor, consistencia y permeabilidad de la testa pueden indicar dormancia física y pueden ser identificados antes de comenzar cualquier experimento germinativo o de propagación con el fin de utilizar los tratamientos adecuados que potencialicen la germinación de las semillas (Baskin & Baskin, 2014a; Baskin & Baskin, 2004; Mattana et al., 2014). En este estudio se identificó que *B. multiflora* tiene una testa dura y un abundante endospermo, mientras que *B. x candida* y *H. goudotiana* presentan testas muy duras y gruesas, ambas características impiden la imbibición de las semillas y por ende la germinación (Fig. 2.1).

Por su parte, la descripción morfológica de *E. summapacis*, *E. killipii* y *T. grossa*, mostró que sus semillas no tienen impedimentos físicos para la germinación y que además cuentan con un embrión diferenciado (Fig. 2.1), lo que dificulta la identificación rápida de algún tipo de dormancia, y esta solo puede ser identificada por la evaluación de la viabilidad (Hoyle et al., 2008; Penfield, 2017).

La determinación de viabilidad de las semillas con tetrazolio es una técnica rápida y confiable (Rao et al., 2007), además, por medio de la comparación de sus resultados con la germinación permite diferenciar semillas vacías, inviables y dormantes (Mancipe-Murillo et al., 2018); en el caso de las especies estudiadas en este trabajo esta comparación permitió identificar que presentan más de un 60% de semillas dormantes (Tabla 2.3), las cuales equivalen al número de semillas viables sin germinar tras 30 días de evaluación (Baskin & Baskin, 2014a). La presencia de semillas dormantes y no dormantes dentro de una especie favorece la supervivencia y establecimiento de nuevas poblaciones, ya que permite distribuir la germinación en el tiempo y con ella aumentar las posibilidades de establecimiento exitoso de sus plántulas (Snyder, 2006).

Si bien la dormancia es una característica adaptativa que inhibe la germinación por un tiempo determinado (Née, Xiang, & Soppe, 2017; Penfield, 2017; Schwienbacher et al., 2011), en estudios de conservación de semillas, propagación y restauración es necesario identificarla para implementar tratamientos pre-germinativos y aumentar los porcentajes de

germinación. De acuerdo con el sistema de clasificación de dormancia propuesto por Baskin & Baskin (2004; 2014b), *E. summapacis*, *E. killipii* y *T. grossa* presentan una dormancia fisiológica, la más común y ampliamente reportada, este tipo de dormancia presenta diferentes niveles: profunda, intermedia y no profunda, y básicamente puede ser removida por medio de estratificación y hormonas promotoras de germinación dependiendo del nivel (Baskin & Baskin, 2004). En el caso de estas tres especies presentaron dormancia poco profunda ya que con el uso de GA₃ pudo romperse la dormancia (Baskin & Baskin, 2004).

La concentración de GA₃ usada (400 mg/L) al igual que lo reportado por diferentes autores (Amri, 2010; Mukherjee, 2018; Sarihan, Ipek, Khawar, Atak, & Gurbuz, 2005) fue adecuada para romper la dormancia en todas las semillas de *T. grossa*; sin embargo, para las Espeletias aunque el PG aumentó en un 50% con respecto al tratamiento control, no se logró obtener germinación en todas las semillas, por lo cual es recomendable realizar nuevos experimentos que permitan encontrar la concentración ideal para estas especies.

B. x candida, *B. multifora* y *H. goudotiana* presentaron una excelente respuesta a la escarificación realizada para romper su dormancia física (Fig. 2.2), aumentando significativamente la germinación y disminuyendo el TMG. El corte de testa en la mayoría de especies con dormancia física puede ser suficiente para permitir la entrada de agua, la activación metabólica y la germinación de las semillas (Baskin, Baskin, & Li, 2000). La presencia de estas cubiertas seminales gruesas y duras en estas tres especies pueden estar relacionadas con su método de dispersión, ya que presentan frutos carnosos que pueden ser consumidos por diferentes animales (Rios, Giraldo, & Correa, 2004; Vargas, 2002) y por ende requieren de estructuras de protección para evitar el daño del embrión al pasar por el tracto digestivo. Una vez en el suelo las semillas continúan enfrentándose a presiones ambientales donde se ha probado que tener testas duras brinda una ventaja disminuyendo el daño ocasionado por microorganismos del suelo (Dalling, Davis, Schutte, & Elizabeth Arnold, 2011) y además el estudio de Paulsen et al. (2013) sugiere que semillas duras tienen más oportunidades de sobrevivir a la dispersión secundaria, que principalmente en los páramos se da por roedores y en muchas ocasiones termina con la depredación de la semilla, pues estas testas impiden la emisión de volátiles fuera de la semilla y con ello logran evadir o ser detectadas por estos animales.

En conclusión, este trabajo aporta nueva información sobre las especies de páramo, comenzando por documentar la morfología de las semillas que más allá de brindar información sobre posibles tipos de dormancia, podrán ser usados para complementar rasgos de historia de vida y funcionales de estas especies. Se reporta la presencia de dormancia en semillas y los métodos para romperla en seis especies nativas, varias de ellas endémicas de los páramos del departamento de Cundinamarca, información que contribuye a entender los procesos iniciales de la germinación y establecimiento de sus semillas; además brinda herramientas para continuar con procesos de conservación *ex situ* e *in situ* en estas especies.

BIBLIOGRAFIA

- Amri, E. (2010). Germination of *Terminalia sericea* Buch ex Dc. seeds: Effects of temperature regime, photoperiod, gibberellic acid and potassium nitrate. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 8(6), 722–727. Retrieved from [http://idosi.org/aejaes/jaes8\(6\)/17.pdf](http://idosi.org/aejaes/jaes8(6)/17.pdf)
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2007). A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research*, 17(1), 11–20. <http://doi.org/10.1017/S0960258507383189>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014a). *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Journal of Chemical Information and Modeling (Second Edi). San Diego, USA: Academic Press/Elsevier. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014b). Types of Seeds and Kinds of Seed Dormancy. *Seeds*. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-416677-6.00003-2>
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1–16. <http://doi.org/10.1079/ssr2003150>
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2), 139–152. <http://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>

-
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2019). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Retrieved June 6, 2019, from <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bliss, L. C. (1971). Artic and alpin plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2, 405–438.
- Cabrera, M., & Ramírez, W. (Eds.). (2014). Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación (Instituto). Bogotá, D.C Colombia. Retrieved from <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31451>
- Castaño, C. (2002). Colombia alto andina y la significancia ambiental del bioma páramo. In C. Jaramillo (Ed.), *Congreso Mundial de Páramos* (pp. 24–48). Paipa.
- Cavieres, L. A., & Sierra-Almeida, A. (2018). Assessing the importance of cold-stratification for seed germination in alpine plant species of the High-Andes of central Chile. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 30(September 2017), 125–131. <http://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.09.005>
- Dalling, J. W., Davis, A. S., Schutte, B. J., & Elizabeth Arnold, A. (2011). Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*, 99(1), 89–95. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01739.x>
- Dayrell, R. L. C., Garcia, Q. S., Negreiros, D., Baskin, C. C., Baskin, J. M., & Silveira, F. A. O. (2017). Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. *Annals of Botany*, 119(2), 267–277. <http://doi.org/10.1093/aob/mcw163>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination - Finch-Savage - 2006 - *New Phytologist* - Wiley Online Library. *The New Phytologist*, 171(3), 501–23. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Forbis, T. A., Floyd, S. K., & De Queiroz, A. (2002). The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: Implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*, 56(11), 2112–2125. <http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00137.x>

- Giménez-Benavides, L., Escudero, A., & Pérez-García, F. (2005). Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal , interpopulation and interannual variability. *Ecological Research*, 20, 433–444. <http://doi.org/10.1007/s11284-005-0059-4>
- Hoyle, G. L., Steadman, K. J., Daws, M. I., & Adkins, S. W. (2008). Physiological dormancy in forbs native to south-west Queensland: Diagnosis and classification. *South African Journal of Botany*, 74(2), 208–213. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.11.005>
- Kaye, T. (1997). Seed dormancy in high elevation plants: implications for ecology and restoration. *Native Plants Society of Oregon*, (April), 115–120. Retrieved from http://appliedeco.org/reports/alpine_germination.pdf
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., & Pérez-Martínez, L. V. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia*, 40(2), 366–382. <http://doi.org/10.15446/caldasia.v40n2.68251>
- Mattana, E., Stuppy, W. H., Fraser, R., Waller, J., & Pritchard, H. W. (2014). Dependency of seed dormancy types on embryo traits and environmental conditions in *Ribes* species. *Plant Biology*, 16(4), 740–747. <http://doi.org/10.1111/plb.12115>
- Mora, F., & Vargas, O. (2007). Germination dynamics, seed dormancy and seedling recruitment in *Puya cryptantha* and *P. trianae*, two giant rosettes of the colombian Páramos, (February 2016).
- Muñoz, M. C., & Ackerman, J. D. (2011). Spatial distribution and performance of native and invasive *Ardisia* (Myrsinaceae) species in Puerto Rico: The anatomy of an invasion. *Biological Invasions*, 13(7), 1543–1558. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9912-7>
- Mukherjee, D. (2018). Effect of different seed priming treatments on germination and seedling establishment of two threatened endangered medicinal plants of Darjeeling Himalaya. In A. Rakshit & H. B. Singh (Eds.), *Advances in seed priming* (p. 307). Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. http://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_13

-
- Née, G., Xiang, Y., & Soppe, W. J. (2017). The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 8–14. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.002>
- Niembro, A. (1989). *Semillas de plantas leñosas. Morfología Comparada* (Primera ed). Mexico D.F: LIMUSA, S.A de C.V.
- Paulsen, T. R., Colville, L., Kranner, I., Daws, M. I., Högestedt, G., Vandvik, V., & Thompson, K. (2013). Physical dormancy in seeds: A game of hide and seek? *New Phytologist*, 198(2), 496–503. <http://doi.org/10.1111/nph.12191>
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27(17), R874–R878. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>
- POWO. (2019). *Plants of the World Online*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved June 6, 2019, from <http://www.plantsoftheworldonline.org>
- Ranal, M. A., & Santana, D. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1), 1–11. <http://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8*. Italia: Biodiversity International. Retrieved from http://books.google.com/books?id=sv_FnxOQiCcC&pgis=1
- Rios, M., Giraldo, P., & Correa, D. (2004). *Guía de frutos y semillas de la cuenca media del río Otun*. Santiago de Cali.
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1992). *Plant physiology*. Belmont: Wadsworth Pub. Co.
- Sarihan, E. O., Ipek, A., Khawar, K. M., Atak, M., & Gurbuz, B. (2005). Role of GA3 and KNO3 in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 883–887.
- Schwiebacher, E., Navarro-Cano, J. A., Neuner, G., & Erschbamer, B. (2011). Seed dormancy in alpine species. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(10), 845–856. <http://doi.org/10.1016/j.flora.2011.05.001>

- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., & He, Z. H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, 9(1), 34–45. <http://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>
- Silveira, F. A. O., Ribeiro, R. C., Oliveira, D. M. T., Fernandes, G. W., & Lemos-Filho, J. P. (2012). Evolution of physiological dormancy multiple times in Melastomataceae from Neotropical montane vegetation. *Seed Science Research*, 22(1), 37–44. <http://doi.org/10.1017/s0960258511000286>
- Sklenář, P., Luteyn, J. L., Ulloa, C., Jorgensen, P. M., & Dillon, M. O. (2005). *Flora genérica de los páramos: guía ilustrada de las plantas vasculares*. New York Botanical Garden.
- Snyder, R. E. (2006). Multiple risk reduction mechanisms: can dormancy substitute for dispersal? *Ecology Letters*, 9, 1106–1114. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00962.x>
- Tompsett, P. B., & Pritchard, H. W. (1998). The Effect of Chilling and Moisture Status on the Germination, Desiccation Tolerance and Longevity of *Aesculus hippocastanum* L. Seed. *Annals of Botany*, 82(2), 249–261. <http://doi.org/10.1006/anbo.1998.0676>
- Ulian, T., Mattana, E., Pritchard, H. W., & Skwierinski, R. (2013). Seasonality effects on plant phenology and seed ecology in *Oritrophium peruvianum* (Asteraceae), a threatened tropical alpine species. *South African Journal of Botany*, 88, 278–285. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.08.006>
- Vargas, W. G. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montaña Quindío y los Andes Centrales*. Manizales.: Centro editorial Universidad de Caldas.
- Venable, D. L. (2007). Bet Hedging in a Guild of Desert Annuals. *Ecology*, 88, 1086–1090. <http://doi.org/10.2307/27651206>

CAPÍTULO 3. Potencial de conservación *ex situ* de semillas de 19 especies de páramo.

RESUMEN

El páramo es un ecosistema de alta montaña relativamente joven que alberga una alta diversidad y endemismos; sin embargo, producto de la tala, la agricultura, ganadería, minería, entre otras actividades humanas no controladas, su biodiversidad se encuentra en peligro. Los Bancos de semillas nacen como una estrategia de conservación *ex situ* que permite almacenar y salvaguardar la diversidad en forma de semilla por largos periodos de tiempo; sin embargo, es clave conocer el tipo de tolerancia a la desecación de las semillas antes de poder almacenarlas en un banco. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tolerancia a la desecación en semillas de 19 especies de páramo. Se realizaron medidas morfológicas de las semillas y se determinó el contenido de humedad (CH); posteriormente, se realizaron ensayos de germinación a dos contenidos de humedad (semillas frescas y con un 5% de CH) y se evaluó el porcentaje de germinación y tiempo medio de germinación (TMG). Se obtuvo en promedio un 50% de germinación en las especies y TMG de 40 días. La viabilidad no se vio afectada al disminuir el contenido de humedad en 16 especies lo que indica que son semillas ortodoxas y variables morfológicas apoyan esta tendencia. Las tres especies restantes parecen tener un comportamiento intermedio ya que la viabilidad se vio parcialmente afectada por la desecación de las semillas. Las especies evaluadas presentan un gran potencial para ser conservadas en bancos de germoplasma lo que contribuye a la conservación de la diversidad de las especies nativas de zonas altoandinas tropicales, con las cuales se pueden implementar protocolos de germinación para la propagación y reintroducción en programas de restauración.

Palabras clave: Banco de semillas, germinación, tolerancia a la desecación, ortodoxa, intermedia.

INTRODUCCIÓN

El páramo es un ecosistema natural que se encuentra en la alta montaña tropical entre el límite continuo del bosque y las nieves perpetuas (Llambí et al., 2012), entre los 3.000 a 5.000 m.s.n.m (Cabrera & Ramírez, 2014; Sklenář, Luteyn, Ulloa, Jorgensen, & Dillon, 2005). Es un ecosistema muy joven con una edad aproximada de dos a cuatro millones de años (Cortés-Duque & Sarmiento, 2013; Hofstede, Segarra, & Vásconez, 2003; Llambí et al., 2012), y presenta la mayor biodiversidad entre los ecosistemas de alta montaña en el mundo (Sklenář et al., 2005). En Sudamérica, los páramos forman un corredor de fragmentos o islas en la cordillera de los Andes que van desde Venezuela hasta el norte de Perú, lo cual junto con las condiciones extremas características de este ecosistema, han desencadenado una serie de adaptaciones en las plantas que allí habitan, al punto de lograr que el 60% de las especies de plantas que se encuentran en los páramos sean endémicas (Llambí et al., 2012).

Sin embargo, en Colombia es justamente los Andes la segunda región geográfica más deforestada en el país (IDEAM, 2018), esto sumado al gran impacto que ejerce los disturbios por ganadería, agricultura, minería, presencia de especies invasoras, entre otros, pone en riesgo la biodiversidad de este ecosistema tanto a nivel de especie, poblaciones y comunidades, como de sus servicios ecosistémicos (Cortés-Duque & Sarmiento, 2013). Esta no es la única amenaza que presenta este ecosistema, Herzog, Martínez, Jørgensen, & Tiessen (2010), exponen que debido al cambio climático grandes cambios que afectan la biodiversidad se pronostican en los páramos, por ejemplo se estima que alrededor del 35% de las especies de aves y el 60% de las especies de plantas se extinguirán o se pondrán en peligro crítico para 2080 (IPCC 2007).

Ante esta realidad, es necesario implementar acciones encaminadas a la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de las especies vegetales que permitan salvaguardarlas y protegerlas (de Viana, Mosiario, & Morandini, 2009). Una de las estrategias de

conservación vegetal *ex situ* más utilizadas son los bancos de germoplasma en forma de semillas, debido a su bajo costo de mantenimiento, facilidad de almacenamiento y a la capacidad de utilizar el material vegetal a corto o largo plazo según se requiera (Rao et al., 2007), además estos permiten mantener la diversidad genética de poblaciones y ser una fuente robusta de material vegetal para proyectos de restauración ecológica (Hay & Probert, 2013). Sin embargo, los esfuerzos de conservación se han centrado principalmente en especies alimenticias y de cultivo; menos del 1% de las especies almacenadas en los bancos de germoplasma corresponden a especies nativas (Hay & Probert, 2013; Rao et al., 2007). Es por esto, que la información sobre la longevidad, tipo de semilla según la tolerancia a la desecación y las condiciones de almacenamiento de estas especies es muy escaso, y se requiere investigar acerca de los requerimientos germinativos, su viabilidad, contenido de humedad, tipos de dormancia y tiempo de almacenamiento (Hong et al. 1998).

Entre las variables mencionadas anteriormente la tolerancia a la desecación permite determinar si una semilla puede ser o no conservada bajo los estándares de un banco de semillas (Medeiros & Eira, 2006). De esta forma encontramos que las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, intermedias y recalcitrantes (Magnitskiy & Plaza, 2007). Se consideran semillas ortodoxas aquellas que toleran una deshidratación hasta del 5% en el contenido de humedad, debido a que la fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, resultado de la separación de funículos entre 40 y 50 días después de la polinización. En este periodo las semillas logran adquirir la tolerancia a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y potencial de almacenamiento (Nkang, Omokaro, Egbe, & Amanke, 2003). Las semillas recalcitrantes no experimentan deshidratación en la planta madre, se dispersan en una condición húmeda y metabólicamente activa, por lo que pierden rápidamente la capacidad de germinar al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (Kermode & Finch-Savage, 2002), por eso pueden tolerar la deshidratación entre un 15% y 50% de contenido de humedad. Existen semillas con características intermedias entre ortodoxas y recalcitrantes que toleran la deshidratación entre un 10 % y 12,5 % de contenido de humedad (Rao et al., 2007).

En este sentido y con el fin de contribuir en la conservación de las semillas de las especies de páramo, nuestro objetivo fue evaluar el potencial de conservación *ex situ* bajo la estrategia de bancos de semillas en 19 especies recolectadas en diferentes páramos en el departamento de Cundinamarca Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal y descripción morfológica

Se colectaron semillas de frutos maduros de 19 especies distribuidas en diferentes páramos de Cundinamarca (Colombia) entre el año 2014 y 2018 (Tabla 3.1, Anexo 2). De cada especie se colectó material vegetal como mínimo de cinco plantas madre. Estas especies están distribuidas en nueve familias y 12 géneros y, según su origen diez especies son nativas, ocho endémicas y una casi endémica (Bernal, Gradstein, & Celis, 2019; POWO, 2019).

Las semillas se extrajeron de los frutos manualmente en el Laboratorio de Germinación del Jardín Botánico de Bogotá, seleccionando únicamente las semillas maduras y sin daños visibles (Ayala *et al.* 2004). En diez semillas por especie se midió la longitud y el ancho en la parte media de semilla, y se realizó la descripción morfológica con base en la descripción de Niembro (1989), de aquellas características que pueden estar relacionadas con la tolerancia a la desecación, como el tamaño, grosor de la testa y presencia de endospermo (Pritchard *et al.*, 2004).

Los datos fueron tomados con la ayuda de un estereoscopio Motic® SMZ-168 (Hong Kong, China) y el programa Motic Images Plus 2.0 (Hong Kong).

Pruebas de germinación y tolerancia a la desecación

Se determinó el contenido de humedad inicial de las semillas (CHi) en $3 \pm 0,5$ gramos de semillas a 150°C por un tiempo promedio de siete minutos por medio del analizador de humedad OHAUS MB45 (Parsippany, Nueva Jersey).

Las pruebas de germinación se llevaron a cabo en una cámara de germinación Thermoline (New South Wales, Australia) bajo condiciones controladas, con un fotoperíodo de 12 horas, $20/10 \pm 2,5$ °C (Pérez-Martínez, Rodríguez, Melgarejo, & Vargas R, 2014) y una humedad de 75 ± 5 %, las cuales se monitorearon con un Data Logger EBCHQ 94150. Se evaluó el porcentaje de germinación en las semillas a dos contenidos de humedad, en las semillas frescas, es decir con el CH inicial (CH_i), y después de desecar la semilla al $5,0 \pm 2,0$ % de CH, es decir con el CH reducido (CH_r). La reducción del contenido de humedad, se realizó en una cámara de secado con sílica gel (Casa comercial Chemí, con tamaño de partícula de 1- 3 mm) en proporción 2:1 (sílica:semillas) basados en la fórmula:

$$PFS = PIS * \left(\frac{100 - CH_i}{100 - CH_r} \right)$$

Donde, PSF: Peso final de las semillas; PIS: Peso inicial de las semillas; CH_i: Contenido de humedad inicial; CH_r: Contenido de humedad al que se quiere reducir las semillas (Rao *et al.* 2007).

Solo para aquellas especies que por investigaciones previas se determinó que presentan dormancia y sus semillas no iban a germinar sin un pre-tratamiento se utilizó en ambas pruebas los siguientes tratamientos: En *T. grossa*, imbibición de las semillas por 24 horas en 400 mg/L GA₃ y, en *B. multiflora*, *H. goudotiana* y *B. x candida* escarificación de la testa (Ver Capítulo 2).

Se utilizaron cuatro réplicas de 50 semillas para cada experimento. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5%, lavadas con abundante agua antes del montaje de los experimentos (Muñoz *et al.* 2011) y sembradas en cajas Petri con doble papel filtro (medio estándar de germinación). Los experimentos de germinación fueron revisados cada tercer día, y finalizaron tres semanas después de no observar germinación. La germinación se tomó como la emergencia de la radícula a través de la testa de la semilla (Salisbury & Ross 1992). Finalizada la evaluación, se realizó la prueba de corte en las semillas no germinadas para evaluar la presencia de embrión, las semillas vacías se excluyeron al calcular el porcentaje de germinación (Hoyle *et al.*, 2008).

Análisis de datos

Se calculó el porcentaje de germinación (PG) sobre las semillas con embrión y el tiempo medio de germinación (TMG) con base en las siguientes fórmulas (Ranal *et al.* 2006; Tompsett & Pritchard 1998):

$$PG = \left(\frac{N}{Ns} \right) * 100$$

$$MGT = \frac{\sum_{t=1}^k ni \cdot ti}{\sum_{t=1}^k ni}$$

Donde, N es el número de semillas germinadas, Ns es el número de semillas totales, ni es el número de semillas germinadas en la i ésima toma de datos, ti es el tiempo (en días) de la i ésima toma de datos y k es el tiempo (en días) de duración de la prueba de germinación. Se realizó el test de normalidad con la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov, y un análisis de varianza a una vía (ANOVA) para evaluar las diferencias en el PG y TMG entre los tratamientos evaluados (CHI y CHR), seguido de la prueba a posteriori Tukey. En todos los análisis estadísticos se utilizó una confianza del 95% y el paquete estadístico StatGraphics Centurion versión 16.1.11.

Tabla 3.1. Datos de colecta de las 19 especies de páramo estudiadas.

| Familia | Especie | Origen | Hábito | Lugar de colecta | Punto de Colecta |
|-----------------|------------------------------|--------------|--------|------------------|------------------|
| Alstromeriaceae | <i>Bomarea multiflora</i> | Nativa (casi | T | Páramo | 4° 25' N |
| | (L. f.) Mirb. | Endémica) | | Calderitas | 74° 08' O |
| Asteraceae | <i>Espeletia summapacis</i> | Nativa | C | Páramo | 4° 16' N |
| | Cuatrec. | (Endémica) | | Sumapaz | 74° 12' O |
| Asteraceae | <i>Espeletia killipii</i> | Nativa | C | Páramo | 4° 25' N |
| | Cuatrec. | (Endémica) | | Pasquilla | 74° 10' O |
| Asteraceae | <i>Espeletia barclayana</i> | Nativa | C | Páramo | 5° 0' N |
| | Cuatrec. | (Endémica) | | Subachoque | 74° 12' O |
| Asteraceae | <i>Espeletia grandiflora</i> | Nativa | C | Páramo | 4° 46' N |
| | Humb. & Bonpl. | (Endémica) | | Chingaza | 73° 51' O |

| | | | | | |
|-----------------|---|----------------------|---|----------------------|-----------------------|
| Asteraceae | <i>Pentacalia ledifolia</i> (Kunth) Cuatrec. | Nativa | A | Páramo San Francisco | 4° 35' N 73° 59' O |
| Bromeliaceae | <i>Puya nitida</i> Mez | Nativa (Endémica) | H | Páramo Subachoque | 5° 0' N 74° 12' O |
| Bromeliaceae | <i>Puya santosii</i> Cuatrec. | Nativa (Endémica) | H | Páramo Pasquilla | 4° 25' N 74° 11' O |
| Bromeliaceae | <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | Nativa (Endémica) | H | Páramo Curubital | 4° 22' N 74° 06' O |
| Bromeliaceae | <i>Puya trianae</i> Baker | Nativa | H | Páramo Sumapaz | 4° 10' N 74° 13' O |
| Ericaceae | <i>Gaultheria anastomosans</i> (Mutis ex L.f.) Kunth | Nativa | A | Páramo San Francisco | 4° 35' N 74° 00' O |
| Ericaceae | <i>Gaultheria myrsinoides</i> Kunth | Nativa | A | Páramo San Francisco | 4° 35' N 73° 59' O |
| Ericaceae | <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth | Nativa | A | Páramo San Francisco | 4° 35' N 74° 00' O |
| Melastomataceae | <i>Tibouchina grossa</i> (L.f.) Cogn. | Nativa | C | Páramo Curubital | 4° 22' N 74° 06' O |
| Myrtaceae | <i>Ugni myricoides</i> (Kunth) O.Berg | Nativa | A | Páramo San Francisco | 4° 26' N 74° 10' O |
| Rosaceae | <i>Hesperomeles goudotiana</i> (Decne.) Killip | Nativa (Endémica) | A | Páramo Romeral | 4° 27' N 73° 13' O |
| Salicaceae | <i>Xylosma spiculifera</i> (Tul.) Triana & Planch. | Nativa | A | Páramo Romeral | 4° 28' N 74° 14' O |
| Solanaceae | <i>Brugmansia x candida</i> Pers. | Nativa | A | Páramo Verjones | 4° 39' N 74° 00' O |
| Solanaceae | <i>Cestrum buxifolium</i> Kunth | Nativa | A | Páramo Romeral | 4° 27' N 74° 13' O |

A. Arbusto. C. Caulirosula. H. Hierba. T. Trepadora

(Bernal, Gradstein, & Celis, 2019; POWO, 2019)

RESULTADOS

Descripción morfológica

En general el tamaño de las semillas de las especies evaluadas es pequeño con longitudes que no supera los 5 mm (Tabla 3.2), lo cual está muy relacionado con su método de dispersión. Siete especies son anemócoras (Tabla 3.2), de las cuales cinco presentan apéndices de dispersión; en el caso de *G. anasomosans* y *T. grossa* no presentan apéndices de dispersión pero se sugiere son anemócoras por su tamaño y por provenir de frutos capsulares secos (Mendoza & Ramírez, 2006). Otras siete especies provienen de bayas con múltiples semillas y son zoócoras (Dalling, 2002). El último grupo está compuesto por las Espeletias que a pesar de ser semillas tan pequeñas y sin endospermo son dispersadas por la gravedad (Diazgranados, 2013).

El 80% de las especies presentan semillas con testas blandas y delgadas y un embrión lineal y recto, y el 37% no presentan endospermo (Tabla 3.2).

Pruebas de germinación y tolerancia a la desecación

La mayoría de las especies presentaron semillas con un bajo contenido de humedad inicial (CHi), en promedio del 12%; sólo en seis especies el CHi fue superior al 15%. *H. goudotiana*, *B. x candida* y *B. multiflora* presentaron los valores más altos y a su vez las semillas más grandes (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Rasgos morfológicos y contenido de humedad inicial de 19 especies de páramo. (n=10).

| Especie | Dispersión | Tamaño (mm) | Consistencia testa | Endospermo | Tipo de embrión | Otras estructuras | CH inicial |
|----------------------|------------|-------------|--------------------|------------|-----------------|-------------------|------------|
| <i>B. multiflora</i> | Z | 4,06 x 4,07 | Dura, Gruesa | Presente | Lineal- Recto | Arilo | 17,45 |
| <i>E. summapacis</i> | B | 3,95 x 1,40 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Ninguna | 13,94 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|-----------------|--------------------|----------|-------------------|---------|-------|
| <i>E. killipii</i> | B | 3,2 x 1,31 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Ninguna | 13,72 |
| <i>E. barclayana</i> | B | 3,11 x 1,30 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Ninguna | 16,6 |
| <i>E. grandiflora</i> | B | 3,16 x 1,12 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Ninguna | 10,21 |
| <i>P. ledifolia</i> | A | 1,6 x 0,50 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Papús | 11,84 |
| <i>P. nitida</i> | A | 2,25 x 1,24 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Alas | 14,36 |
| <i>P. santosii</i> | A | 2,02 x 0,89 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Alas | 10,08 |
| <i>P. sp.nov.,aff.P.horrída</i> | A | 1,25 x 0,62 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Alas | 11,08 |
| <i>P. trianae</i> | A | 2,11 x 1,00 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Alas | 13,14 |
| <i>G. anastomosans</i> | A | 0,70 x 0,53 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Ninguna | 15,75 |
| <i>G. myrsinoides</i> | Z | 0,70 x 0,58 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Ninguna | 11,85 |
| <i>V. floribundum</i> | Z | 0,77 x 0,64 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Ninguna | 12,08 |
| <i>T. grossa</i> | A | 0,56 x 0,24 | Blanda, Delgada | Ausente | Lineal- Recto | Ninguna | 14,89 |
| <i>U. myricoides</i> | Z | 1,70 x 1,26 | Blanda, Delgada | Presente | Lineal- Recto | Ninguna | 10,3 |
| <i>H. goudotiana</i> | Z | 4,65 x 3,45 | Dura, Gruesa | Ausente | Espatulado | Ninguna | 20,64 |
| <i>X. spiculifera</i> | Z | 4,35 x 3,15 | Dura, delgada | Presente | Espatulado | Ninguna | 9,32 |
| <i>B. x candica</i> | Z, B | 10,68 x 6,87 | Dura, Gruesa | Presente | Lineal- Anular | Ninguna | 17,68 |

| | | | | | | | |
|----------------------|---|------------|--------------------|----------|------------|---------|------|
| <i>C. buxifolium</i> | Z | 4,30 x 2,5 | Blanda, Delgada | Presente | Espatulado | Ninguna | 10,2 |
|----------------------|---|------------|--------------------|----------|------------|---------|------|

CH. Contenido de humedad. Z: Zoócora. B: Barócora. A: Anemóroca. .

El porcentaje de germinación en semillas con el contenido de humedad inicial presentó grandes diferencias entre las especies (Fig. 3.1); sin embargo, es posible encontrar semejanza en los resultados a nivel de familia. Asteraceae fue la familia que presentó los valores más bajos de germinación alrededor del 30%. Las Puyas, por el contrario, presentaron los valores más altos alcanzando hasta el 100% en algunas especies (Fig. 3.1). *V. floribundum* fue la especie que presentó el menor PG con 3%. Por su parte el TMG fue más homogéneo en todas las especies las cuales en promedio germinaron a los 41 días después de la siembra en caja de Petri, algunas de las especies que presentaron valores más altos correspondieron a las semillas más pequeñas y las que presentaron testas más duras (Fig. 3.2).

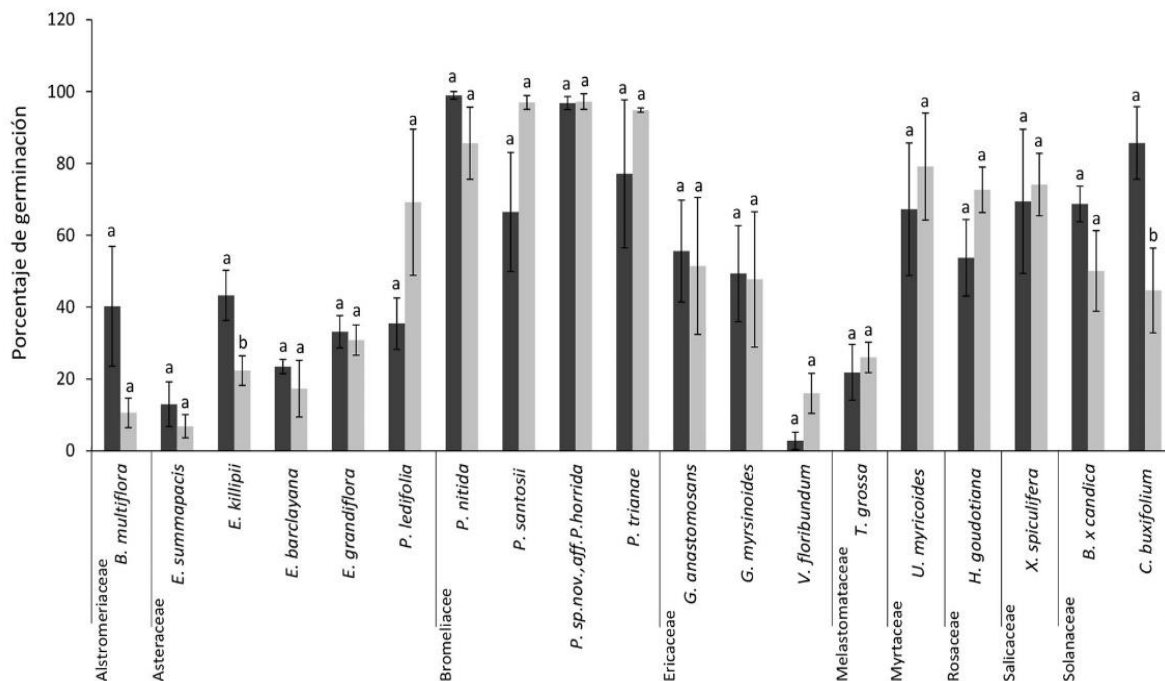


Figura 3.1. Porcentaje de germinación medio en 19 especies de páramo a diferentes contenidos de humedad (Barra negra: CHi; barra gris: CHr al 5%). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en el PG de la especie entre los contenidos de

humedad de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Las líneas perpendiculares indican el error estándar ($n=4$).

En cuanto a la tolerancia a la desecación, los resultados mostraron que 16 especies tienen semillas ortodoxas (Tabla 3.3), ya que como se observa en la figura 3.1, no se presentaron diferencias ($P < 0,05$) en el PG al reducir el contenido de humedad de las semillas, por el contrario en algunas especies la germinación fue mayor con el CH al 5%.

En cuanto a las tres especies restantes, en *C. buxifolium* la germinación de las semillas disminuyó al disminuir el contenido de humedad ($F_{1,6} = 7,05$; $P = 0,03$), ya que esta disminución no afectó la viabilidad de todas las semillas; esta especie se puede categorizar como intermedia (Fig. 3.1).

En semillas de *E. killipii*, también se encontraron diferencias en la germinación ($F_{1,6} = 6,66$; $P = 0,04$) y en comparación con las otras Espeletias en *E. killipii* se evidenció mayormente la disminución en la germinación después de bajar el CHi de las semillas (Fig. 3.1), por lo que estas semillas se consideran intermedias.

En semillas de *B. multiflora*, aunque no presentaron diferencias significativas ($F_{1,6} = 2,99$; $P = 0,13$) la Figura 3.1 evidencia el efecto negativo de la desecación en la germinación de las semillas.

En el TMG, en general, no se evidencian diferencias al disminuir el CHi ($P < 0,05$), solo en siete especies el TMG fue menor a menor contenido de humedad (Fig. 3.2).

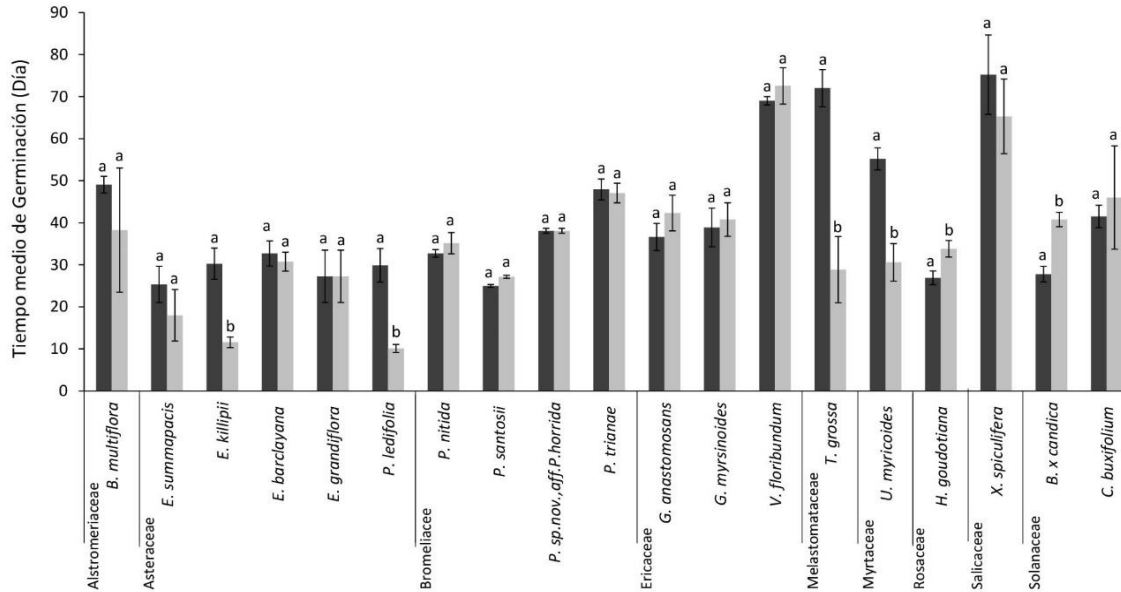


Figura 3.2. Tiempo medio de germinación (Días) en 19 especies de páramo a diferentes contenidos de humedad (Barra negra: CHI; barra gris: CHr al 5%). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en la especie entre el TMG y los contenidos de humedad de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Las líneas perpendiculares indican el error estándar ($n=4$).

Tabla 3.3. Clasificación según la tolerancia a la desecación de las semillas de 19 especies páramo.

| Tolerancia a la desecación | Especie | |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Ortodoxa | <i>E. summapacis</i> | <i>G. anastomosans</i> |
| | <i>E. barclayana</i> | <i>G. myrsinoides</i> |
| | <i>E. grandiflora</i> | <i>V. floribundum</i> |
| | <i>P. ledifolia</i> | <i>T. grossa</i> |
| | <i>P. nitida</i> | <i>U. myricoides</i> |
| | <i>P. santosii</i> | <i>H. goudotiana</i> |
| | <i>P. sp.nov., aff.P.horrída</i> | <i>X. spiculifera</i> |
| | <i>P. trianae</i> | <i>B. x candica</i> |

Intermedia *C. buxifolium*

Intermedia? *B. multiflora* *E. killipii*

?. se requiere realizar estudios para confirmar

DISCUSIÓN

La dispersión es un mecanismo por el cual las semillas logran llegar a nuevos lugares en los cuales pueden germinar y establecerse. Muchas son las estrategias adaptativas que presentan las semillas para concluir con éxito su dispersión, y es aquí donde el estudio morfológico nos brinda una importante herramienta que nos permite predecir y entender los mecanismos usados por las diferentes especies (Dalling, 2002). En el caso de las especies de páramo Frantzen & Bouman (1989) y Cabrera & Ramírez (2014) han reportado que la mayoría de semillas son dispersadas por el viento (anemocoria), al igual que en nuestro estudio; lo que conlleva a que estas semillas sean pequeñas, ligeras y tengan en muchos casos apéndices de dispersión que les permita ampliar su rango de dispersión (Tabla 3.2).

Uno de los síndromes de dispersión más abundantes en el trópico es la zoocoria (Dalling, 2002), la cual va disminuyendo con la altitud, ya que, bajo las condiciones ambientales en la alta montaña la diversidad y abundancia de la fauna también disminuye (Frantzen & Bouman, 1989). En nuestro trabajo se presentó un alto número de especies zoócoras, que invierten más energía en la producción de frutos carnosos con múltiples semillas en su interior. Una ventaja de la producción de semillas pequeñas es que se suele compensar con una mayor producción que asegura una dispersión exitosa, y si bien no el establecimiento de todas las semillas, si el de aquellas que se dispersen en las mejores condiciones (Dalling, 2002).

Otro caso de dispersión que se encontró fue el de la barocoria, presente en las Espeletias, donde, las semillas son desprovistas de apéndices de dispersión (Tabla 3.2), y caen al suelo cerca de la planta madre por efecto de la gravedad, lo que hace que estas especies sean gregarias y por ende en los páramos nunca se observe un individuo aislado, sino por el contrario, se observen grandes poblaciones conocidas como frailejonales (Diazgranados, 2013).

En cuanto al embrión se evidenció que todas las especies estudiadas cuentan con embriones diferenciados y desarrollados; a excepción de *B. multiflora* que a pesar de tener un embrión diferenciado, por la relación entre el tamaño del embrión y el tamaño de semilla según Baskin & Baskin (2007), sería un embrión no desarrollado. La descripción del tipo de embrión es una información poco documentada en las semillas; sin embargo, la descripción presentada en este trabajo para las especies de las familias Ericaceae, Melastomataceae, Solanaceae y Rosaceae concuerda con lo descrito por Martin (1946) y Baskin & Baskin (2007). Para el caso de las Asteraceae, Martin (1946) reportó que presentan un embrión espatulado, sin embargo, las cinco especies estudiadas presentan claramente un embrión lineal, lo que deja en evidencia la importancia de realizar los registros morfológicos de las semillas de las especies de páramo ya que dentro de las familias o géneros se pueden presentar cambios físicos y por ende funcionales que pueden ayudar a entender mejor las estrategias adaptativas de estas especies.

La germinación no fue homogénea en las especies. Si bien algunas especies tuvieron PG superiores al 70%, más de la mitad de las especies presentaron PG por debajo del 60%, este comportamiento de baja germinación ya había sido reportado por Vargas & Pérez-Martínez (2014), en su trabajo de germinación de semillas de páramo en el cual las especies evaluadas no superaban una viabilidad del 50%, ellos concluyeron que las semillas de ecosistemas altoandinos y páramo tienden a tener una baja viabilidad. Por otro lado vale la pena ampliar los estudios de presencia de dormancia en las semillas de páramo, característica que también puede estar involucrada en la baja germinación obtenida en la siembra de semillas sin tratamientos pre-germinativos; ya que según Venable (2007), en ecosistemas con condiciones ambientales extrema la dormancia tiende a aumentar como mecanismo de adaptación y supervivencia de las semillas.

Los valores más altos de germinación fueron registrados en las *Puya* (Fig. 3.1), lo cual concuerdan con lo encontrado en condiciones de laboratorio en presencia de luz en *P. raimondii* por Vadillo, Suni, & Cano (2004), en *P. nitida* por Franco (2014), en *P. trianae* por Pérez-Martínez *et al.* (2014) y ligeramente mayores a los encontrados en *P. santosii* por los mismos autores. Es de destacar que valores para otras especies de *Puya* como *P. cryptantha*, *P. trianae*, *P. santosii* y *P. bicolor* en condiciones de campo o en invernadero con sustrato son mucho menores, entre el 28 y 50% (Mora & Vargas, 2007; Pico, 2014),

esto sugiere que la primera fase de la propagación de *Puya* resulta más adecuada bajo laboratorio donde las condiciones son controladas y la germinación se potencializa.

Continuando con las especies que presentaron mayor germinación en promedio del 70%, se encuentran *U. myricoides*, *H. goudotiana*, *X. spiculifera*, *B. x candica* y *C. buxifolium*; estas especies presentan un hábito arbustivo y aunque son nativas presentan una amplia distribución (Bernal et al., 2019). Esto sumado a sus altos valores de germinación han hecho que estas especies sean usadas en diferentes etapas de los procesos de restauración (Acero-Nitola & Cortés-Pérez, 2014; Cabrera & Ramírez, 2014).

Para las Ericaceae la germinación fue baja y mucho más en *V. floribundum*; sin embargo, estos resultados ya han sido reportados por otros autores donde bajo condiciones de laboratorio y sin el uso de tratamientos pregerminativos se han obtenido PG entre 7 y 38% (Magnitskiy & Ligarreto, 2007; Suárez-Ballesteros, Calderón-Hernández, & Mancipe-Murillo, 2018), valores más altos son obtenidos con el uso de tratamientos pregerminativos como los inductores de germinación (Valencia & Ramirez, 1993; Hernández, Lobo, Medina, Cartagena, & Delgado, 2009; Just, 2018). En ericáceas la germinación se ve afectada principalmente por dos factores, la baja viabilidad de los embriones (La Rosa, Sánchez, & Pérez, 2017) la cual puede estar influenciada por la variación en el tamaño y los estados de maduración de las semillas dentro de un fruto (Chaparro & Becerra 1999; Kloet & Cabilio 2010; Castro, Olarte, Rache, & Pacheco, 2012), y la presencia de dormancia fisiológica en las semillas (Baskin & Baskin 2014).

En las asteráceas evaluadas compuestas principalmente por Espeletias la germinación fue menor al 40%, valores que pueden aumentar con el uso de inductores de germinación, ya que como lo reporta Baskin & Baskin (2014) esta familia suele presentar algún tipo de dormancia, en este caso fisiológica. Por tal motivo el uso de giberelinas en ensayos de micropropagación aumenta la germinación en la especie (Bohórquez-Quintero, Araque-Barrera, & Pacheco-Maldonado, 2016). Otra técnica usada por Rache & Pacheco (2009) fue la siembra de embriones en un medio suplementado MS, obteniendo una germinación del 91%. Por otro lado, un estudio realizado por Guariguata y Azocar (1988) en *Espeletia timotensis* reportó un 80% de germinación a temperaturas constantes inferiores a 16 °C. De acuerdo a los resultados es recomendable evaluar condiciones de siembra diferentes

a las abordadas en este estudio, que permitan aumentar la germinación en esta familia tan abundante en las zonas de páramo (Sklenář *et al.* 2005).

De las especies evaluadas 16 presentan semillas ortodoxas tolerantes a la desecación (Tabla 3.3), por lo cual dichas semillas no pierden su viabilidad al disminuir su contenido de humedad y pueden ser almacenadas en bancos de semillas. También se encontró una especie intermedia, y dos más probablemente intermedias pero se recomienda realizar nuevas pruebas que ratifiquen estos resultados. En estas especies el manejo de su almacenamiento es menos reportado, por lo cual se recomienda almacenar estas semillas pero evaluar periódicamente su viabilidad para determinar su longevidad dentro del banco de semillas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura donde se predice que cerca del 80% de las angiospermas producen semillas ortodoxas, de 5 a 10% producen semillas recalcitrantes y el restante serán semillas intermedias (Walters, Berjak, Pammenter, Kennedy, & Raven, 2013). Aunque estos porcentajes pueden variar por hábitats disminuyendo el porcentaje de especies recalcitrantes a medida que el hábitat se vuelve más seco (Tweddle, Dickie, Baskin, & Baskin, 2003), nuestros resultados con una muestra pequeña de algunas especies de páramo sugieren que el 84% de las especies presenta comportamiento ortodoxo, resultados que tienen fuertes implicaciones a nivel de conservación, porque ante la pérdida eminente de la diversidad se está demostrando que los bancos de semillas son una alternativa viable y segura para salvaguardar la diversidad vegetal del páramo.

Este estudio sumado a la nota corta publicada por Pérez-Martínez & Calderón-Hernández (2017), son el primer reporte sobre la tolerancia a la desecación en Espeletias, donde ante la baja viabilidad en las semillas que presenta este género, reportan que las semillas son ortodoxas brindando alternativas en términos de conservación para estas especies. En cuanto a los resultados obtenidos en *E. killipii* la pérdida de viabilidad pudo estar relacionada con el estado de madurez de las semillas, pues aun que se trató de colectar todo el material maduro, en Espeletias la producción de ejes florales es asincrónica, lo que puede ocasionar la colecta tanto de semillas maduras como inmaduras de una misma población (Estrada & Monasterio, 1991).

Aunque variables fisiológicas y morfológicas no fueron analizadas en las semillas de las 19 especies de este capítulo en relación con la tolerancia a la desecación, los datos obtenidos si pueden ser contrastados con reportes de literatura. Son dos las principales características las que ratifican el carácter ortodoxo de las semillas. Por ejemplo, el contenido de humedad; semillas recalcitrantes son dispersadas con un alto contenido de humedad (20 – 52 %) (Hong & Ellis, 1988), en nuestro estudio el mayor contenido de humedad lo tubo *H. goudotiana* con 20%, pero en promedio lo reportado fue 13%, lo cual se aproxima más a valores para semillas ortodoxas. Por otra parte, Pritchard et al. (2004) y Tweddle et al. (2003) han encontrado que las semillas grandes tienden a ser recalcitrantes, contrario a lo reportando en nuestro estudio donde en general son semillas pequeñas y por ende con mayor probabilidad de ser ortodoxas.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo la mayoría de semillas de especies de páramo evaluadas cuentan con un alto potencial para su conservación *ex situ* debido a su tolerancia a la desecación típico de semillas ortodoxas. Por otra parte, los resultados sobre la morfología y germinación de estas especies contribuyen en la construcción de la información base de las especies de páramo, la cual en conjunto podrá ser utilizada para evaluar tendencias presentes en el ecosistema de páramo que permitan tomar decisiones acertadas sobre la conservación y preservación de sus especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero-Nitola, A. M., & Cortés-Pérez, F. (2014). Propagación de especies nativas de la microcuenca del río La Vega , Tunja , Boyacá , con potencial para la restauración ecológica. *Revista Academica Colombiana de Ciencias*, 38(147), 195–205.
<http://doi.org/10.18257/raccefyn.76>
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L., & Trejo, C. (2004). Variación en el tamaño y peso de la Semilla y relación con la Germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia*, 29(12), 629–697.

- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2007). A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research*, 17(1), 11–20. <http://doi.org/10.1017/S0960258507383189>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). Types of Seeds and Kinds of Seed Dormancy. *Seeds*. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-416677-6.00003-2>
- Bernal, R., Gradstein, S. ., & Celis, M. (2019). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Retrieved June 6, 2019, from <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bohórquez-Quintero, M. D., Araque-Barrera, E. J., & Pacheco-Maldonado, J. C. (2016). Propagación in vitro de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas*, 38(104), 23–36. <http://doi.org/10.17533/udea.acbi.v38n104a03>
- Cabrera, M., & Ramírez, W. (Eds.). (2014). Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación (Instituto). Bogotá, D.C Colombia. Retrieved from <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31451>
- Castro, C., Olarte, Y., Rache, L., & Pacheco, J. (2012). Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 30(2), 196–203.
- Chaparro, M. y, & Becerra, N. (1999). Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (ERICACEAE). *Acta Biológica Colombiana*, 4(1), 14.
- Cortés-Duque, J., & Sarmiento, C. (2013). Visión ecosistémica de los páramos de alta montaña colombiana: Memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Dalling, J. W. (2002). Ecología de semillas. In M. Guariguata & G. Kattan (Eds.), *Ecología y conservación de bosques neotropicales* (p. 691). Costa Rica: Editorial Tecnológica de Costa Rica.

- de Viana, M. L., Mosiario, M. J., & Morandini, M. N. (2009). Tolerancia a la desecación de semillas de dos especies arbóreas del chaco salteño (Argentina): *Erithryna falcata* benth. y *Tecoma garrocha* hieron. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(3), 590–594.
- Diazgranados, M. (2013). Aportes a la delimitación de los páramos desde el estudio de los frailejones. In J. Cortés-Duque & C. Sarmiento (Eds.), *Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos* (p. 240). Bogotá D.C, Colombia: Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt.
- Estrada, C., & Monasterio, M. (1991). Comportamiento reproductivo de una rosera gigante, *Espeletia spicata* SCH. BIP. (compositae), del páramo desértico. *Ecotropicos*, 4(1), 1–17.
- Franco, A. (2014). Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia). [Tesis][Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/48762/1/ESTRATEGIAS_DE_LA_REPRODUCCION_SEXUAL_DE_PUYA_NITIDA.pdf
- Frantzen, N. M. L. H. F., & Bouman, F. (1989). Dispersal and growth form patterns of some zonal páramo vegetation types. *Acta Botanica Neerlandica*, 38(4), 449–465. <http://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1989.tb01376.x>
- Guariguata, M., & Azocar, A. (1988). Seed Bank Dynamics and Germination Ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an Andean Giant Rosette, 20(1), 54–59.
- Hay, F. R., & Probert, R. J. (2013). Advances in seed conservation of wild plant species : a review of recent research. *Conservation Physiology*, 1, 1–11. <http://doi.org/10.1093/conphys/cot030.Introduction>
- Hernández, M., Lobo, M., Medina, C., Cartagena, J., & Delgado, O. (2009). Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 15–23.

- Herzog, S. K., Martínez, R., Jørgensen, P. M., & Tiessen, H. (Eds.). (2010). Climate change effects on the biodiversity of the tropical Andes. *Climate change effects on the biodiversity of the tropical Andes*.
- Hofstede, R., Segarra, P., & Vásconez, P. M. (Eds.). (2003). *Los Páramos del Mundo. Proyecto Atlas Mundial de los páramos*. Quito. Retrieved from [http://www.portalces.org/sites/default/files/references/038_Hofstede et al. %28eds%29.2003.Los Paramos del Mundo.pdf](http://www.portalces.org/sites/default/files/references/038_Hofstede%20et%20al.%20eds%202003.Los%20Paramos%20del%20Mundo.pdf)
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1988). Contrasting seed storage behaviour among different species of Meliaceae. *Seed Science and Technology*, 26(1), 77–95. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=2276317>
- Hoyle, G. L., Steadman, K. J., Daws, M. I., & Adkins, S. W. (2008). Physiological dormancy in forbs native to south-west Queensland: Diagnosis and classification. *South African Journal of Botany*, 74(2), 208–213. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.11.005>
- IDEAM. (2018). Resultados monitoreo de la deforestación 2017. Retrieved from http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023835/Resultados_Monitoreo_Deforestacion_2017.pdf
- IPPC. (2007). *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel*. (M. Parry, O. Canziani, J. Palutikof, P. van der Linden, & C. Hanson, Eds.), Ginebra, Suíça. Cambridge, UK: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1256/004316502320517344>
- Just, M. (2018). Seed morphology , dormancy and germination of South-West Australian Ericaceae. Edith Cowan University. Retrieved from <http://ro.ecu.edu.au/theses/2051>
- Kermode, A. R., & Finch-Savage, B. E. (2002). Desiccation Sensitivity in Orthodox and Recalcitrant Seeds in Relation to Development. In M. Black & H. W. Pritchard (Eds.), *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (p. 416). Retrieved from <http://books.google.com/books?id=8bMEVRRBWjsC&pgis=1>

- Kloet, S. ., & Cabilio, P. (2010). Magnitudinal Asymmetries in Seed Production in *Vaccinium corymbosum*: Anomaly or Not? *The American Midland Naturalist*. The University of Notre Dame. <http://doi.org/10.2307/40730940>
- La Rosa, R., Sánchez, M., & Pérez, E. (2017). Morfología interna e histología de arándano *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) en Lima, Perú. *Agronomía Colombia*, 35(2), 176–181. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n2.63146>
- Llambí, L. D., Soto-W, A., Célleri, R., De Bievre, B., Ochoa, B., & Borja, P. (2012). Ecología, hidrología y suelos de páramos. Proyecto páramo Andino.
- Magnitskiy, S., & Ligarreto, G. (2007). El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 1(2), 137–141. Retrieved from http://virtual.uptc.edu.co/revistas2013f/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1155
- Magnitskiy, S. V., & Plaza, G. a. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 96–103.
- Martin, A. C. (1946). The Comparative Internal Morphology of Seeds. *American Midland Naturalist*, 36(3), 513–660. <http://doi.org/10.2307/2421457>
- Medeiros, A. C. de S., & Eira, M. T. S. de. (2006). Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas. *Circular Técnica* 127, 1–13.
- Mendoza, H., & Ramírez, B. (2006). Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Bogotá D.C, Colombia: . Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; Univerisad del Cauca. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/297978344>
- Mora, F., & Vargas, O. (2007). Germination dynamics , seed dormancy and seedling recruitment in *Puya cryptantha* and *P . trianae* , two giant rosettes of the colombian Páramos, (February 2016).

- Muñoz, M. C., & Ackerman, J. D. (2011). Spatial distribution and performance of native and invasive *Ardisia* (Myrsinaceae) species in Puerto Rico: The anatomy of an invasion. *Biological Invasions*, 13(7), 1543–1558. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9912-7>
- Niembro, A. (1989). *Semillas de plantas leñosas. Morfología Comparada* (Primera ed). Mexico D.F: LIMUSA, S.A de C.V.
- Nkang, A., Omokaro, D., Egbe, A., & Amanke, G. (2003). Variations in fatty acid proportions during desiccation of *Telfairia occidentalis* seeds harvested at physiological and agronomic maturity. *African Journal of Biotechnology*, 2(February), 33–39.
- Pérez-Martínez, L. V., Rodríguez, N. A., Melgarejo, L. M., & Vargas R, O. (2014). Propagación por semilla de 13 especies de páramo. In O. Vargas R & L. V. Pérez-Martínez (Eds.), *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica* (pp. 116–174). Bogotá, D.C Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez-Martínez, L. V., & Calderón-Hernández, M. (2017). Researching ex situ conservation of “frailejon” seeds in Colombia. *Samara*, 30(August 2016), 7–8.
- Pico, A. (2014). Germinación, crecimiento y desarrollo de *Puya bicolor* Mez (Bromeliaceae) (No. Final report 586-2013. Data not published). Bogotá, D.C Colombia: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis.
- POWO. (2019). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved June 6, 2019, from <http://www.plantsoftheworldonline.org>
- Pritchard, H., Daws, M., Fletcher, B., Gaméné, C., Msanga, H. P., & Omondi, W. (2004). Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany*, 91(6), 863–870.
- Rache, L., & Pacheco, J. (2009). Micropropagación de *Espeletiopsis muiska* (Cuatrecasas), frailejón del Parque Natural La Ranchería - Boyacá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 27(3), 349–358. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13278>

- Ranal, M. A., & Santana, D. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1), 1–11. <http://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Italia: Biodiversity International. Retrieved from http://books.google.com/books?id=sv_FnxOQiCcC&pgis=1
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1992). *Plant physiology*. Belmont: Wadsworth Pub. Co.
- Sklenář, P., Luteyn, J. L., Ulloa, C., Jorgensen, P. M., & Dillon, M. O. (2005). *Flora genérica de los páramos : guía ilustrada de las plantas vasculares*. New York Botanical Garden.
- Suárez-Ballesteros, C. I., Calderón-Hernández, M., & Mancipe-Murillo, C. (2018). Propagación sexual y tolerancia a la desecación del agraz (*Vaccinium meridionale* Sw) de tres fuentes semilleras localizadas en Ráquira, San Miguel de Sema (Boyacá) y Gachetá (Cundinamarca). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 42(163), 207. <http://doi.org/10.18257/raccefyn.614>
- Tompsett, P. B., & Pritchard, H. W. (1998). The Effect of Chilling and Moisture Status on the Germination, Desiccation Tolerance and Longevity of *Aesculus hippocastanum* L. Seed. *Annals of Botany*, 82(2), 249–261. <http://doi.org/10.1006/anbo.1998.0676>
- Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2003). Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*, 91(2), 294–304.
- Vadillo, G., Suni, M., & Cano, A. (2004). Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Rev. Peru. Biol.*, 11(1), 71–78.
- Valencia, M., & Ramirez, F. (1993). Notas Sobre la Morfología, Anatomía y Germinación del Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz.). *Agronomía Colombiana*, 10(2), 151–159.

Vargas, O., & Pérez-Martínez, L. V. (Eds.). (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*. Bogotá D.C, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Venable, D. L. (2007). Bet Hedging in a Guild of Desert Annuals. *Ecology*, 88, 1086–1090.<http://doi.org/10.2307/27651206>

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K., & Raven, P. (2013). Preservation of Recalcitrant Seeds. *Science*, 339(6122), 915–916.
<http://doi.org/10.1126/science.1230935>

Consideraciones finales y Conclusiones generales

Esta investigación documenta la morfología externa e interna de las semillas de las especies evaluadas, características básicas que permiten conocer o predecir el comportamiento de las especies en cuanto a su germinación o éxito de establecimiento en un ambiente natural, además de brindar información sobre posibles tipos de dormancia, estos datos podrán ser usados para complementar rasgos de historia de vida y funcionales de estas especies. En nuestro caso se encontró que el 85% de las semillas de páramo evaluadas son pequeñas (< 5mm), presentan testas blandas y delgadas, y embriones desarrollados lineales y recto; 50% de las semillas presentan endospermo (Tabla 3.2).

Se evaluó la viabilidad de las semillas por medio de la tinción de tetrazolio, y si bien las semillas presentan testas delgadas y blandas, se encontró que para lograr una buena tinción de las semillas es necesario realizar un acondicionamiento a las semillas el cual puede ser un corte lateral en la testa o remover por completo la testa y realizar la prueba en embriones (Tabla 1.4). Se observó cómo pese a que se ha documentado que las semillas de páramo tienen baja viabilidad, en la figura 1.3 observamos como esto puede estar más relacionado con la familia o género evaluado. Este trabajo permitió documentar la condición más adecuada para la evaluación de la viabilidad por tetrazolio de las semillas de páramo ([1%]; 40°C; 24h), herramienta que será de gran ayuda para todos los trabajos que requieran del uso de esta prueba.

En cuanto a la germinación en general se encontró que reportó una menor viabilidad que lo reportado por el método de tetrazolio, el uso complementario de las prueba de viabilidad (tetrazolio- germinación) permiten identificar condiciones fisiológicas de las semillas que no podrían ser detectadas al usarlas de manera individual, por ejemplo la detección de una germinación menor a la viabilidad reportada en tetrazolio podría sugerir la presencia de dormancia no unificada en las semillas, tal como sucedió en las familias Asteraceae, Melastomataceae y Ericaceae. La presencia de dormancia en las semillas que se encuentran en ecosistemas con condiciones ambientales extremas, es una condición muy común producto de estrategias de adaptación que les permite sobrevivir y persistir en el

tiempo. Para el caso de las especies de páramo parece que la dormancia fisiológica y física son las abundantes, este estudio documentó la presencia de dormancia fisiológica y física en seis especies de páramo (tabla 2.2), además se reporta los tratamientos pre-germinativos necesarios para romperla y potenciar la germinación de las semillas. Esta información contribuye a entender los procesos iniciales de la germinación y establecimiento de sus semillas y además brinda herramientas para continuar con procesos de conservación *ex situ* e *in situ* en estas especies.

Se reporta que las especies de páramo evaluada cuentan con un alto potencial para su conservación *ex situ*, ya que 16 especies presentaron un comportamiento ortodoxo o tolerante a la desecación, información que permite tomar decisiones en torno a la conservación de las especies de este ecosistema, donde se plantean los bancos de semillas *ex situ* como una alternativa que soporte y conserve paralelamente la diversidad de las especies en caso de presentarse pérdidas de especies inevitables en el ambiente natural.

Anexos.

Anexo 1. Artículo publicado “Evaluación de Viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio”.

CONSERVACIÓN

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/cal>

<https://dx.doi.org/10.1544/6/caldasia.v40n2.68251>
Caldasia 40(2):366-382. Julio-diciembre 2018

Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio

Assessment of seed viability of 17 high andean tropical species by germination and tetrazolium tests

CAROLINA MANCIPE-MURILLO^{1*}, MANUELA CALDERÓN-HERNÁNDEZ^{1,2*}, LAURA VICTORIA PÉREZ-MARTÍNEZ^{1*}

¹Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Subdirección Científica, Línea de investigación en Especies y Propagación, sublínea Conservación de Semillas. Av Calle 63 No 68-95 Bogotá, Colombia. cmancipe@jbb.gov.co, mchernandez@jbb.gov.co, lauravictoriap@gmail.com

²Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal.

*Autor para correspondencia.

RESUMEN

La viabilidad denota el potencial que tiene una semilla para germinar, la cual está ligada al éxito o fracaso reproductivo de las poblaciones y de esta manera es una de las primeras variables a evaluar cuando se trabaja con semillas. Nuestro objetivo fue determinar el mejor método para evaluar la viabilidad en 17 especies altoandinas; se comparó la viabilidad mediante dos pruebas: Tetrazolio, para la cual se probaron variaciones de concentración, acondicionamiento y tiempo de exposición; y germinación, que se trabajó bajo condiciones controladas a 20/10 °C, fotoperiodo y termoperiodo de 12 horas. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para evaluar diferencias. Se encontraron diferencias en el valor de viabilidad entre las pruebas. En 11 especies se recomienda la prueba de Tetrazolio, donde la mejor condición de evaluación fue [1-1,5 %] TZ, 40 °C y 24 horas de exposición. En *Puya*, *Hypericum* y *Gaultheria* la prueba de germinación fue mejor para evaluar la viabilidad. La comparación de las pruebas permitió detectar la presencia de dormancia en algunas especies donde se evidenció una alta viabilidad pero baja germinación. Los resultados permitieron determinar el método más confiable para evaluar la viabilidad en las diferentes especies, aportar información sobre sus requerimientos germinativos y potencial para la propagación sexual, así como detectar la posible presencia de dormancia y la necesidad de profundizar en la evaluación de los métodos de ruptura que permitan aumentar los porcentajes de germinación en algunas de las especies.

Palabras clave. Calidad de semilla, embrión, páramo, propagación.

ABSTRACT

Viability denotes the potential of a seed to germinate, which is linked to the reproductive success or failure of the populations and in this way is one of the first variables to evaluate when working with seeds. Our aim was to determine the best method to assess the viability in 17 high Andean species; the viability obtained by two tests was compared: Tetrazolium, for which variations in concentration, conditioning and exposure time were tested; and germination, which was worked under controlled conditions at 20/10 °C, photoperiod and thermoperiod of 12 hours. The Kruskal-Wallis test was used to evaluate differences. Differences were found between tests. In 11 species the Tetrazolium test is recommended, where the best evaluation condition was [1-1.5 %] TZ, 40 °C and 24 hours of exposure. In *Puya*, *Hypericum*, and *Gaultheria*, the germination was the better test for viability evaluation. The comparison of the tests allowed to detect dormancy in some species where

a high viability but low germination was recorded. The results allowed to determine the most reliable method to evaluate the viability in the different species, provide information about their germinative requirements and potential for sexual propagation, as well as detect the possible presence of dormancy and the need to deepen the evaluation of the methods of rupture that allow to increase the percentage of germination in some of the species.

Key words. Embryo, páramo, propagation, seed quality.

INTRODUCCIÓN

La viabilidad denota el potencial que tiene una semilla para germinar (Sawma y Mohler 2002). Es un rasgo importante para evaluar la habilidad de colonización de las especies (Bremholm 1993, Pywell *et al.* 2003) y por ende está ligado al éxito o fracaso reproductivo de las poblaciones (Borza *et al.* 2007). A su vez es una medida de calidad, que cobra especial importancia en el monitoreo periódico de semillas que se encuentran bajo almacenamiento, con el fin de asegurar el éxito de un programa de conservación *ex situ* (Menges *et al.* 2004, Godefroid *et al.* 2010).

Mediante una revisión de los métodos utilizados para evaluar la viabilidad en estudios relacionados con bancos de semillas en campo, reclutamiento, bancos de semillas *ex situ* y ecología de la germinación, se encontró que de una muestra de 26 publicaciones científicas, se utilizan los siguientes métodos para su evaluación: germinación, 23,1 %; inspección directa del embrión clasificando como viable un embrión rígido y blanco, 15,4 %; prueba de Tetrazolio (TZ), 38,5 %; germinación y subsiguiente prueba de tetrazolio en las semillas no germinadas, 7,7 % y germinación e inspección del embrión subsiguiente en semillas no germinadas, 15,4 % (Anexo 1 del material suplementario).

Cada prueba tiene ventajas y desventajas; la prueba de germinación ligada a la prueba de inspección del embrión puede tomar mucho tiempo si la semilla tiene latencia y no se conocen los requerimientos para romperla (McDonald 1998, Torres y Marcos-Filho

2005), lo cual es usual en especies nativas poco estudiadas. Por otro lado, aunque la prueba de inspección del embrión se ha evaluado como equivalente a la prueba de germinación y tetrazolio (Sawma y Mohler 2002, Ooi *et al.* 2004, Borza *et al.* 2007), aún no se considera una prueba estandarizada.

La prueba de TZ es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla; cuando dichos tejidos entran en contacto con la solución, reaccionan formando un compuesto insoluble de color rosado que indica la viabilidad del tejido (Smith 1952, Moreno 1984, Gaspar-Oliveira *et al.* 2009). La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración (Ruiz 2009); en general, la estructura clave que debe presentar tinción es la radícula, la ausencia de tinción en ésta inmediatamente clasifica la semilla como no viable (Schmidt 2000). Por esta razón, se necesita de la pericia del analizador para la evaluación que en semillas pequeñas puede ser muy dispendiosa y la extracción del embrión casi imposible (Howarth y Stanwood 1993, Pradhan y Badola 2008). Sin embargo, muchos autores la consideran el método más exacto (Bradbeer 1988, Sawma y Mohler 2002) y es de gran utilidad en especies cuyas semillas presentan latencia y germinan con lentitud (Willan c1991, Ruiz 2009, Aslam *et al.* 2010).

La semilla de una especie particular puede requerir variaciones en las condiciones para tener resultados precisos (MAPA 2009, Da Silva *et al.* 2012). Numerosos estudios se han realizado para optimizar la prueba de TZ en especies particulares, tanto silvestres

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

como comerciales, mediante la variación de las condiciones de evaluación (Gera *et al.* 1998, Purohit y Bisht 1999, Santos *et al.* 2007, Pinto *et al.* 2009, Zeng y Wang 2009, Hosomi *et al.* 2011, Lazarotto *et al.* 2011, Grzybowski *et al.* 2012, Kaiser *et al.* 2014, Lamarca y Barbedo 2014), donde se prueban acondicionamientos para facilitar la entrada del tetrazolio; corte, escarificación de la testa; tiempos y métodos de imbibición, imbibición directa o con toallas de papel; tiempos de sometimiento a la solución, entre dos y 48 horas; concentraciones de la solución, entre 0,075 y 1,0%; y temperaturas entre 30 y 45 °C. El uso de la concentración, tiempo de tinción, la temperatura y la adecuada interpretación de la tinción en las semillas son factores cruciales para asegurar una prueba exitosa (Abbate y Takaki 2014).

Hay muy pocos estudios de viabilidad en especies nativas (Godefroid *et al.* 2010) y, específicamente, de especies tropicales altoandinas (Baskin y Baskin 1998), que hacen parte de los ecosistemas de bosque altoandino y páramo que prestan servicios ecosistémicos de abastecimiento hídrico, regulación, de secuestro de carbono en suelos, calidad de aire para las ciudades y además, presentan altos niveles de endemismo (Rodríguez *et al.* 2006).

En ecosistemas andinos de Suramérica de zonas templadas de Chile y Argentina, se referencian estudios en los cuales se evalúa la viabilidad de bancos de semillas en campo (Kalin *et al.* 1999, Cavieres y Arroyo 2000) o regeneración natural (Renison *et al.* 2004) por la prueba de TZ. En ecosistemas altoandinos de Perú se referencia un estudio de viabilidad de *Puya raimondii* en condiciones de laboratorio y un análisis de bancos de semillas naturales en páramo (Mora y Vargas 2007), en los cuales se utiliza la prueba de TZ. Por su parte Pico-V (2016), en un estudio en *Puya loca* evalúa la viabilidad por medio de la germinación. Esto evidencia la necesidad de (1) Conocer

los métodos más efectivos para la evaluación correcta de rasgos reproductivos como la viabilidad de las semillas, y (2) Evaluar la viabilidad y germinación de semillas de especies altoandinas tropicales para conocer su potencial de colonización y utilizarlo como herramienta en la toma de decisiones.

En este marco, la presente investigación tuvo como objetivo comparar la prueba de germinación y tetrazolio para determinar el mejor método para la evaluación de la viabilidad en semillas de 17 especies tropicales altoandinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal

Entre 2014 y 2015 se recolectaron frutos y semillas de 17 especies de diversos bosques altoandinos y páramos cercanos a la ciudad de Bogotá D.C., Colombia (Tabla 1). Se verificó que los frutos se encontraran en madurez fisiológica a partir del color del exocarpo del fruto y de la dureza de la testa de la semilla. Se recolectó material de al menos 20 individuos por especie con condiciones fitosanitarias adecuadas. La taxonomía de cada especie fue verificada y los especímenes se ingresaron al Herbario del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (JBB). Los frutos y semillas se transportaron el mismo día de la colecta al Laboratorio de Conservación de Semillas del JBB y se realizó la limpieza de acuerdo al tipo de fruto. Se verificó la presencia de embrión en 100 semillas por especie por medio de inspección con un estereoscopio Motic® SMZ-168 (Hong Kong, China).

Prueba de Tetrazolio

Se revisaron numerosos artículos en los cuales se aplicó la prueba de tetrazolio para identificar las condiciones más utilizadas. A partir de esto, se evaluaron primero condiciones de 30,

Tabla 1. Listado de las especies altoandinas evaluadas con sus respectivos lugares de recolecta y hábito de crecimiento.

| Familia | Especie | Hábito | Lugar de colecta | Fecha de colecta | Coordenadas |
|--------------|--|--------|-------------------------|------------------|---------------------------|
| Asteraceae | <i>Espeletia barclayana</i> Cuatrec. | C | Páramo de Subachoque | 21-may-15 | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia cayetana</i> (Cuatrec.) Cuatrec. | C | Páramo de Subachoque | 29-sep-14 | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia grandiflora</i> Humb. & Bonpl. | C | Páramo de Chingaza | 27-nov-14 | 4°46' Norte, 73°51' Oeste |
| Asteraceae | <i>Espeletia killipii</i> Cuatrec. | C | Páramo de Chingaza | 27-nov-14 | 4°17' Norte, 74°12' Oeste |
| Asteraceae | <i>Pentacalia ledifolia</i> (Kunth) Cuatrec. | A | Páramo de San Francisco | 14-may-15 | 4°35' Norte, 73°59' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya nitida</i> Mez | H | Páramo de Subachoque | 20-ene-15 | 5°0' Norte, 74°12' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya santosii</i> Cuatrec. | H | Páramo de pasquilla | 03-dic-14 | 4°25' Norte, 74°11' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | H | Páramo de Curubital | 19-may-15 | 4°22' Norte, 74°06' Oeste |
| Bromeliaceae | <i>Puya trianae</i> Baker | H | Páramo de Sumapaz | 26-may-15 | 4°10' Norte, 74°13' Oeste |
| Ericaceae | <i>Gaultheria anastomosans</i> (Mutis ex L.f.) Kunth | A | Páramo de San Francisco | 14-may-15 | 4°35' Norte, 74°00' Oeste |
| Ericaceae | <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. | A | Páramo de San Francisco | 14-may-15 | 4°35' Norte, 73°59' Oeste |
| Ericaceae | <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth | A | Páramo de San Francisco | 14-may-15 | 4°35' Norte, 74°00' Oeste |
| Hypericaceae | <i>Hypericum prostratum</i> Cuatrec. | H | Páramo de Sumapaz | 26-dic-14 | 4°17' Norte, 74°12' Oeste |
| Myrtaceae | <i>Ugni myricoides</i> (Kunth) O.Berg | A | Páramo de Subachoque | 21-may-15 | 4°26' Norte, 74°10' Oeste |
| Rosaceae | <i>Hesperomeles goudotiana</i> (Decne.) Killip | A | Páramo de Romeral | 20-may-15 | 4°27' Norte, 74°13' Oeste |
| Salicaceae | <i>Xylosma spiculifera</i> (Tul.) Triana & Planch. | A | Páramo de Romeral | 26-jun-15 | 4°28' Norte, 74°14' Oeste |
| Solanaceae | <i>Cestrum buxifolium</i> Kunth | A | Páramo de Romeral | 26-jun-15 | 4°27' Norte, 74°13' Oeste |

A = Arbusto, C = Caulirosula, H = Hierba.

35 y 40 °C y de tiempos de sometimiento a la solución de tetrazolio de una, tres y 24 horas en tres especies de páramo (datos no mostrados). En estas pruebas preliminares se descartaron los tiempos de una y tres horas y la mejor

temperatura fue de 40 °C por lo cual se evaluó la prueba bajo estas condiciones. Las semillas fueron embebidas en agua destilada durante 24 horas antes de aplicar la prueba que se realizó en condiciones de oscuridad; la temperatura

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

se alcanzó con un horno de secado Binder ED 53-UL (Tuttlingen, Alemania). El ajuste del tiempo de inmersión y la concentración del TZ se realizó en dos fases; en la primera se evaluó una concentración de 0,1 % de TZ y, de acuerdo con la morfología, se realizó un acondicionamiento en la semilla para permitir la entrada de la solución. En la segunda fase, de acuerdo con los resultados en la prueba anterior, se aumentó la concentración de tetrazolio a 1,0 o 1,5 % y se varió el método de acondicionamiento. En las especies que se presentó tinción en la primera fase no se realizó la segunda fase. La tinción se consideró adecuada cuando la zona radicular y los cotiledones presentaron color rosa; se prestó especial atención a la zona radicular y, seguidamente, a los cotiledones; si el embrión presenta una tinción no homogénea puede significar un menor vigor, pero no ausencia de viabilidad (Da Silva *et al.* 2012). Un color rosa claro, no homogéneo en la radícula o ausencia de coloración de los embriones los clasificó como no viables. A continuación se explican los acondicionamientos utilizados y en la Tabla 2 se encuentran las características de las pruebas que fueron evaluadas en cada especie:

Sin acondicionamiento (Prueba directa en semillas): se realizó la prueba directamente en las semillas sin ningún tipo de acondicionamiento.

Prueba en embriones: consistió en eliminar la testa y el endospermo, cuando estuviera presente, en la semilla para aplicar la prueba de tetrazolio directamente a los embriones.

Ruptura de la testa: se realizó un orificio en la testa con ayuda de un objeto corto punzante como pinzas de punta fina.

Corte basal: se realizó un corte con un bisturí en el extremo del funículo de la semilla.

Corte dorsal: se realizó un corte longitudinal de la semilla sin afectar el embrión.

En la mayoría de las especies se realizaron las pruebas en cuatro réplicas de 50 semillas; debido a poca disponibilidad de material vegetal en *U. myricoides* se utilizaron tres réplicas de 25 semillas, en *H. goudotiana* cuatro réplicas de 20 semillas y en *C. buxifolium* cuatro réplicas de 15 semillas.

Prueba de germinación

La germinación se evaluó en cajas de Petri con doble papel de filtro en condiciones controladas por medio de una cámara de germinación Thermoline (New South Wales, Australia). Las condiciones de germinación fueron 20/10 °C día/noche, con un fotoperíodo y un termoperíodo de doce horas (Pérez-Martínez *et al.* 2014). La humedad relativa, aunque no fue controlada, se mantuvo alrededor de 75±5 % y fue monitoreada con un Data Logger EBCHQ 94150 (China). Una semilla se consideró germinada cuando se evidenció la emergencia de la radícula de 2 mm o más de longitud. Se utilizaron cuatro réplicas de 50 semillas. La germinación fue evaluada cada tres días hasta que cesó la germinación por tres semanas consecutivas después de haber germinado la mayor parte de las semillas. Al final de los ensayos se examinó la presencia del embrión en las semillas no germinadas. El porcentaje de germinación (PG) se calculó sobre el número de semillas con embrión y el tiempo de germinación mediante el índice de tiempo medio de germinación (TMG) por medio de la ecuación (Tompsett y Pritchard 1998, Ranal y Santana 2006):

$$PG = \left(\frac{N}{N_s} \right) * 100$$

$$TMG = \sum_{i=1}^k ni \cdot ti / \sum_{i=1}^k ni$$

Donde N es el número de semillas germinadas y N_s el número total de semillas con embrión, ni es el número de semillas germinadas en la medida i ésima; ti es el

tiempo en días en la medida i ésima y k es el tiempo total de germinación en días.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk en cada conjunto de datos, seguida de un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con una confianza del 95 % para evaluar diferencias significativas entre el porcentaje germinación y el porcentaje de semillas viables según la prueba de Tetrazolio. Para la comparación con la prueba de germinación se utilizaron los datos que arrojaron los mejores resultados en la prueba de TZ. La prueba de Tetrazolio se consideró estandarizada cuando el porcentaje de

embriones teñidos fue igual o superior al porcentaje de semillas germinadas. Se utilizó el programa estadístico StatGraphics® Centurion XVI versión 16.1.11.

RESULTADOS

Prueba de Tetrazolio

La tinción obtenida en los embriones que indicó viabilidad de la semilla fue rosa oscuro, mientras que los embriones inviables registraron ausencia de coloración en la radícula y colores rosa pálidos esparcidos por los cotiledones sin un patrón homogéneo (Fig. 1).



Figura 1. Resultados de la prueba de viabilidad con Tetrazolio en una especie por familia evaluada. Para cada especie se presenta la semilla, el embrión viable y el embrión no viable. a, b, c. *Puya* sp. nov. aff. *horrida* (Bromeliaceae); d, e, f. *E. grandiflora* (Asteraceae); g, h, i. *P. prostrata* (Ericaceae); j, k, l. *H. prostratum* (Hypericaceae); m, n, ñ. *U. myricoides* (Myrtaceae); o, p, q. *H. goudotiana* (Rosaceae); r, s, t. *X. spiculifera* (Salicaceae); u, v, w. *C. buxifolium* (Solanaceae). Escala = 1 mm.

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

Las condiciones para realizar la prueba de tetrazolio presentaron similitud a nivel de género y familia. En *Espeletia* la consistencia quebradiza de la testa facilita realizar una ruptura ligera para permitir la entrada del TZ sin necesidad de extraer los embriones; para el género el factor que más influye en el proceso de tinción es la concentración; al utilizar tetrazolio al 1 % por 24 horas se alcanzaron viabilidades superiores a 76 % (Tabla 2). Estas mismas condiciones permitieron una tinción superior al 80 % en *P. ledifolia*, por otro lado, gracias a la consistencia delgada y papirácea de la testa la

Tabla 2. Condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba de viabilidad con tetrazolio. Se evaluó la concentración de tetrazolio TZ (0,1 %, 1 % y 1,5 %), el tiempo de exposición a la solución (24 y 48 h) y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. SE= Error estándar.

| Especie | Prueba 1 | | Prueba 2 | |
|--|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | Condiciones | Viabilidad (% ± SE) | Condiciones | Viabilidad (% ± SE) |
| <i>E. barclayana</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 51,2±2,7 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 83±5,6 |
| <i>E. cayetana</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 12±1,5 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 86,6±2,5 |
| <i>E. grandiflora</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 34,3±2,3 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 79,6±2,0 |
| <i>E. killipii</i> | 0,1 % TZ-24 h / Embriones | 15,9±0,7 | 1,0 % TZ-24 h / Ruptura de testa | 76,3±3,0 |
| <i>P. ledifolia</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 86,6±3,5 | | |
| <i>P. nitida</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 3,7±3,1 | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 11,5±4 |
| <i>P. santosii</i> | 1,5 % TZ-24 h / Embriones | 9 | | |
| <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 0 | 1,0 % TZ-48 h / Embriones | 3±1,3 |
| <i>P. trianae</i> | 1,5 % TZ-24 h / Embriones | 6,5±5,3 | | |
| <i>G. anastomosans</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 0±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 40,1±4,4 |
| <i>P. prostrata</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 2,5±1,0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 57,2±3,2 |
| <i>V. floribundum</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 12,2±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte basal | 79,1±7,6 |
| <i>H. prostratum</i> | 0,1 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 4,7±1,7 | 1,0 % TZ-48 h / Sin acondicionamiento | 13,2±1,2 |
| <i>U. myricoides</i> | 1,0 % TZ-24 h / Sin acondicionamiento | 0±0 | 1,5 % TZ-24 h / Corte dorsal | 100±0 |
| <i>H. goudotiana</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 61,3±7,7 | | |
| <i>X. spiculifera</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 97±2,9 | | |
| <i>C. buxifolium</i> | 1,0 % TZ-24 h / Embriones | 98,3±1,7 | | |

prueba se puede realizar directamente en las semillas sin realizar un acondicionamiento previo (Tabla 2).

En *Puya* la tinción fue inferior al 12 % en todas las especies, incluso al evaluar la prueba directamente en el embrión, aumentando el tiempo de exposición y la concentración del tetrazolio (Tabla 2, Fig. 2).

Para las Ericáceas *G. anastomosans*, *P. prostrata* y *V. floribundum*, las cuales poseen una testa delgada pero dura, es necesario realizar un corte basal en la testa que asegure la entrada de Tetrazolio, así como aumentar la concentración hasta el 1,5 % para obtener viabilidades superiores al 40 % (Tabla 2).

En *H. prostratum* no se pudo realizar un acondicionamiento previo en las semillas debido a su pequeño tamaño (Figs. 1j-1), y pese a los cambios utilizados en la prueba sólo se alcanzó una tinción de 13,2 %. Por su parte, *U. myricoides* presenta un cambio radical en los resultados en la prueba uno y dos pasando de 0 % al 100 % de tinción, donde, si bien se modificó la concentración del TZ, el factor crucial para obtener tinción es realizar un corte dorsal en la semilla ya

que esta presenta una testa extremadamente dura y probablemente poco permeable (Fig. 1, Tabla 2).

Finalmente *H. goudotiana*, *C. buxifolium* y *X. spiculifera* presentan testas gruesas, duras y para el caso de las dos últimas especies, un abundante endospermo por lo que es necesario realizar la prueba directamente en los embriones, con una concentración del 1 % para lograr tinciones superiores al 60 % (Fig. 1, Tabla 2).

Prueba de germinación

El porcentaje de germinación varió drásticamente entre las especies, a pesar de esto se observa un comportamiento similar a nivel de familia. Asteraceae fue la familia que presentó la menor germinación donde las especies no superaron el 56 %, además reporta los valores más bajos como en *E. barclayana* 23 % y *E. killipii* 24 % (Fig. 2). En cuanto al tiempo medio de germinación este varió entre 24 y 36 días según la especie (Tabla 3).

La familia Bromeliaceae presentó los mayores valores de germinación, con valores

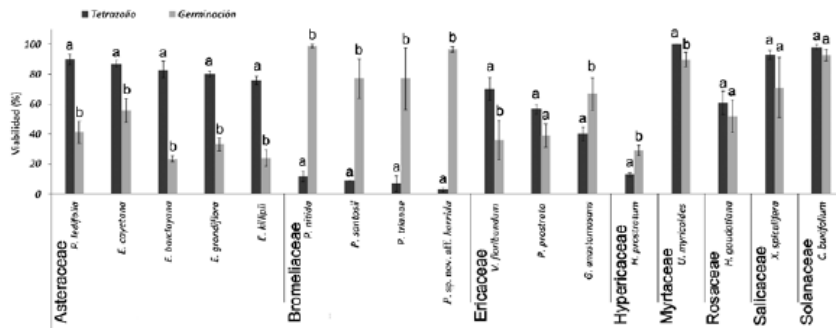


Figura 2. Viabilidad por la prueba de Tetrazolio y de germinación de 17 especies altoandinas. Letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las pruebas de acuerdo con Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Las verticales indican el error estándar ($n = 15-50$).

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

que van desde el 77 al 99 % (Fig. 2), con un tiempo medio de germinación promedio de 36 días (Tabla 3).

En Ericaceae las especies más similares fueron *V. floribundum* y *P. prostrata* con un PG promedio del 37 % y un TMG de 27 días, valores que aumentaron en *G. anastomosans* (Tabla 3 y Fig. 2).

En las especies restantes los mayores valores de germinación los presentaron *C. buxifolium* y *U. myricoides*, seguidas de *X. spiculifera* y *H. goudotiana* todas con valores superiores al 50 %; *H. prostratum* fue la especie que presentó la menor germinación (Fig. 2).

En cuanto al TMG este fue muy variable y dependiente de la especie (Tabla 3).

Comparación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación.

Para la mayoría de las especies se presenta una diferencia en los resultados de viabilidad obtenidos por las diferentes pruebas, aunque en general en la prueba de tetrazolio se presentan los valores más altos de viabilidad. En las especies de la familia Asteraceae se presentaron diferencias entre la viabilidad obtenida por tetrazolio y con germinación ($P < 0,05$) (Tabla 3), siendo tetrazolio la prueba en la cual se presentó una mayor

Tabla 3. Tiempo medio de germinación (TMG) y variación del error estándar (SE) presentado en las pruebas de viabilidad por tetrazolio y germinación. * = diferencias significativas entre la prueba de germinación y tetrazolio de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

| Especie | TMG (Días) | TMG (SE) | Tetrazolio (SE) | Germinación (SE) | P |
|--|------------|----------|-----------------|------------------|-------|
| <i>E. barclayana</i> | 33 | 2,98 | 5,58 | 1,99 | 0,02* |
| <i>E. cayetana</i> | 36 | 1,70 | 2,50 | 8,15 | 0,02* |
| <i>E. grandiflora</i> | 27 | 6,22 | 2,04 | 4,50 | 0,02* |
| <i>E. killipii</i> | 24 | 1,91 | 3,02 | 5,49 | 0,02* |
| <i>P. ledifolia</i> | 30 | 3,99 | 3,55 | 7,37 | 0,02* |
| <i>P. nitida</i> | 33 | 0,90 | 3,59 | 1,04 | 0,01* |
| <i>P. santosii</i> | 25 | 0,67 | 0,00 | 13,20 | 0,01* |
| <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | 38 | 0,58 | 1,30 | 1,84 | 0,02* |
| <i>P. trianae</i> | 48 | 2,00 | 5,25 | 20,58 | 0,04* |
| <i>G. anastomosans</i> | 37 | 3,23 | 4,35 | 10,84 | 0,04* |
| <i>P. prostrata</i> | 25 | 4,55 | 3,16 | 7,68 | 0,06 |
| <i>V. floribundum</i> | 29 | 0,48 | 7,64 | 13,11 | 0,04* |
| <i>H. prostratum</i> | 64 | 1,59 | 1,08 | 4,79 | 0,04* |
| <i>U. myricoides</i> | 57 | 2,54 | 0,00 | 4,91 | 0,03* |
| <i>H. goudotiana</i> | 27 | 1,62 | 7,74 | 10,74 | 0,56 |
| <i>X. spiculifera</i> | 75 | 9,44 | 2,87 | 20,09 | 0,56 |
| <i>C. buxifolium</i> | 42 | 2,67 | 1,67 | 4,12 | 0,31 |

viabilidad, duplicando o triplicando los resultados por germinación (Fig. 2).

En Bromeliaceae también se presentaron diferencias entre las pruebas ($P < 0,05$) (Tabla 3), pero en este caso la prueba de germinación registró los mejores resultados de viabilidad con diferencias entre el 7 y el 77 % entre pruebas (Fig. 2).

En las especies *V. floribundum*, *P. prostrata* y *U. myricoides* se obtuvo mejor viabilidad por la prueba de tetrazolio, sin embargo solo en *V. floribundum* y *U. myricoides* estas diferencias fueron significativas ($P < 0,05$) (Tabla 3). Para el caso de *G. anastomosans* e *H. prostratum* también se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), pero el mayor valor de viabilidad se presentó por el método de germinación (Tabla 3, Fig. 2).

Finalmente en *H. goudotiana*, *X. spiculifera* y *C. buxifolium* no se presentaron diferencias entre las pruebas ($P > 0,05$) (Tabla 3), pero la prueba recomendada por presentar mejores valores de viabilidad es tetrazolio (Fig. 2).

En conjunto los resultados de la prueba por tetrazolio fueron más precisos ya que en general se observaron variaciones entre cero y siete de error estándar, mientras en la germinación estuvieron entre uno y 20 (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Se logró estandarizar la prueba de tetrazolio en 11 de las 17 especies evaluadas, cuyas condiciones específicas se ilustran en la Tabla 4. En nuestro caso, las especies estandarizadas respondieron mejor a la siguiente condición de evaluación: [1-1,5 %] TZ, 40 °C y 24 horas de exposición. Dichas condiciones presentan diferencias frente a lo propuesto por Don (2009), quien recomienda una temperatura de 30 °C y 18 horas de exposición; estas condiciones son efectivas para especies cultivadas, sin embargo no

fueron efectivas en las especies altoandinas evaluadas, lo cual soporta la necesidad de establecer nuevos protocolos para evaluar con precisión la viabilidad en los diferentes grupos de especies (Da Silva *et al.* 2012).

A pesar de que los menores valores de viabilidad por tetrazolio se presentaron en la concentración 0,1 %, no se descarta que puedan ser utilizados en otras especies altoandinas, ya que en diferentes estudios se han obtenido buenos resultados con esta concentración (De Oliveira *et al.* 2005, Grzybowski *et al.* 2012, Da Silva *et al.* 2012, Kaiser *et al.* 2014), lo cual es positivo ya que el uso de menores concentraciones de TZ conlleva a menores costos y posibilita una mejor visualización de patrones de coloración e identificación de diferentes tipos de daño (França Neto *et al.* 1998).

Un cuarto factor determinante es el acondicionamiento que se realice en la semilla antes de su exposición a la solución, lo cual permitirá un contacto directo entre el tetrazolio y el embrión y disminuirá el tiempo necesario para la tinción (Rao *et al.* 2007). Este acondicionamiento dependerá de la morfología y tamaño de la semilla; en nuestro caso se observó un agrupamiento a nivel de familia y género, lo cual sugiere que las condiciones reportadas en esta investigación pueden ser utilizadas en la evaluación de otras especies de la familia o el género (Tabla 4).

No obstante, es de destacar que el pequeño tamaño de las semillas obliga al analista o investigador a desarrollar habilidad en el proceso de acondicionamiento y evaluación ya que es posible que al realizar un corte o extraer directamente el embrión ocasione daños al mismo afectando la lectura de la prueba, de hecho, algunos autores señalan el tamaño de la semilla como una razón para no realizar acondicionamiento al aplicar la prueba (Tielbörger y Prasse 2009, Pradhan y

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

Badola 2012), tal fue el caso de *H. prostratum* y *G. anastomosans*, especies para las cuales no se logró la estandarización de la prueba; se recomienda ampliar los estudios hasta identificar los mejores condiciones de la prueba ya que estas especies pertenecen a las familias Hypericaceae y Ericaceae muy bien representadas en ecosistemas altoandinos (Galindo-T *et al.* 2003, Sklenář *et al.* 2005, Avella-M *et al.* 2014).

De igual manera se recomienda aumentar la concentración y tiempo de exposición en las especies del género *Puya*, que tras probar diferentes condiciones no presentaron la tinción esperada. En cuanto a la germinación también se observó un comportamiento

similar entre géneros y familias. En el caso de los géneros *Espeletia* y *Pentacalia* se obtuvo una germinación menor al 56 % (Fig. 2), estos resultados pueden indicar que las semillas presentan algún tipo de dormancia, en este caso fisiológica, una de las más frecuentes (Baskin y Baskin 2004, 2014) y que ha sido ampliamente reportada para su orden (Baskin y Baskin 2004). Esta forma de dormancia proporciona indicaciones estacionales, asegurando que la germinación ocurra solo después de eventos ambientales específicos (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). Este fenómeno indica que las semillas deben ser sometidas a tratamientos pregerminativos para lograr una buena germinación, entre ellos se sugiere la

Tabla 4. Método y condiciones recomendadas para evaluar la viabilidad en 17 especies altoandinas. En la prueba de Tetrazolio se indica: la concentración del TZ, la temperatura, el tiempo de exposición y el acondicionamiento de la semilla previo a la prueba. En germinación se indica: la temperatura día/noche, el fotoperiodo y la humedad relativa.

| Especie | Prueba recomendada | Condiciones |
|--|--------------------|--|
| <i>E. barclayana</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. cayetana</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. grandiflora</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>E. killipii</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Ruptura de testa |
| <i>P. ledifolia</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Sin acondicionamiento |
| <i>P. nitida</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. santosii</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>Puya</i> sp. nov. aff. <i>horrida</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. trianae</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>G. anastomosans</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>P. prostrata</i> | Tetrazolio | [1,5 %]; 40 °C; 24h; Corte basal |
| <i>V. floribundum</i> | Tetrazolio | [1,5 %]; 40 °C; 24h; Corte basal |
| <i>H. prostratum</i> | Germinación | 20/10±2.5 °C; 12h Luz; HR75 ±5 % |
| <i>U. myricoides</i> | Tetrazolio | [1,5 %]; 40 °C; 24h; Corte dorsal |
| <i>H. goudotiana</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Embriones |
| <i>X. spiculifera</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Embriones |
| <i>C. buxifolium</i> | Tetrazolio | [1 %]; 40 °C; 24h; Embriones |

h = Horas, HR = Humedad relativa.

inmersión en hormonas de crecimiento o la estratificación en frío (Baskin y Baskin 2014). Por otro lado, un estudio realizado por Guariguata y Azocar (1988) en *Espeletia timotensis* reportó germinaciones de hasta el 80 % a temperaturas constantes inferiores a 16 °C, lo cual indica que es recomendable evaluar condiciones de siembra diferentes a las abordadas en este estudio, teniendo en cuenta que estas especies pertenecen a la familia mejor representada y abundante en las zonas de páramo (Sklenář *et al.* 2005).

Por el contrario uno de los mejores resultados de germinación los presentó el género *Puya*, donde se reportaron PG superiores al 77 % con tiempos medios de germinación relativamente cortos (36 días), esto concuerda con lo referenciado por Vadillo *et al.* (2004) en *P. raimondii*, Franco (2014) en *P. nitida* y Pico-V (2016) en *P. loca*, quienes encontraron PG entre el 60 % y el 80 %. Esto indica que las condiciones de germinación utilizadas son adecuadas para las especies que evaluamos y posiblemente para el género (Tabla 4); sin embargo es importante resaltar que para algunas especies la germinación en condiciones de laboratorio tiende a ser mayor que en condiciones de campo (Guariguata y Azocar 1988), lo cual explica porqué Mora y Vargas (2007) registraron valores de germinación en bancos de semillas por debajo del 1 % en *Puya cryptantha* y *P. trianae* en los páramos colombianos. Estos resultados evidencian la importancia de implementar estrategias de propagación *ex situ* en aquellas especies que de forma *in situ* presentan problemas en su germinación o reclutamiento como es el caso de las del género *Puya* las cuales en su mayoría son endémicas y presentan alguna categoría de amenaza (Betancur 2015).

La familia Ericaceae se caracteriza por presentar frutos pequeños en bayas o cápsulas con un alto número de semillas pequeñas, lo cual, sumado a la dispersión

principalmente zoocora, le permite contar con una amplia dispersión, que favorece junto a su rápida germinación la colonización de nuevos lugares (Luteyn 2002). Esta rápida germinación se evidenció en las especies evaluadas, donde los tiempos medios de germinación oscilaron entre 25 y 37 días, la especie con menor PG fue *V. floribundum* con 36 %, mientras *G. anastomosans* presentó el mayor PG con 66 % (Fig. 2), los valores encontrados concuerdan con lo reportado por Pérez-Martínez *et al.* (2014) en su estudio de propagación en especies de páramo. En ericáceas la germinación se ve afectada por dos factores principales: la baja viabilidad de los embriones (La Rosa *et al.* 2017) la cual puede estar influenciada por la variación en el tamaño y los estados de maduración de las semillas dentro de un fruto (Chaparro y Becerra 1999, Kloet y Cabilio 2010, Castro *et al.* 2012) y la presencia de dormancia fisiológica en las semillas (Baskin y Baskin 2004, Hernández *et al.* 2009), lo que hace necesario aplicar tratamientos pregerminativos (Magnitskiy y Ligarreto 2007, Hernández *et al.* 2009).

H. prostratum fue una de las especies que presentó la menor germinación (29 %) y un TMG de 64 días (Fig. 2), este comportamiento ha sido reportado en otras especies del género (Macchia *et al.* 1983, Çirak *et al.* 2007), donde la baja capacidad germinativa está relacionada con la presencia de dormancia en las semillas y sus altos requerimientos lumínicos (Thompson y Whatley 1984), por tal motivo se recomienda incluir tratamientos pregerminativos que permitan romper la dormancia en la especie.

El resultado de la germinación en *U. myricoides* fue similar al encontrado por Figueroa *et al.* (1996) en *U. molinae*, donde obtuvieron una germinación de 82 %. En la especie *H. goudotiana* la germinación fue mucho menor a lo esperado (Pérez-Martínez *et al.* 2014), de acuerdo con las características

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

que se observaron de la semillas, presentan un embrión bien desarrollado con cotiledones gruesos que pueden favorecer la germinación, sin embargo la presencia de una testa gruesa y dura presenta a su vez un impedimento para la germinación (Fig. 1), por lo cual se considera que un corte podría aumentar este porcentaje.

Finalmente en *X. spiculifera* y *C. buxifolium* se presentó una alta germinación (Fig. 2), lo que es de esperarse ya que estas especies presentan un hábito herbáceo o arbustivo, amplia distribución (Alford c2018, Canal c2018), alta tolerancia a los disturbios y tendencia a ser pioneras en los estadios sucesionales, por lo cual diferentes autores recomiendan su uso en programas de restauración (Acero-Nitola y Cortés-Pérez 2014, Cabrera y Ramírez 2014).

En conclusión los resultados permitieron comparar cuál método es el más adecuado para evaluar la viabilidad de cada una de las especies (Tabla 4), sin embargo, la elección del método dependerá del objetivo de la investigación, si solo se requiere conocer la viabilidad será suficiente utilizar la prueba de tetrazolio siempre que se conozcan las condiciones adecuadas para evaluarla, pero esta no permite conocer los requerimientos y potencial de germinación de las especies.

En conjunto estas pruebas permiten identificar condiciones fisiológicas de las semillas que no podrían ser detectadas al usarlas de manera individual, por ejemplo la detección de una germinación menor a la viabilidad reportada en tetrazolio podría sugerir la presencia de dormancia no unificada en las semillas, tal como sucedió en las familias Asteraceae y Ericaceae (Fig. 2) y sucede en diferentes familias presentes en los bosques altoandinos (Baskin y Baskin 2004) usada como una estrategia que le confiere a las especies la capacidad

de distribuir la geminación en el tiempo y adaptarse a las condiciones variables del ambiente, favoreciendo la supervivencia y establecimiento de nuevas poblaciones (Snyder 2006).

PARTICIPACIÓN DE AUTORES

CMM y MCH toma de datos; CMM, LVPM y MCH análisis de datos; CMM, LVPM y MCH escritura del documento.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no presentan conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

A la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis por el apoyo financiero, al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, al investigador Carlos Iván Suarez Ballesteros por la identificación taxonómica de las especies y consecución de las fuentes semilleras. Se agradece al personal operativo por su ayuda en las labores de acondicionamiento: Ana Milena Torres, Claudia Muñoz y Mónica López.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

El anexo 1 se presenta como material suplementario bajo el doi: <https://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v40n2.76108>.

LITERATURA CITADA

Abbade LC, Takaki M. 2014. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. Rev. Árvore. 38(2):233–240.

- Acero-Nitola AM, Cortés-Pérez F. 2014. Propagación de especies nativas de la microcuenca del río La Vega, Tunja, Boyacá, con potencial para la restauración ecológica. *Rev. Acad. Colomb. Ciencias* 38(147):195–205. doi:10.18257/raccefyn.76.
- Alford MH. c2018. *Xylosma spiculifera* (Tul.) Triana y Planch. Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia [Revisada en: 19 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Aslam M, Reshi ZA, Siddiqi TO. 2010. Standardization of seed viability protocol for *Pinus wallichiana* A.B. Jackson in Kashmir, India. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 4(3):93–98.
- Avella-M A, Torres-R S, Gómez-A W, Pardo-P M. 2014. Los páramos y bosques altoandinos del pantano de Monquentiva o pantano de Martos (Guatavita, Cundinamarca, Colombia): caracterización ecológica y estado de conservación. *Biota Colomb.* 15(1):3–39.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Lexington: Universidad de Kentucky.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14(1):1–16. doi:10.1079/SSR2003150.
- Baskin C, Baskin J. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Segunda ed. San Diego, CA, USA: Academic/Elsevier.
- Betancur J. c2015. *Puya*. En: Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Versión en línea [Revisada en: 24 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Borza JK, Westerman PR, Liebman M. 2007. Comparing Estimates of Seed Viability in Three Foxtail (*Setaria*) Species Using the Imbibed Seed Crush Test with and Without Additional Tetrazolium Testing. *Weed. Technol.* 21(2):518–522. doi:10.1614/WT-06-110.
- Bradbeer JW. 1988. *Seed Dormancy and Germination*. Primera edición. New York: Blackie and Son.
- Bremholm T. 1993. Evaluation of techniques for establishing sedge meadow vegetation. [Tesis]. [Ames, Iowa]: Iowa State University.
- Cabrera M, Ramírez W, editores. 2014. Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación. Bogotá, D.C Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Canal D. c2018. *Cestrum buxifolium* Kunth. Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de las plantas y líquenes de Colombia [Revisada en: 19 Jun 2018]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Castro C, Olarte Y, Rache L, Pacheco J. 2012. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agron. Colomb.* 30(2):196–203.
- Cavieres LA, Arroyo MTK. 2000. Seed germination response to cold stratification period and thermal regime in *Phacelia secunda* (Hydrophyllaceae): Altitudinal variation in the mediterranean Andes of central Chile. *Plant Ecol.* 149(1):1–8. doi: 10.1023/A:1009802806674.
- Chaparro M, Becerra N. 1999. Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Act. Biol. Colomb.* 4(1):47–60.
- Çirak C, Kevseroğlu K, Ayan AK. 2007. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. *J. Arid. Environ.* 68(1):159–164. doi: 10.1016/j.jaridenv.2006.03.027.
- Da Silva CB, Barbosa RM, Vieira RD. 2012. Evaluating Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) Seed Viability Using the Tetrazolium Test. *Seed Technol.* 34(2):263–272. doi: 10.13140/RG.2.1.2422.8883.
- De Oliveira L, De Carvalho M, Nery M. 2005. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A.P. de Candolle) Standley – Bignoniaceae. *Rev. Ciênc. Agron.* 36(2):169–174.
- Don R, editor. 2009. *Handbook of Seedling Evaluation*. Zürich: International Rules for Seed Testing.
- Figueroa J, Armesto JJ, Hernández JF. 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69:243–251.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 69:243–251. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.
- França Neto J, Krzyzanowski F, Da Costa N. 1998. O teste de tetrazólio em sementes de soja. EMBRAPA-CNPSO Documento. 116:72.

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

- Franco A. 2014. Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia). [Tesis]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia.
- Galindo-T R, Betancur J, Cadena-M JJ. 2003. Estructura y composición florística de cuatro bosques andinos del Santuario de Flora y Fauna Guanentá-Alto Río Fonce, Cordillera Oriental Colombiana. *Caldasia* 25(2):313–335.
- Gaspar-Oliveira C, Martins C, Nakagawa J. 2009. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. *Rev. Bras. Sementes*. 31(1):160–167.
- Gera N, Gera M, Purohit M. 1998. Tetrazolium test for the seeds of *Acacia nilotica* Willd. ex. Del. *Indian For.* 124(12):1039–1042.
- Godefroid S, Vyver A, Vanderborght T. 2010. Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodivers. Conserv.* 19(5):1365–1383. doi:10.1007/s10531-009-9767-3.
- Grzybowski CR de S, Ohlson O de C, Silva RC da, Panobianco M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Rev. Bras. Sementes* 34(1):47–54. doi:10.1590/S0101-31222012000100006.
- Guariguata M, Azocar A. 1988. Seed Bank Dynamics and Germination Ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an Andean Giant Rosette. *Biotropica* 20(2):54–59. doi:10.2307/2388426.
- Hernández M, Lobo M, Medina C, Cartagena J, Delgado O. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agron. Colomb.* 27(1):15–23.
- Hosomi ST, Santos RB, Custodio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Sci. Technol.* 39(1):178–189. doi:10.15258/sst.2011.39.1.15.
- Howarth MS, Stanwood PC. 1993. Measurement of seedling growth rate by machine vision. *Transactions of the ASAE.* 36(3):959–963. doi: 10.13031/2013.28422.
- Kaiser D, Freitas L, Biron R, Simonato S, Bortolini M. 2014. Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage. *J. Seed Sci.* 36(3):344–351. doi: 10.1590/2317-1545v36n31022.
- Kalin M, Cavieres A, Castor C, Humaña A. 1999. Persistent soil seed bank and standing vegetation at a high alpine site in the central Chilean Andes. *Oecologia* 119(1):126–132. doi: 10.1007/s004420050768.
- Kloet S., Cabilio P. 2010. Magnitudinal Asymmetries in Seed Production in *Vaccinium corymbosum*: Anomaly or Not? *Am. Midl. Nat.* 163(2):463–472. doi:10.2307/40730940.
- La Rosa R, Sánchez M, Pérez E. 2017. Morfología interna e histología de arándano *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) en Lima, Perú. *Agron. Colomb.* 35(2):176–181. doi: 10.15446/agron.colomb.v35n2.63146.
- Lamarca E V, Barbedo CJ. 2014. Methodology of the tetrazolium test for assessing the viability of seeds of *Eugenia brasiliensis*. *J. Seed Sci.* 36(4):427–434. doi:10.1590/2317-1545v36n41029.
- Lazarotto M, Piveta G, Muniz M, Reiniger L. 2011. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. *Semin. Agrar.* 32(4):1243–1250. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1243.
- Luteyn JL. 2002. Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *Bot. Rev.* 68(1):55–87. doi: 10.1663/0006-8101(2002)068[0055:DAAEIN]2.0.CO;2.
- Macchia N, Benvenuti A, Angelini L. 1983. Germination characteristics of some seeds of medicinal plants. *Rastitel'nye-resursy* 21:461–463.
- Magnitskiy S, Ligarreto G. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 1(2):137–141.
- McDonald MB. 1998. Seed quality assessment. *Seed Sci. Res.* 8(2):265–276.
- Menges ES, Guarrant EO, Hamze S. 2004. Effects of seed collection on extinction risk of perennial plants. In: Guarrant EO, Havens K, Maunder M, editores. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Washington (DC): Island Press.
- [MAPA] Ministerio de agricultura, pecuaria y abastecimiento. 2009. Regras para análise de

- sementes. Primera edición. Brasilia: Ministerio de agricultura, pecuaria y abastecimiento.
- Mora F, Vargas O. 2007. Germination dynamics, seed dormancy and seedling recruitment in *Puya cryptantha* and *P. trianae*, two giant rosettes of the Colombian Páramos. *Ecotropicos*. 20(1):31–40.
- Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Primera edición. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ooi M, Auld T, Whelan R. 2004. Comparison of the cut and tetrazolium tests for assessing seed viability: a study using Australian native *Leucopogon* species 5(2):141–143. *Ecol. Manag. Restor.* doi: 10.1111/j.1442-8903.2004.201-6.x.
- Pérez-Martínez LV, Rodríguez NA, Melgarejo LM, Vargas RO. 2014a. Propagación por semilla de 13 especies de páramo. En: Vargas RO, Pérez-Martínez LV, editores. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia. p. 115–124.
- Pérez-Martínez LV, Rodríguez NA, Melgarejo LM, Vargas RO. 2014b. Fichas técnicas por especie. En: Vargas RO, Pérez-Martínez LV, editores. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia. p. 126–174.
- Pico-V A. 2016. Conservación *ex situ* de *Puya loca* Madriñan (Bromeliaceae) y registro de una segunda localidad en los páramos de Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 40(157):637–643. doi: 10.18257/raccefyn.374.
- Pinto T, Marcos J, Forti V, Cristiane C, Gomes S. 2009. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. *Rev. Bras. Sementes* 31(2):195–201.
- Pradhan BK, Badola HK. 2008. Seed Germination Response of Populations of *Swertia chirayita* [(Roxb. ex Fleming) H. Karst] Following Periodical Storage. *Seed Technol.* 30(1):63–69.
- Pradhan BK, Badola HK. 2012. Effect of Storage Conditions and Storage Periods on Seed Germination in Eleven Populations of *Swertia chirayita*: A Critically Endangered Medicinal Herb in Himalaya. *Sci. World J.* 2012:1–9. doi: 10.1100/2012/128105.
- Purohit M, Bisht S. 1999. Use of TTC for Interpretation of Viability of Seeds of *Albizia procera* (ROXB.) Benth. *Indian For.* 125(8):828–834.
- Pywell RF, Bullock JM, Roy DB, Warman LIZ, Walker KJ, Rothery P. 2003. Plant traits as predictors of performance in ecological restoration. *J. Appl. Ecol.* 40(1):65–77. doi: 10.1046/j.1365-2664.2003.00762.x.
- Ranal M, Santana D. 2006. How and why to measure the germination process. *Rev. bras. Bot.* 29(1):1–11. doi:10.1590/S0100-84042006000100002.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Novell D, Larinde M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Roma, Italia: Biodiversity International.
- Renison D, Hensen I, Cingolani AM. 2004. Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Pohlylepis australis* mountain forests of central Argentina. *For. Ecol. Manage.* 196(2–3):327–333. doi: 10.1016/j.foreco.2004.03.025.
- Rodríguez M, Puentes J, Cortés F. 2006. Caracterización temporal de la lluvia de semillas en un bosque nublado del cerro de Mamapacha (Boyacá-Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30(117):619–624.
- Ruiz MA. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Publicación técnica no. 77. EEA INTA Anguil.
- Santos M, Novembre A, Marcos-Filho J. 2007. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Sci. Technol.* 35(1):213–223. doi: 10.15258/sst.2007.35.1.19.
- Sawma JT, Mohler CL. 2002. Evaluating Seed Viability by an Unimbibed Seed Crush Test in Comparison with the Tetrazolium Test 1. *Weed Technol.* 16(4):781–786. doi: 10.1614/0890-037X(2002)016[0781:ESVBAU]2.0.CO;2.
- Schmidt L. 2000. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre.
- Sklenář P, Luteyn JL, Ulloa C, Jorgensen PM, Dillon MO. 2005. Flora genérica de los páramos: guía ilustrada de las plantas vasculares. New York: New York Botanical Garden Press.
- Smith CH. 1952. Heritable differences in germination of sugar-beet seed at low temperatures. *Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 7:411–414.
- Snyder RE. 2006. Multiple risk reduction mechanisms: can dormancy substitute for

Viabilidad y germinación de especies altoandinas

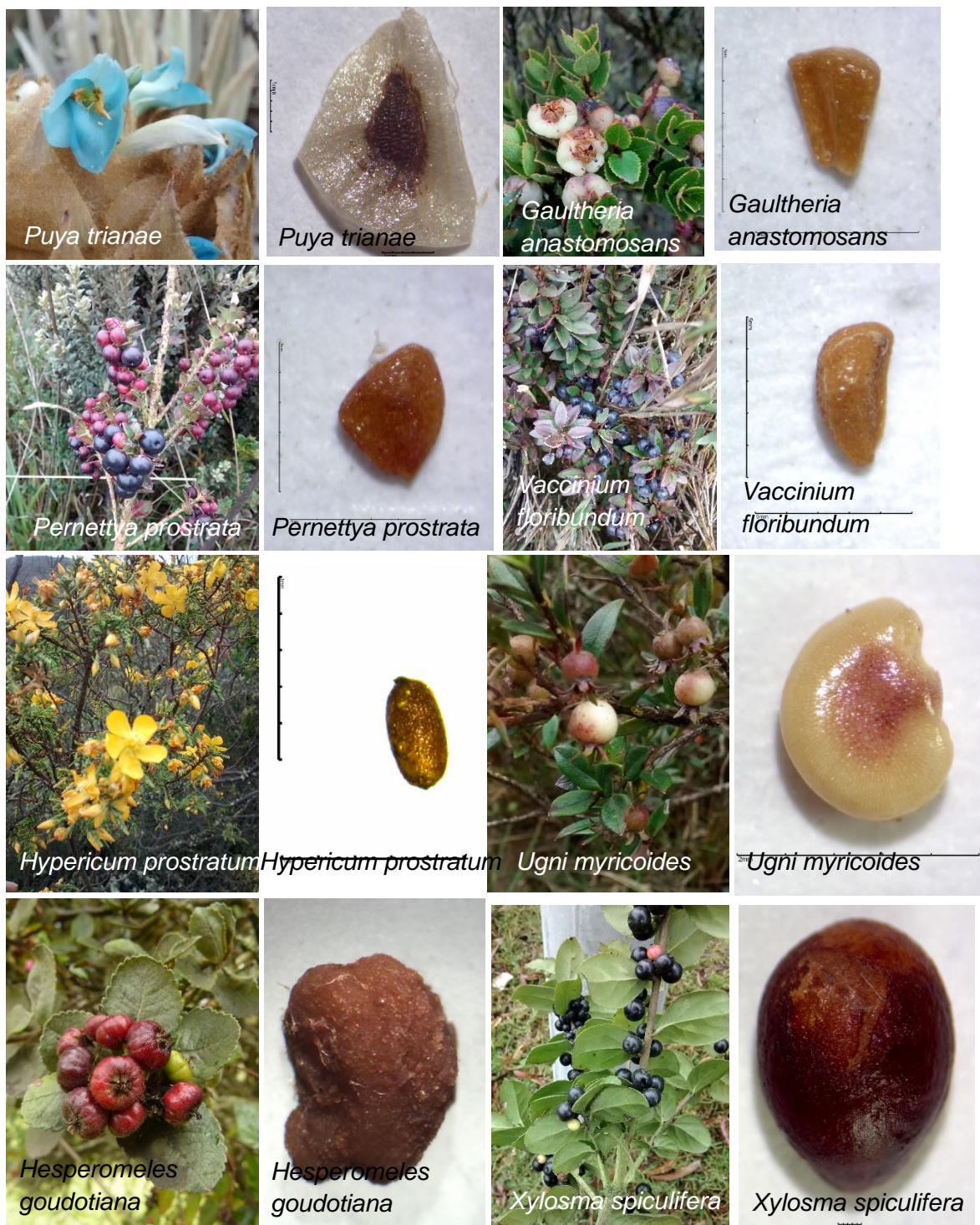
- dispersal? *Ecol. Lett.* 9(10):1106–1114. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00962.x.
- Thompson K, Whatley JC. 1984. A thermogradient bar apparatus for the study of the germination requirements of buried seeds in situ. *New Phytol.* 96(3):459–471. doi: 10.1111/j.1469-8137.1984.tb03580.x.
- Tielbörger K, Prasse R. 2009. Do seeds sense each other? Testing for density-dependent germination in desert perennial plants. *Oikos* 118(5):792–800. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17175.x
- Tompsett P, Pritchard H. 1998. The Effect of Chilling and Moisture Status on the Germination, Desiccation Tolerance and Longevity of *Aesculus hippocastanum* L. *Seed. Ann Bot.* 82:249–261.
- Torres SB, Marcos-Filho J. 2005. Physiological potential evaluation in melon seeds (*Cucumis melo* L.). *Seed Sci. Technol.* 33(2):341–350. doi: 10.15258/sst.2005.33.2.07.
- Vadillo G, Suni M, Cano A. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Rev. Peru. Biol.* 11(1):71–78. doi: 0.15381/rpb.v11i1.2435.
- Willan RL. c1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. FAO, Roma (Italia). [Revisada en: 21 Sep 2017]. <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/ad232s00.htm#TOC>
- Zeng YJ, Wang YR. 2009. Methods of topographical tetrazolium testing for seed viability of *Nitraria tangutorum* Bobr. and *N. sibirica* Pall. *Seed Sci. Technol.* 37(3):691–698. doi: 10.15258/sst.2009.37.3.16.

Recibido: 21/10/2017

Aceptado: 23/07/2018

Anexo 2. Registro fotográfico de la planta y la semilla de 20 especies de páramo.







Cestrum buxifolium



Cestrum buxifolium



Brugmansia x candida



Brugmansia x candida



Tibouchina grossa
Foto: Carlos Suarez



Tibouchina grossa



Bomarea multiflora
Foto: Carlos Suarez



Bomarea multiflora