

TRABAJO CIENTÍFICO

## Germinación de *Drimys granadensis* L.f. (Winteraceae) en condiciones de invernadero y laboratorio *in vitro*

*Germinating drimys granadensis* L.f. (winteraceae) in greenhouse and in vitro laboratory conditions

Castañeda-Garzón S. L.<sup>1</sup> y B. A. Pérez-Martínez<sup>1</sup>

Recibido en septiembre de 2016; aceptado en octubre de 2017

### RESUMEN

La necesidad de fortalecer los procesos de conservación *ex situ* de especies nativas medicinales, ha generado el desarrollo continuo de estudios para la identificación de los protocolos de reproducción vegetal. Recientemente, la especie *Drimys granadensis* L.f. (canelo de páramo), fue incluida en los estudios de propagación sexual, para evaluar la germinación ante el uso de tratamientos pregerminativos. El proceso se desarrolló a través de la identificación y selección de fuentes semilleras candidatas, la recolección y acondicionamiento de material vegetal, el establecimiento, seguimiento y evaluación de los ensayos de germinación. La máxima tasa de germinación en invernadero (63,50 %) se obtuvo al estratificar las semillas en frío a 4 °C (arena de río e hidratación) y sembrar en sustrato de tierra negra-lombricompost (50 %-50 %) bajo un porcentaje de sombra del 30 %. El uso de giberelina A<sub>3</sub> en concentraciones de 1000 y 2000 ppm, es igualmente favorable, al sembrar directamente en turba y/o arena de río (100 %). Por métodos *in vitro*, el mayor nivel de desinfección se obtuvo con hipoclorito de sodio al 5,25 % con inmersión del explante durante 5 minutos y la germinación se ve influenciada por la remoción de la testa y la siembra en un medio de cultivo sin fitoreguladores ni suplementos orgánicos.

**Palabras Clave:** Bosque altoandino; Colombia; Especie nativa; Medio de cultivo; Propagación sexual.

### ABSTRACT

The need for strengthening *ex situ* native medicinal species conservation processes has led to the continued development of studies for the identification of plant breeding protocols. Recently, the *Drimys granadensis* L.f. (canelo de páramo) species was included in sexual propagation studies, to evaluate its germination when using pregerminative treatments. The process developed by identifying and selecting the candidates for seed sources, the collection and preparation of plant material, its establishment, monitoring and evaluation of the germination tests. The maximum germination rate in greenhouse (63.50 %) was obtained by stratifying the seeds at 4 °C (river sand and hydration) and seeding in black vermicompost (50-50 %) soil substrate under a shade percentage of 30 %. Applying gibberellin A<sub>3</sub> at concentrations of 1000 ppm and 2000 ppm, is equally favorable when sown directly in peat and/or river sand (100 %). For *in vitro* germination, the highest level of disinfection was obtained using sodium hypochloride at 5.25 % with explant immersion for 5 minutes and germination is influenced by the removal of the seed coat and planting in a culture medium with neither growth regulators nor organic supplements.

**Keywords:** Colombia; High Andean forest; Culture medium; Native species; Sexual propagation.

<sup>1</sup> Jardín Botánico de Bogotá. Av. Calle 63 N° 68-95 Bogotá, D.C. Colombia. E-mail: slcastanedabb.gov.co

## 1. INTRODUCCIÓN

Según el DAMA (2004), “en el Distrito Capital, el Bosque Altoandino se encuentra en el rango altitudinal de 2.800 a 3.000 m s. n. m., se caracteriza por la disminución de altura de los árboles y se diferencia del bosque andino porque tiene un estrato arbóreo y una mayor cobertura de los estratos arbustivos y herbáceas. Allí es posible encontrar bosques altos y bajos”. El encenillal típico (vegetación característica de este tipo de bosque), es una consociación de encenillos (*Weinmannia tomentosa*) con gaque (*Clusia sp.*), cucharo (*Myrsine sp.*) y chusque (*Chusquea sp.*) como principales subdominantes. Entre algunas de las coberturas presentes, se encuentra el “bosque de laderas altas de encenillo (*W. tomentosa*) y canelo (*Drimys granadensis*) entre los 3.200 y 3.400 m, localizado típicamente en Monserrate, San Francisco y Santa Fe” (DAMA, 2000).

En Colombia la deforestación es el principal disturbio antrópico que afecta a todos los ecosistemas terrestres y algunos costeros. Ante esta situación, el manejo de ecosistemas a través de conservación y restauración ecológica toma fuerza cada día, como solución para revertir procesos de degradación de ecosistemas y pérdida acelerada de biodiversidad (Vargas, 2011). En la región andina la práctica agropecuaria ha ascendido a los pisos alto andino y de páramo, y ha originado nuevos frentes de colonización y alterado así, los ecosistemas de las laderas cordilleras (FAO, 2002). Para abordar en cierta medida la problemática mencionada, el programa de investigación en Manejo de especies vegetales de la Región Capital, liderado por la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (JBB), dentro de las estrategias de conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos, contempla el desarrollo de estudios en propagación (sexual e *in vitro*). Esta línea de investigación, fundamenta las actividades del Sistema Integrado de Propagación (SIP) y el desarrollo del proyecto Biodiversidad andina al plato de todos, financiado por Colciencias.

*Drimys granadensis*, conocida como canelo de páramo, es una especie nativa que se encuentra en la región biogeográfica de los Andes, se distribuye desde el centro de México hasta el norte de Perú y su estado de conservación no ha sido evaluado aún. En Colombia se encuentra en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander (Bernal *et al.*, 2015). Crece en formaciones vegetales de bosque montano bajo (b-MB) y bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB) - Cantillo *et al.* (2007). Según Finegan (1993) y Cantillo *et al.* (2007), esta es una especie heliófita durable que requiere de sombra en sus primeras etapas de desarrollo. Todas las partes de la planta son aromáticas y de sabor picante (Bartholomäus *et al.*, 1998), se reproduce por semillas y estacas (Cantillo *et al.*, 2007), tiene diversos usos alimenticios, industriales, medicinales, ornamentales (CAR, 2012) y sus aceites esenciales poseen metabolitos activos que son usados como sustancias insecticidas (Ciccío, 1997).

Las semillas de *D. granadensis* L. f. se desarrollan al interior de frutos simples, secos, indehiscentes en forma de cápsula. Su color es verde cuando se encuentra en óptimo estado (etapa de fructificación) y café-verdoso cuando las semillas están deterioradas. Pasado el tiempo de fructificación las semillas caen al suelo alrededor del árbol madre, y allí la cápsula se rompe para dar inicio a una nueva fase de propagación sexual. Los frutos varían de tamaño (entre 0.5 y 1.6 mm aproximadamente), y el número de semillas contenidas en cada fruto oscila entre 1 y 3 en frutos de tamaño menor, y entre 3 y 10 en frutos de tamaño mayor a 1.5 cm Cantillo *et al.*, (2007). Esta especie ha sido incluida en Vademécum de Plantas Medicinales de Colombia por el Ministerio de la Protección Social (2004), por su actividad farmacológica y sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, siendo útiles las hojas y la corteza. La familia Winteraceae no dispone aún de información de condiciones de almacenamiento (Royal Botanical Gardens - Kew, 2008).

Según Castañeda-Garzón (2014), los resultados de las pruebas de calidad de semillas en *D. granadensis* L.f. procedente de Choachí (Cundinamarca, vereda Agua Dulce), el porcentaje de pureza es 93,18 %, el peso promedio de semillas es 0,14 gr, el contenido de humedad es 39,70 %, el

la viabilidad al corte es 96,65 % y el porcentaje de germinación promedio es 47 % en sustratos (arena y turba) y del 16 % en papel absorbente (pruebas de germinación controlada, 4 muestras de 50 semillas). Se tiene conocimiento que las semillas de color negro son las que exhiben germinación, siendo éste un indicador fisiológico de la semilla de *D. granadensis*.

Con respecto a la propagación sexual de *D. granadensis*, Castañeda-Garzón (2014) afirma que el porcentaje de germinación de material proveniente de Choachí (Cundinamarca) es cercano al 43 % al emplear tratamientos pregerminativos fitohormonales de giberelina A<sub>3</sub> (1000 y 2000 ppm) y sembrar en turba (100 %) o arena (100 %) bajo un porcentaje de sombra del 30%, corroborando y complementando los aportes hechos por Castañeda *et al.* (2007). El autor menciona que el momento óptimo para la colecta de semillas se presenta cuando el fruto tiene una coloración verde y se encuentra en el árbol; aspecto corroborado al consultar los resultados obtenidos por Cantillo *et al.*, (2007).

Con el objetivo de evaluar de manera preliminar la respuesta de la especie *D. granadensis* ante el uso de métodos de reproducción sexual e *in vitro*, tratamientos de desinfección, pregerminativos y sustratos, se desarrolló el presente estudio que contempló como fases de trabajo la recopilación de información secundaria y la prospección, el seguimiento fenológico y la identificación de fuentes semilleras candidatas (FSC) en áreas circundantes a la Región Capital, la recolección y el acondicionamiento de material vegetal, el establecimiento de ensayos de germinación en condiciones de invernadero e *in vitro*, el seguimiento de la germinación y el análisis de los resultados.

El presente manuscrito no profundiza aspectos relacionados con parámetros de vigor, viabilidad, morfometría de semillas y biometría de plantas, ya que estos análisis son desarrollados por el equipo del banco de semillas del Jardín Botánico de Bogotá (JBB), que posteriormente entregará resultados para la especie. El alcance del presente estudio permite identificar el poder germinativo de las semillas de *D. granadensis* en condiciones de invernadero e *in vitro* y su potencial uso por parte de comunidades del Distrito Capital, como uno de los aspectos contemplados a desarrollar en el marco del proyecto “Biodiversidad Altoandina al plato de todos”.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación de fuentes de semillas y recolección de material vegetal

Con base en la metodología para la evaluación de atributos funcionales de León-Moya (2011) y la selección de fuentes semilleras candidatas de Castañeda-Garzón (2014), se identificaron y evaluaron rodales de *D. granadensis* en zona rural de los municipios de Choachí (vereda Agua Dulce, 4° 36'N-73° 58'W, 2.999 m s. n. m.) y Chipaque (vereda Calderitas, 4° 24'N-74° 06'W, 3.135 m s. n. m.) en Cundinamarca, y la localidad de Santa Fe (vereda Verjones, 36° 06'N-74° 01'W, 3.311 m s. n. m.) en el Distrito Capital (Colombia). Los sitios visitados fueron priorizados a partir del estado fenológico en el periodo de desarrollo del estudio y concuerdan con algunos de los registros de herbario.

La identificación de rasgos morfológicos de flores, frutos y semillas descritas por Cantillo *et al.* (2007) y Castañeda-Garzón (2014) y el seguimiento fenológico en las fuentes de semilleras candidatas, permitió la cosecha de frutos maduros (color verde) de los árboles seleccionados, a partir de los cuales se obtuvieron las semillas para el desarrollo de los ensayos de germinación. Una vez identificados los individuos en campo, se recolectaron los especímenes de herbario y el material reproductivo, tomando no más del 30 % de los frutos por individuo. Los especímenes reposan en el Herbario del JBB, con los números de colección SLCG39, SLCG44 y SLC673.

Seguidamente, los frutos fueron depositados en bolsa plástica de cierre hermético hasta su entrega al laboratorio, cuyo periodo no tardó más de 6 horas. En las instalaciones, los frutos fueron abiertos con ayuda de un bisturí y las semillas se extrajeron manualmente, dispersándolas en bandejas plásticas sobre papel de cocina, para favorecer su aireación. Finalmente, el material fue seleccionado y almacenado hasta su uso, en bolsa de papel a una temperatura de 4 °C (refrigerador). Se descartaron las semillas de color verde y/o café, ya que las pruebas de viabilidad por observación directa, revelaron la ausencia de estructuras internas formadas y/o deterioro. Aunque algunos autores recomiendan secar al sol las semillas una vez extraídas (CAR, 2012), en el presente estudio, el procesamiento del material se llevó a cabo en laboratorio, eliminando la humedad superficial y almacenando inmediatamente.

### **Ensayos de germinación tradicional**

De acuerdo con los resultados obtenidos por Marquinez-Casas *et al.* (2009), Castañeda *et al.* (2007) y Pérez-Martínez (2012), se establecieron varios ensayos de germinación en el invernadero de la Subdirección Científica del JBB (fotoperiodo 12/12 y sombra 30 %), bajo diseños experimentales completamente al azar (excepto por dos ensayos debido a la poca disponibilidad de material vegetal), que incluyeron como factores de análisis: fuentes semilleras candidatas, sustratos y tratamientos pregerminativos. Los sustratos empleados fueron arena (AR), lombricompost (LBC), turba (TU), tierra negra (TN) y cascarilla de arroz (CA). En tanto que como tratamientos pregerminativos se evaluó el uso de fitohormonas (GA<sub>3</sub> 0, 1.000, 2.000 y 4.000 ppm), el almacenamiento en frío (4 °C), la inmersión en agua fría (IAF) y caliente (IAC, a punto de ebullición), y/o la estratificación en frío a 4 °C entre arena de río e hidratación (EFAH) (Tabla 1). Todos los ensayos fueron establecidos en germinadores plásticos y bajo malla polisombra (30 %) debido a la efectividad de la misma sobre la propagación sexual en condiciones de invernadero, informada por Castañeda *et al.* (2007). En invernadero la temperatura promedio fue de 15,72 °C y la humedad relativa promedio del 76,70 %; el periodo máximo de registro de germinación (emergencia de plántulas) en los ensayos fue de 193 días.

### **Ensayos de germinación *in vitro***

Paralelamente, se indujo la germinación *in vitro* de semillas provenientes de la misma procedencia. El experimento se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección Científica del JBB. En la etapa de desinfección, las semillas se sumergieron en una solución de detergente neutro (extran®, 2 %) durante 15 min. Después se realizaron 3 enjuagues con agua microfiltrada estéril, se continuó con la inmersión en hipoclorito de sodio al 5,25 % durante 1, 3, 5 y 7 min (TD1, TD2, TD3 y TD4, respectivamente) y se finalizó con la aplicación tres enjuagues con agua microfiltrada estéril. Las semillas fueron sembradas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), con reducción de sus sales minerales y vitaminas en un 50 % (MS ½). Como suplementos se emplearon: myo-inositol (0.1 gr/l), carbón activado (2 gr/l), sacarosa (15 gr/l) y agar (5 gr/l). La unidad experimental fue de 1 semilla por tubo de ensayo y se manejaron 5 repeticiones por tratamiento de desinfección. La evaluación del porcentaje de contaminación se realizó una semana después de la siembra. Para el proceso de germinación *in vitro*, las semillas fueron desinfectadas de acuerdo con el esquema que brindó los menores niveles de contaminación y se sometieron un tratamiento pregerminativo relacionado con remoción de la testa (R), siembra directa (S) o estratificación fría a 16 °C durante 1 mes, en recipiente oscuro (E). Posteriormente, se llevó a cabo la siembra de semillas en los medios de cultivo descritos en la Tabla 2. En total, fueron evaluados 18 tratamientos de germinación (Tabla 3). La unidad experimental correspondió a una semilla en un frasco de cultivo. Se sembraron 6 repeticiones para cada uno de los tratamientos de germinación. Los frascos se ubicaron en la sala de incubación en total oscuridad, con un rango de temperatura entre 19 y 27 °C. El registro de la variable porcentaje de germinación se realizó cada 7 días durante 3 meses. Se consideró la semilla germinada cuando hubo emisión de la radícula. Los ensayos experimentales empleados para la desinfección y germinación fueron completamente al azar.

**Tabla 1.** Ensayos de propagación sexual en *D. granadensis*.

| Ensayo N° | Fuente semillera candidata                                     | Diseño experimental              | Tratamientos pregerminativos                                                                                                                                                       | Sustrato                                         | Cantidad de semillas             |
|-----------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | 0 ppm (inmersión en agua), 1.000 ppm GA <sub>3</sub> y 2.000 ppm GA <sub>3</sub> . Inmersión x 24 h para todos los tratamientos.                                                   | AR (100%)                                        | UE (25) y cantidad total (225)   |
| 2         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | 0 ppm (inmersión en agua), 1.000 ppm GA <sub>3</sub> y 2.000 ppm GA <sub>3</sub> . Inmersión x 24 h para todos los tratamientos.                                                   | TU (100%)                                        | UE (25) y cantidad total (225)   |
| 3         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | 0 ppm (inmersión en agua), 1.000 ppm GA <sub>3</sub> y 2.000 ppm GA <sub>3</sub> . Inmersión x 24 h para todos los tratamientos.                                                   | TN (70%) y CA (30%)                              | UE (25) y cantidad total (225)   |
| 4         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | Testigo (T) sin inmersión x 24 h, inmersión agua fría (IAF, 4°C) x 24 h e inmersión en agua caliente (IAC a punto de ebullición y durante 1 minuto).                               | TN (70%) y CA (30%)                              | UE (110) y cantidad total (1320) |
| 5         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | 0 ppm (inmersión en agua), 1.000 ppm GA <sub>3</sub> , 4.000 ppm GA <sub>3</sub> . Inmersión x 36 h para todos los tratamientos.                                                   | TN (70%) y CA (30%)                              | UE (200) y cantidad total (1800) |
| 6         | Bogotá, Distrito Capital (Localidad Santa Fe, Vereda Verjones) | DCA                              | 0 ppm (inmersión en agua), 1.000 ppm GA <sub>3</sub> , 4.000 ppm GA <sub>3</sub> . Inmersión x 36 h para todos los tratamientos.                                                   | TN (70%) y CA (30%)                              | UE (150) y cantidad total (1350) |
| 7         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | No se empleó diseño experimental | Estratificación en frío a 4°C (EFAH), entre arena de río e hidratación) y almacenamiento en frío a 4° C (SEF), sin sustrato e hidratación), a oscuridad por un periodo de 30 días. | Bandeja A (TN 50%-TU 50%) y B (TN 50% y LBC 50%) | UE (50) y cantidad total (500)   |
| 8         | Choachí (Cundinamarca). Vereda Agua Dulce.                     | DCA                              | Almacenamiento de la semilla en bolsas de papel a baja temperatura (4° C), tras 63 días de colecta.                                                                                | TN, TU, AR río (100% c/u, total de 3 bandejas).  | UE (250) y cantidad total (750)  |
| 9         | Chipaque (Cundinamarca). Vereda Caldertías.                    | No se empleó diseño experimental | Inmersión en agua fría (Testigo) y 1.000 ppm de GA <sub>3</sub> . Inmersión x 36 h para todos los tratamientos.                                                                    | TN (50%) y TU (50%)                              | UE (54) y cantidad total (108)   |

GA<sub>3</sub> (giberelina A<sub>3</sub>), DCA (diseño completamente al azar), AR (Arena), TN (Tierra negra), TU (Turba), CA (Casarilla), LBC (Lombricompost), UE (unidad experimental).

**Tabla 2.** Medios de cultivo para la siembra de semillas de *D. granadensis*.

| Componente (g/l)     | M1    | M2    | M3   | M4    | M5   | M6    |
|----------------------|-------|-------|------|-------|------|-------|
| Sales y vitaminas MS | 100 % | 100 % | 50 % | 50 %  | 50 % | 50 %  |
| Myo-inositol         | 0.1   | 0.1   | 50   | 0.05  | 0.05 | 0.05  |
| GA <sub>3</sub>      | -     | 0.002 | -    | 0.002 | -    | 0.002 |
| Pulpa de banano      | -     | -     | -    | -     | 30   | 30    |
| Carbón activado      | -     | -     | -    | -     | 2    | 2     |
| Sacarosa             | 15    | 15    | 15   | 15    | 15   | 15    |
| Agar                 | 5     | 5     | 5    | 5     | 5    | 5     |
| pH                   | 5,8   | 5,8   | 5,8  | 5,8   | 5,8  | 5,8   |

**Tabla 3.** Tratamientos para inducir la germinación *in vitro* en *D. granadensis*.

| Tratamiento | Descripción | Tratamiento | Descripción | Tratamiento | Descripción |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| T1          | R+M1        | T7          | S+ M1       | T13         | E+ M1       |
| T2          | R+ M2       | T8          | S+ M2       | T14         | E+ M2       |
| T3          | R+ M3       | T9          | S+ M3       | T15         | E+ M3       |
| T4          | R+ M4       | T10         | S+M4        | T16         | E+ M4       |
| T5          | R+M5        | T11         | S+ M5       | T17         | E+ M5       |
| T6          | R+ M6       | T12         | S+ M6       | T18         | E+ M6       |

R, S y E están relacionados con el tratamiento pregerminativo aplicado, correspondiente a remoción de la testa (R), siembra directa (S) o estratificación fría a 16 °C durante 1 mes en recipiente oscuro (E), respectivamente. M1, M2, M3, M4, M5 y M6 corresponden a los medios de cultivo empleados para la siembra, descritos en la Tabla 2.

### Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en el periodo de evaluación de la germinación (promedio de 6 meses para propagación sexual y 3 meses para propagación *in vitro*) se abordó inicialmente por medio del análisis exploratorio (excel), a partir del cual se obtuvieron las curvas de germinación y crecimiento por ensayo. Seguidamente, se llevó a cabo el análisis estadístico (univariado) para los ensayos establecidos bajo diseños experimentales, por medio de los programas estadísticos PAST 2.17 (Hammer y Harper, 2006), SAS 9.1 y R, previa verificación del cumplimiento de los parámetros de distribución de la variable y de distribución normal. El análisis de varianza se realizó con un nivel de confianza del 95 %, se contrastaron las hipótesis planteadas para cada procedimiento y se complementó con el test de Tukey.

## 3. RESULTADOS

### Identificación de fuentes de semilla y recolección de material vegetal

Durante el desarrollo del estudio, se identificaron tres fuentes semilleras candidatas (FSC) para la especie *D. granadensis*, presentes en la zona rural de los municipios de Chipaque (vereda Calderitas), Choachí (vereda Agua Dulce) y la localidad de Santa Fe (vereda Verjones), en las cuales se colectó material vegetal para los ensayos de germinación.

### Ensayos de germinación tradicional

El uso de giberelina A<sub>3</sub> tuvo un efecto variable en la germinación de *D. granadensis*. El uso de la fitohormona en concentraciones de 2.000 y 1.000 ppm, es favorable en materiales procedentes de Choachí, sin embargo, se observan diferencias al emplear diferentes sustratos (Figura 1). El análisis de varianza (ANOVA) demostró diferencia significativa para la variable porcentaje de germinación (PG) de *D. granadensis* ( $p \leq 0,05$ ) en el ensayo cinco. La prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), el tratamiento testigo produjo efectos que presentan diferencia estadística con respecto a todos los demás tratamientos evaluados.

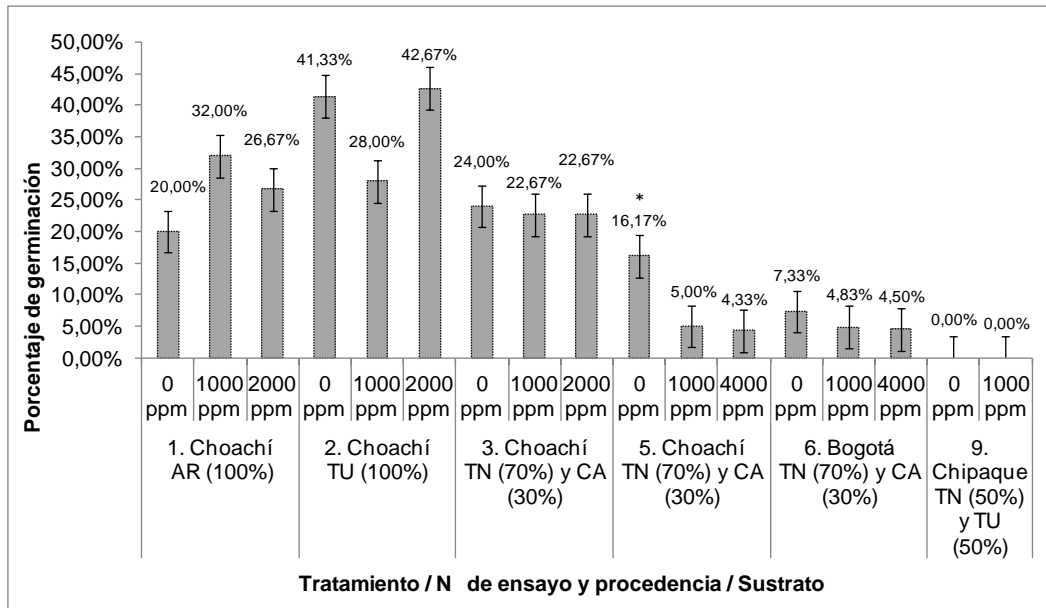


Figura 1. Porcentaje promedio de germinación de *D. granadensis* al emplear fitohormonas.

AR (Arena), TU (Turba); TN (tierra negra), CA (Cascarilla de arroz). \* Tratamiento estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) y Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Los ensayos para evaluación preliminar del efecto de los tratamientos de inmersión en agua, estratificación y sustrato, denotan que la inmersión en agua fría, estratificación en frío-húmedo y el uso de tierra negra como sustrato, en material proveniente de Choachí (Cundinamarca), son favorables para la germinación. Sin embargo, el uso de TN (50 %) y LBC (50 %), arroja los mayores valores (Figura 2).

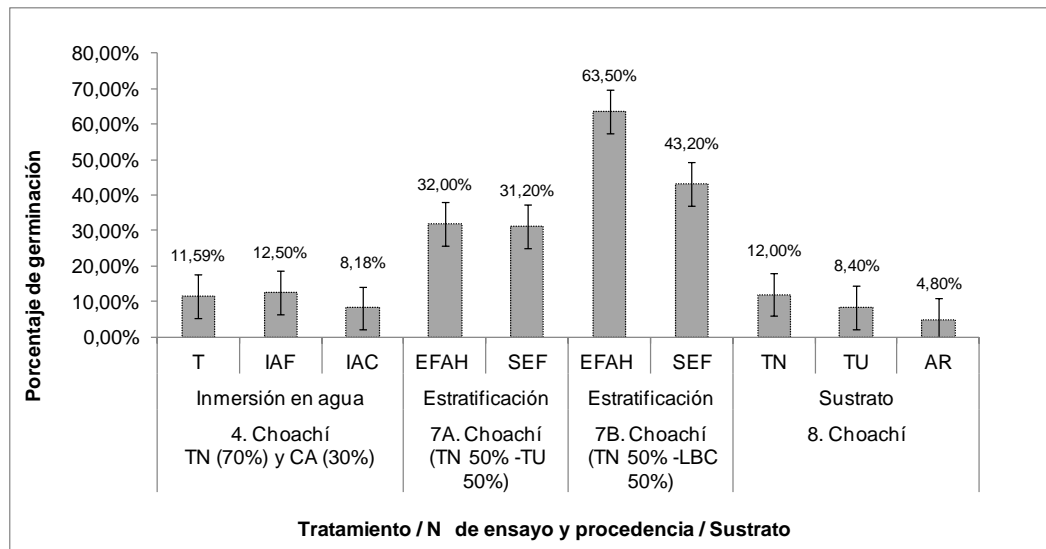


Figura 2. Porcentaje promedio de germinación de *D. granadensis* al emplear otros tratamientos pregerminativos.

T (Testigo), IAF (Inmersión en agua fría), IAC (Inmersión en agua caliente), EFAH (estratificación en frío a 4°C, entre arena de río e hidratación), SEF (almacenamiento en frío a 4°C, sin sustrato e hidratación), TN (tierra negra), TU (Turba), LBC (Lombricompost), AR (Arena).

### Ensayos de germinación *in vitro*

Para los tratamientos de desinfección con TD1 y TD2 (hipoclorito de sodio al 5,25 %, con inmersión de 1 y 3 min) la contaminación fue del 60 %. Ésta se redujo al 20 % empleando los tratamientos de desinfección TD3 y TD4 (hipoclorito de sodio al 5,25 %, con inmersión de 5 y 7 min). Al realizar análisis de varianza para la variable porcentaje de contaminación, se encontró que los tratamientos de desinfección no presentan diferencias significativas ( $P = 0,3909$ ). Sin embargo, teniendo en cuenta los mayores niveles de desinfección y el menor tiempo de inmersión del explante, se destaca el tratamiento TD3 (hipoclorito de sodio al 5,25 %, con inmersión de 5 min) como el más apropiado. En el proceso de establecimiento, 12 semanas después de la siembra *in vitro*, la germinación fue nula en todos los tratamientos, excepto en el T1 (R+M1), en donde se observó, al término del tiempo de evaluación, emergencia de la radícula en un 16,6 % de las semillas sembradas. Al realizar el ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,4660$ ).

## 4. DISCUSIÓN

La evaluación de los ensayos de germinación (vía tradicional) establecidos para la especie *D. granadensis*, dejan ver que en general, el porcentaje de germinación (PG) del material proveniente de Choachí (Cundinamarca) es superior (42,67 %) al emplear el tratamiento pregerminativo de giberelina A<sub>3</sub> (2000 ppm) y sembrar en turba (100 %), bajo un porcentaje de sombra del 30 %. No obstante, bajos las mismas condiciones de sombra y de sustrato, el tratamiento testigo alcanzó valores altos de germinación (41,33 %). En contraste, en sustrato de arena (100 %) y sombra del 30 %, el mayor valor de germinación se obtuvo en el tratamiento de giberelina A<sub>3</sub> (1000 ppm). Lo anterior, revela un posible efecto del sustrato en la germinación de *D. granadensis*, que sugiere ser evaluado posteriormente. Estos resultados difieren con los obtenidos por Castañeda *et al.* (2007) y Cantillo *et al.* (2007) al evaluar material procedente de la Reserva Forestal de San Cristóbal (Cerros Orientales), al observar mayores valores de germinación ante el uso de giberelina A<sub>3</sub> (1000 y 2000 ppm).

En los ensayos de propagación sexual (en invernadero) de *D. granadensis* en los cuales se combinó la evaluación de fitohormonas y sustratos, los valores más altos de germinación se obtuvieron en turba 100 % (PG 42,67 %) y arena 100 % (PG 32 %) empleando giberelina A<sub>3</sub> como tratamiento pregerminativo. En contraste, la inmersión de las semillas en agua (tratamiento testigo) presentó los mayores PG, al emplear como sustrato la composición de tierra negra-cascarilla (70% - 30 %); en estas condiciones, se obtuvo un PG de 24 % y 16,17 % en semillas procedentes de Choachí y de 7,33 % en las semillas procedentes de Bogotá. Al revisar los PG obtenidos en los ensayos en los cuales se contemplaron de manera independiente y como tratamientos: la inmersión de las semillas, la estratificación y el sustrato, los mayores valores de PG para semillas procedentes de Choachí, se observan al sembrar en tierra negra-cascarilla 70- 30 % (12,50 %, inmersión en agua fría), tierra negra-turba 50 % - 50 % (32 %, estratificación frío-húmedo), tierra negra-lombricompost 50 % - 50 % (63,5 %, estratificación frío-húmedo) y tierra negra (12 %). Lo anterior, revela de manera preliminar, diferencias en la germinación de *D. granadensis* de acuerdo al sustrato empleado.

Estos resultados corroboran lo mencionado por Niembro y Fierros (1990), al afirmar que “la germinación de las semillas se encuentra fuertemente influida por las características físico-químicas del sustrato empleado, ya que puede favorecer o entorpecer la germinación”. Aunque en el presente estudio, no se registraron las características físico-químicas de los sustratos utilizados, se observa una posible fuente de variación por parte de esta variable, que sugiere evaluarse posteriormente, afín de identificar el mejor sustrato a emplear para la propagación de *D. granadensis*. La obtención de menores valores de PG en la composición de sustrato de tierra negra-cascarilla (70 % - 30 %) con respecto al uso de otros sustratos, podría deberse a lo



mencionado por Sampaio *et al.* (2008), quienes afirman que “aquellos sustratos asociados con la presencia de cascarilla de arroz y fibra de coco, realizan poco aporte nutricional en cuanto a nitrógeno y fósforo, para un buen desarrollo de plántulas”. El uso de lombricompost, podría ser más favorable para *D. granadensis* debido a su aporte orgánico.

El efecto del sustrato en la germinación y desarrollo, ha sido evaluado en algunas especies forestales (Aparicio-Rentería *et al.*, 1999), frutales (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008; Méndez Natera *et al.*, 2009) y hortalizas (Araméndiz-Tatis *et al.*, 1999), identificando una variación en la incidencia de los mismos, debida a las características de las especies y la composición de sustratos. Esto se ha observado al usar sustratos como arena, aluvión, cascarilla de arroz, fibra de coco, lombriabono y gallinaza para *Solanum melongena* (Araméndiz-Tatis *et al.*, 1999); arena, suelo y bagazo para *Psidium guajaba* (Méndez Natera *et al.*, 2009); turba, vermicompuesto, tierra de hoja, fibra de coco, aserrín y agrolita para *Carica papaya* (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008) y arena de mina, tierra de monte y agrolita para *Pinus patula*, *Pinus montezumae* y *Pinus pseudostrobus* (Aparicio-Rentería *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en el presente estudio dejan ver que algunas combinaciones de factores internos y externos inciden en la germinación de *D. granadensis*, corroborando lo expuesto por Abraham de Noir y Ruiz de Riberi (1995), quienes indican que para “que se produzca la germinación es necesaria la interacción de factores externos (sustrato, temperatura, humedad, aireación e iluminación), y de factores internos o propios de la semilla (viabilidad y latencia)”. Lo anterior, denota la necesidad de desarrollar estudios en los cuales se evalúen diferentes combinaciones de factores, con el objetivo de identificar los mejores métodos de propagación de la especie.

Según Ramos (2002), la dispersión de semillas registrada en esta especie, está relacionada con la densidad de árboles adultos y la tendencia aparente para *D. granadensis*, es la germinación inmediata de las semillas en el sitio. La reproducción sexual constituye el principal método de propagación en la mayor parte de los casos (Toogood, 2000), sin embargo, está condicionada por la disponibilidad de semilla, que es “influenciada por la fenología de las especies y por la producción estacional de las semillas” (Penhalver y Matovani, 1997). Por esta razón, se sugiere integrar estos resultados, con el desarrollo de estudios de seguimiento fenológico y caracterización temporal de lluvia de semillas en los sitios de estudio y en aquellos en los cuales se registra la presencia de la especie, como por ejemplo el páramo El Granizo (Monserate), el pantano de Martos (Guatavita) y el Cerro de Mamapacha (Boyacá)-Ramos (2002), Rodríguez-Santamaría *et al.*, (2006) y Avella-M. *et al.*, (2014); sitios de interés para la conservación. Esto permitirá enriquecer los bancos de germoplasma (colecciones de campo) de la especie, como medida de conservación *ex situ*.

En el estudio se observó que el inicio de la germinación de *D. granadensis* es, en promedio, superior a los 60 días (condiciones de invernadero). Para las semillas procedentes de Choachí, los mayores valores de germinación (41,33 y 42,67 %) se obtuvieron al emplear turba (100 %) como sustrato e inmersión de semillas en agua y en giberelina A<sub>3</sub> (2000 ppm) durante un periodo de 24 horas. Sin embargo, se observa que la inmersión en agua (tratamiento testigo) favorece igualmente la germinación de las semillas al emplear sustratos (tierra negra 70 % y cascarilla 30 %). Los resultados de la evaluación preliminar de tratamientos de estratificación en semillas procedentes de Choachí, se observa que la germinación es superior al emplear la estratificación en frío y húmedo a 4 °C (entre arena de río e hidratación por 30 días) y sembrar en sustrato de tierra negra y lombricompost (50:50).

En general, las semillas almacenadas en seco (4 °C), presentaron menores porcentajes de germinación; resultados que dejan abierta la hipótesis que la especie presente latencia morfofisiológica, ya que otros autores (Figueroa *et al.* 1996, Figueroa y Jaksic 2004) han identificado que *Drimys winteri* J. R. Forst. & G. Forst, exhibe latencia fisiológica y morfológica en sus semillas y el tratamiento para inducir la germinación es la estratificación fría. Para algunas especies con probable latencia fisiológica (Godines y Flores, 2000), el uso los tratamientos de estratificación térmica, incide favorablemente en la germinación.

El estudio desarrollado por Abreu *et al.* (2005) en *Drimys brasiliensis* Miers, en el que se evalúa la combinación de sustratos (papel filtro, arena y vermiculita) y estratificación (30, 60 y 90 días) a diferentes temperaturas (17, 25 y 30 °C) en cámara de germinación (20-30 °C), asociadas a características morfológicas del embrión, denotan que “el tratamiento pregerminativo de estratificación promueve el desenvolvimiento embrionario, superando la dormancia de sus semillas”. El autor afirma que “*D. brasiliensis*, por ser una especie andina, no necesita desarrollar mecanismos fisiológicos de adaptación a climas fríos, por lo tanto, un periodo de estratificación es suficiente para revertir el estado de dormición y que las semillas germinen en invierno”. Esta recomendación podría ser igualmente útil para *D. granadensis*, una especie andina de clima frío.

La respuesta en la germinación ante condiciones de humedad alta de *D. granadensis* así como la alta cantidad de endospermo, revela tentativamente la recalcitrancia de sus semillas. Según Magnitskiy y Plaza (2007) “al contrario de las semillas ortodoxas, las semillas recalcitrantes se diseminan en una condición húmeda y metabólicamente activa (Leprince *et al.*, 1993, Kainer *et al.*, 1999), perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (Kermode y Finch-Savage, 2002)”. Con respecto al tipo de semilla y a las condiciones de almacenamiento, para la familia Winteraceae no dispone aún de información (Royal Botanical Gardens - Kew, 2008).

Entre los tratamientos pregerminativos sugeridos para la *D. granadensis*, se encuentra la inmersión en agua durante 24 horas (Cordero y Boshier 2003, García 2010 y Ramírez-Marcial *et al.*, 2003), la inmersión en GA<sub>3</sub> a 1.000 ppm durante 24 horas (García-Flores, 2010) y se registra un periodo de germinación entre 102 y 138 días (García-Flores, 2010) y entre 180 y 200 días (Ramírez-Marcial *et al.*, 2003); no obstante, en el presente estudio se identificó que a través de ensayos de propagación sexual, es factible que este periodo de tiempo disminuya al emplear los tratamientos pregerminativos mencionados con anterioridad.

La desinfección de explantes se convierte, en ciertas ocasiones, en una limitante para el establecimiento *in vitro* de material vegetal. Las causas se relacionan principalmente con la poca disponibilidad de explantes o con el alto grado de contaminación que presenta el material vegetal cuando éste es recolectado en condiciones naturales. Por lo anterior, el uso de semillas de *D. granadensis* como material de partida, fue una buena alternativa para lograr el establecimiento aséptico de explantes y poder así estudiar los mecanismos de germinación en condiciones *in vitro* (Pérez-Martínez, 2012). Cuando se emplea la semilla como explante de partida, se requiere que igualmente sea sometida a ensayos de desinfección para eliminar microorganismos contaminantes que puedan impedir su germinación. El hipoclorito de sodio es el agente a base de cloro más empleado y recomendado para la desinfección superficial de materiales a introducir al cultivo *in vitro* (Abdelnour y Muñoz 2005, Blanco y Valverde 2004), es útil como germicida y agente oxidante, resulta ser muy eficiente para éste propósito, seguro, de fácil enjuague y muy económico (Suárez 1997, Carmona 2003). Sin embargo, su empleo en un tiempo prolongado y a elevadas concentraciones, puede alterar las condiciones fisiológicas de los explantes dando lugar a necrosis y pérdida de la viabilidad (Flores *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los parámetros mencionados, las semillas *D. granadensis* fueron tratadas empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio al 5,25 % con 4 tiempos de inmersión, que no superaron los 7 min. En el estudio, se identificó al tratamiento TD3 (hipoclorito de sodio al 5,25 % con inmersión de 5 min), como el esquema de desinfección más adecuado, ya que se alcanza el mismo porcentaje de desinfección (80%) con relación al TD4 (hipoclorito de sodio al 5,25 % con inmersión de 7 min), al emplear un menor tiempo de inmersión del explante. Para *D. granadensis*, la fase de establecimiento *in vitro* reveló que el uso del tratamiento T1: R+M1 (remoción de la testa y siembra en medio MS al 100 % en sales y vitaminas, sin suplementos orgánicos u hormonales) favoreció la germinación del 16,6 %, tres meses después de la siembra. Lo anterior indica que probablemente los mecanismos de latencia de las semillas de *D. granadensis* están influenciados por la presencia de la testa, la cual puede tener un efecto químico, por ejemplo, por la presencia de inhibidores fenólicos (Selle *et al.*, 1983) o mecánico, impidiendo el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación (Kelly *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos al emplear oscuridad en la sala de incubación como factor de evaluación, corroboran lo expresado por Finegan (1993) y Cantillo *et*

al. (2007), con respecto al gremio ecológico “heliófito durable” al que pertenece, ya que requiere de sombra en sus primeras etapas de desarrollo.

Los resultados de germinación *in vitro* para *D. granadensis* revelan que el proceso germinativo es sensible a la presencia de suplementos hormonales (GA<sub>3</sub>) u orgánicos (pulpa de banano) e influenciado positivamente al emplear el medio de cultivo MS al 100 % en sales y vitaminas (M1). Estos resultados contrastan los registrados para otras especies, en donde se ha hecho necesaria la adición al medio de cultivo citoquininas, giberelinas o fluridone, para romper la latencia de las semillas (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y en donde el efecto inhibitor del medio MS, se evidencia incluso cuando se emplea en bajas concentraciones, por lo que se les atribuye a los nutrientes del medio MS, la disminución del vigor y retardo de la germinación (Rodríguez *et al.*, 2014). El estrés osmótico provocado por un medio rico en sales como el MS, podría incidir en que el metabolismo de los tejidos vegetales estimule la liberación de compuestos que son fáciles de oxidar convirtiéndose en fitotóxicos (Turkan y Demiral, 2009).

Paralelamente, es importante disponer de diferentes fuentes semilleras para *D. granadensis* y comparar los resultados del cultivo de tejidos por procedencia, ya que en algunas especies forestales (p.e. *Quillaja saponaria* Mol.), se ha identificado que la germinación *in vitro*, el crecimiento de las plántulas y el enraizamiento, se encuentran estrechamente relacionados con el origen materno de las semillas (Prehn *et al.*, 2003).

## 5. CONCLUSIONES

Para las semillas de *Drimys granadensis* procedentes de Choachí (Cundinamarca), la germinación en condiciones de invernadero es superior al 40 %, al emplear como tratamiento pregerminativo la inmersión de las semillas en giberelina A<sub>3</sub> (2000 ppm, durante 24 horas) y posterior siembra en turba (100 %) y contenedores plásticos, bajo un porcentaje de sombra del 30 %. *D. granadensis* exhibe el inicio de la germinación (vía tradicional) en un periodo promedio de 75 días, presentando un porcentaje de germinación máximo de 63,50 %.

En contraste, en la germinación *in vitro*, el mayor nivel de desinfección de semillas se alcanza al emplear principalmente hipoclorito de sodio al 5,25 %, con inmersión del explante durante 5 min. La germinación de *D. granadensis* en estas condiciones se ve influenciada por la remoción de la testa y la siembra en un medio de cultivo sin fitoreguladores ni suplementos orgánicos. Sin embargo, se debe profundizar en los mecanismos que controlan la latencia y determinar la influencia en los procesos de germinación de otros factores, como la fuente semillera.

Se recomienda extraer manualmente las semillas y almacenarlas secas a 4°C o en refrigerador, para evitar su deterioro. De igual manera, recolectar la semilla cuando el fruto aún está en el árbol y está de color verde-amarillento, para evitar problemas fitosanitarios. En caso de no disponer de fitohormonas, se recomienda sembrar en las mismas condiciones de sombra y emplear como tratamiento pregerminativo la inmersión en agua por 24 horas y la composición de sustrato tierra negra y cascarilla (70 % - 30%) y/o tierra negra-lombricompost (50 % - 50 %). No obstante, se tiene conocimiento que para especies del mismo género y para la especie de estudio, se observa un efecto de la estratificación en frío-húmedo (almacenado a 4 °C, en arena de río e hidratación) en la germinación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis y al equipo del Sistema Integrado de Propagación de la Subdirección Científica (Programa Manejo de especies vegetales en la región capital), por su apoyo en el desarrollo de las labores. A Colciencias por la contribución en la generación de conocimiento a través de la financiación del proyecto “Biodiversidad andina al plato de todos”.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A. y A. Muñoz. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: *Revista Forestal* (Costa Rica), 2(5): 1-11.
- Abraham De Noir, F. y Ruiz De Riberi, M. 1995. Laboratorio de semillas forestales. *En: Bosques y Desarrollo*. No. 14. Organización Internacional de Maderas Tropicales. pp. 24-28.
- Abreu, D. C.; A. C. Nogueira y A. C. S. Medeiros. 2005. Efeito do substrato e da temperatura na germinação de sementes de cataia (*Drimys brasiliensis* Miers. Winteraceae). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 27 (1): 149-157. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222005000100019>
- Ali-Rachedi, S.; D. Bouinot; M.H. Wagner; M. Bonnet; B. Sotta; P. Grappin y M. Jullien. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219(3): 479-488. DOI: 10.1007/s00425-004-1251-4
- Andrade-Rodríguez, M.; J. J. Ayala-Hernández; I. Alia-Tejagal; H. Rodríguez-Mendoza; C. M. Acosta-Durán y C. V. López-Martínez. 2008. Efecto de promotores en la germinación y sustratos en el desarrollo de plántulas de papayo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 25:607-635.
- Aparicio-Rentería, A.; H. Cruz-Jiménez y J. Alba-Landa. 1999. Efecto de seis sustratos sobre la germinación de *Pinus patula* Sch et Cham., *Pinus montezumae* Lam. y *Pinus pseudostrobus* Lindl. en condiciones de vivero. *Foresta Veracruzana*. 1(2):31-36.
- Araméndiz-Tatis, H.; C. Cardona-Ayala y E. Correa-Álvarez. 2013. Efecto de diferentes sustratos en la calidad de plántulas de berenjena (*Solanum melongena* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 7(1):55-61. DOI: <https://doi.org/10.17584/rcch.2013v7i1.2035>
- Avella-M., A.; S. Torres-R.; W. Gómez-A. y M. Pardo-P. 2014. Los páramos y bosques altoandinos del pantano de Monquentiva o pantano de Martos (Guatavita, Cundinamarca, Colombia): caracterización ecológica y estado de conservación. *Biota Colombiana*. 15(1): 2-39.
- Bartholomäus, A.; A. De La Rosa; J. Santos G.; D. L. Acero y W. Moosburgger. 1998. *El Manto de la Tierra. Guía de 150 especies de la flora andina*. GTZ, CAR, KfW. Santafé de Bogotá D. C.
- Bernal, R.; S. R. Gradstein y M. Celis (eds.). 2015. *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. [en línea] Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Disponible en: <<http://catalogoplantascolumbia.unal.edu.co>> [fecha de consulta: 18 de julio de 2016].
- Blanco, M. y R. Valverde. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. *Agronomía Costarricense*. 28 (1): 39-46.
- Cantillo, M.; S. Castañeda; A. Garzón; M. Torres. 2007. *Propagación sexual y asexual de ocho especies nativas del bosque altoandino con fines de restauración ecológica*. Informe Final. Convenio interadministrativo 369-04. Universidad Distrital Francisco José de Caldas y Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá. p.213.
- CAR - Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. 2012. *Vegetación del Territorio CAR, 450 especies de sus llanuras y montañas*. Segunda edición. Bogotá. p.869.
- Carmona, M. 2003. *Daños y pérdidas causadas por enfermedades. Importancia del manejo integrado. Ubicación estratégica de fungicidas foliares*. Actas jornadas técnicas de manejo integrado de enfermedades en cultivos extensivos. p.10-15.
- Castañeda-Garzón, S. L. 2014. Perfil de investigación, Contrato 687 de 2013. *Evaluación de fuentes semilleras y propagación tradicional de dos especies vegetales de bosque altoandino y páramo, con fines de conservación ex situ*. Jardín Botánico de Bogotá. Subdirección Científica. Bogotá. p.104.
- Castañeda, S. L.; A. E. Garzón; M. A. Cantillo; M. P. Torres y J. Silva. 2007. Análisis de la respuesta de ocho especies nativas del bosque alto andino ante dos métodos de propagación. *Revista Colombia Forestal* 10(20): 79-90.
- Ciccio, J. F. 1997. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). *Revista de biología tropical*, 44(3)/45(1): 29-33.

- Cordero, M. A. J. y D. H. Boshier. 2003. *Árboles de Centroamérica: un Manual para Extensionistas*. Oxford University Institute –OFI / Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza -CATIE. Turrialba, CR. p.1079.
- DAMA - Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente. 2000. *Protocolo Distrital de restauración ecológica. Guía para La restauración de ecosistemas nativos en áreas rurales de Santafé de Bogotá*. Bogotá. p.285.
- DAMA - Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente. 2004. *Guía para la restauración ecológica en áreas con plantaciones forestales exóticas en el Distrito Capital*. Bogotá. p.95.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2002. *Estado de la información actual de Colombia*. Santiago de Chile. p.229.
- Figuerola, J.; J. Armesto y J. F. Hernández. 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 69: 260-299.
- Figuerola, J. y F. Jaksic. 2004. Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77: 201-215. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100016>
- Finegan, B. 1993. *Los gremios de especies forestales. Documento del curso de bases ecológicas para la producción sostenible*. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p.24.
- Flores, A.; J. F. Álvarez; J. L. Rodríguez y A. Corona. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2): 27-33.
- García-Flórez, L. 2010. *Protocolos de propagación 37 especies forestales nativas del Valle de Aburrá*. Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe. Medellín. p.172.
- Godines, H. y A. Flores. 2000. Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica*. 11: 1-29.
- Hammer, Ø y D. Harper. 2006. *Paleontological Data Analysis*. Blackwell Publishing, Oxford. p.351.
- Kainer, K.; M. Duryea; M. Malavasi; E. Rodrigues da Silva; J. Harrison. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecology and Management*, 116: 207-217. DOI: [10.1016/S0378-1127\(98\)00461-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1127(98)00461-7).
- Kelly, K. M.; J. Van Staden y W. E. Bell. 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation*, 11: 201-209.
- Kermode, A. R. y W. E. Finch-Savage. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing. p149-184.
- León-Moya, O. A. 2011. Informe Final, Contrato 570-2010. *Objeto del contrato: Distribución geográfica, identificación, caracterización y estado del hábitat de fuentes semilleras de *Cestrum buxifolium*, *Pentacalia ledifolia* y *Clethra fimbriata*, en Bogotá D.C y la región*. Jardín Botánico de Bogotá. Subdirección Científica. Bogotá. p.113p.
- Leprince, O.; G. A. Hendry y B. D. McKersie. 1993. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, 3: 231-246. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0960258500001859>
- Magnitskiy, S. y G. Plaza. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25(1): 96-103.
- Marquinez-Casas, X.; R. Sarmiento y K. Lara. 2009. Fenología floral y visitantes florales en *Drimys granadensis* L.f. (Winteraceae). *Acta Biológica Colombiana*, 14(3): 47-60.
- Méndez Natera, J. R.; Moreno, M. C. y Moya J. F. 2009. Efecto de diferentes combinaciones de sustratos (arena, suelo y/o bagazo de caña de azúcar) sobre la germinación de semillas y altura de plantas de guayaba (*Psidium guajaba* L.). *Revista UDO Agrícola*. 9(1):121-125.
- Ministerio de la Protección Social. 2004. *Decreto número 2266 de 2004*, por medio del cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos, Bogotá. [en línea] [fecha de consulta: 10 de julio de 2016],

- p66. Disponible en: <<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/1/Vademecum%20Colombiano%20de%20Plantas%20Medicinales.PDF>>
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Niembro, R. A. y Fierros, G. A. M. 1990. Factores ambientales que controlan la germinación de las semillas de pinos. En: *Memoria. Mejoramiento Genético y Plantaciones Forestales*. Centro de Genética Forestal, A. C. Chapingo, México. pp.124-144.
- Penhalver, E. F. y W. Matovani. 1997. Floração e chuva de sementes em mata secundária em São Paulo, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, 20(2): 205-220. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84041997000200011>.
- Pérez-Martínez, B. A. 2012. Perfil de investigación, Contrato 840 de 2012. *Protocolos de propagación por técnicas biotecnológicas de tres (3) especies priorizadas con fines de propagación masiva para la conservación, la reintroducción y la restauración*. Jardín Botánico de Bogotá. Subdirección Científica. Bogotá, 189p.
- Prehn, D.; C. Serrano; C. G. Berrios y P. Arcejohnson. 2003. Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque*, 24 (2): 3-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002003000200001>
- Ramírez-Marcial, N.; A. Camacho-Cruz y M. González-Espínosa. 2003. *Guía para la propagación de especies leñosas nativas de los Altos y montañas del Norte de Chiapas*. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas. Chiapas, México. p.39.
- Ramos, C. 2002. *Estrategias regenerativas de Clusia multiflora, Drimys granadensis y Weinmannia tomentosa en el bosque altoandino*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Rodríguez, M.; M. Chacón y R. Carrillo. 2014. Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación in vitro de *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1): 119-122. DOI: 10.4067/S0717-92002014000100012
- Rodríguez-Santamaría, M. F.; J. M. Puentes-Aguilar y F. Cortés-Pérez. 2006. Caracterización temporal de la lluvia de semillas en un bosque nublado del cerro de Mamapacha (Boyacá-Colombia). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Naturales*, 30 (117): 619-624.
- Royal Botanical Gardens - Kew. 2008. *Seed Information Database*. SID 7.1. Millennium Seed Bank Project. [En línea] Disponible en: <<http://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=Winteraceae&APG=off&Genus=&Species=&StorBehav=0>> [fecha de consulta: 27 de septiembre de 2017].
- Sampaio, R. A.; S. J. Ramos; D. O. Guilherme; C. A. Costa y L. A. Fernandes. 2008. Produção de mudas de tomateiro em substratos contendo fibra de coco e pó de rocha. *Hortic. Bras.* 26 (4), 499-503. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362008000400015>
- Selle, C. M.; E. González de Mejía; L. G. Elías y B. A. Bressani. 1983. Evaluación de algunas características químico-nutricionales de la semilla del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*). *Archivos Latinoam. Nutric*, 33(4): 884-901.
- Suárez, A. E. 1997. Métodos de asepsia y esterilización. En: M. Perea y J. Cedeño (Eds.). *Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Aplicaciones en la Agricultura*. Curso: UDO-OIEA, Maturín, Venezuela. p.33-40.
- Toogood, A. 2000. *Enciclopedia de la propagación de plantas*. Royal Horticulture Society. Ed. Blume, L. Barcelona. p.320.
- Turkan, I. y T. Demiral. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 2-9. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2009.05.008
- Vargas, O. 2011. Restauración ecológica: biodiversidad y conservación. *Acta biológica Colombiana*, 16 (2): 221-246.

