

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Efectos de luz, temperatura, salinidad y GA₃ en la germinación de semillas de
Pumamaqui (*Oreopanax* spp)

María Gabriela Nicholls Andrade

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de BS en
Biotecnología

Quito

27 de junio de 2008

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Graduados

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Efectos de luz, temperatura, salinidad y GA₃ en la germinación de semillas de
Pumamaqui (*Oreopanax* sp)

María Gabriela Nicholls Andrade

María de Lourdes Torres, PhD
Director de Tesis

.....

Hugo Valdebenito, PhD
Miembro del Comité de Tesis

.....

Venancio Arahana, PhD
Miembro del Comité de Tesis

.....

Stella de la Torre, PhD
Decana del Colegio de Ciencias Ambientales

.....

Quito, 27 de junio de 2008

Derechos de autor
María Gabriela Nicholls Andrade
2008

A mi familia, por su inagotable paciencia

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi familia, por haber estado ahí siempre incondicionales, apoyándome, en las buenas y en las malas. Sin ustedes estaría perdida aún, gracias.

A mis amigos, en especial a Gonzalo, Juan Pablo y Alicia. Ustedes saben.

A María de Lourdes Torres, Venancio Arahana, Hugo Valdebenito y Andrea Arias, por su sapiencia y apoyo.

A todos ustedes les debo este trabajo. Muchas gracias.

Resumen

El Pumamaqui (*Oreopanax sp*) crece en el bosque alto andino (ecosistema amenazado por el hombre) y posee un bajo porcentaje de germinación *in vivo*. Además de la necesidad de proteger a esta especie, el Pumamaqui es importante para la reforestación de laderas. En este estudio se intentaron evaluar distintos parámetros que afectan la germinación de semillas de Pumamaqui mediante técnicas *in vitro*. Las semillas se sembraron bajo asepsia total en el medio de *Murishage y Skoog* (MS) con Agar, en diferentes condiciones: dos concentraciones de sales (concentración del medio MS, y la mitad de su concentración), dos temperaturas (4°C, 23°C), dos tratamientos de luz (ausencia y presencia) y dos concentraciones de giberelinas (1.5µM, 3.0µM). Los resultados se evaluaron cada 10 días (cuando la radícula empezaba a aparecer) y se presentaron en términos porcentuales. Se obtuvo un mayor porcentaje de germinación a menor concentración de salinidad (35% 0.5X MS vs 25% MS), a menor temperatura (38%, 4°C vs 27.5%, 23°C), en ausencia de luz (71%; 38% presencia de luz), y a menor concentración de giberelinas (66%, 1.5 µM vs 58.5%, 3.0µM). Estos resultados demuestran que las semillas de Pumamaqui germinan mejor en condiciones relativas al hábitat donde se desarrollan (*i.e.* bajas temperaturas), y también en bajas salinidades. La germinación fue mayor en oscuridad. Sería recomendable recolectar las semillas directamente de los árboles para asegurar su viabilidad y así obtener un porcentaje de germinación óptimo para establecer un proyecto de reforestación.

Abstract

Pumamaqui (*Oreopanax sp*) is a tree species that inhabits the montane forest of the Andes (a threatened ecosystem) and also possesses a low *in vivo* percentage of germination. In addition to the necessity to protect this threatened species, Pumamaqui is also important to reforest sloped areas. This study tried to assess different parameters that affect Pumamaqui's seed germination under *in vitro* conditions. Seeds were inoculated under sterile conditions in the *Murishage & Skoog* (MS) culture media, under different environmental conditions: two salt concentrations (MS and half its concentration), two temperatures (4°C, 23°C), two light treatments (absence and presence) and two gibberellin concentrations (1.5µM, 3.0µM). Results were taken every 10 days (when the radicle started to emerge) and were presented in percentages. A higher germination percentage was observed under lesser salinity (35% 0.5X MS vs. 25% MS), lower temperature (38%, 4°C vs. 27.5%, 23°C), light absence (71% vs. 38% light presence), and a lower gibberellin concentration (66%, 1.5 µM vs. 58.5%, 3.0µM). These results show that germination occurs best under Pumamaqui's natural habitat conditions (*i.e.* low temperatures), and also under low salt concentrations. Germination was higher in absence of light. It is recommended to collect seeds directly from the mother tree to assure their viability and thus, obtain an optimal percentage of germination to establish a reforestation program.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	GERMINACIÓN.....	1
1.1.1.	<i>Fases de la germinación</i>	2
1.1.2.	<i>Factores que afectan a la germinación</i>	4
1.2.	PÁRAMOS	10
1.3.	ECOLOGÍA DE LOS BOSQUES ANDINOS	11
1.4.	IMPACTO HUMANO Y REGENERACIÓN DE LA VEGETACIÓN ANDINA	12
1.5.	ESPECIE DE ESTUDIO	13
1.6.	JUSTIFICACIÓN	16
2.	OBJETIVO GENERAL.....	17
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4.	MATERIALES	17
5.	MÉTODOS	18
5.1.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA SEMILLA	18
5.2.	ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS	18
5.3.	PREPARACIÓN DE MEDIOS Y SIEMBRA DE SEMILLAS	19
5.4.	EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LUZ, TEMPERATURA Y SALINIDAD.....	20
5.5.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS GIBERELINAS (GA ₃)	20
5.6.	SUBCULTIVO Y EVALUACIÓN DEL ENRAIZAMIENTO	21
5.7.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AUXINAS (IAA Y NAA) EN EL ENRAIZAMIENTO	21
5.8.	ANÁLISIS DE DATOS	22
6.	RESULTADOS.....	23
6.1.	OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS.....	23
6.2.	ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS DE OREOPANAX SP	23
6.3.	TIEMPO DE GERMINACIÓN DE OREOPANAX SP.....	23
6.4.	SALINIDAD	24
6.5.	LUMINOSIDAD.....	24
6.6.	TEMPERATURA.....	25
6.7.	GIBERELINAS	25
6.8.	SUBCULTIVO	26
6.9.	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA	26
7.	DISCUSIÓN	26
7.1.	OBTENCIÓN Y ALMACENAJE DE SEMILLAS	26
7.2.	SALINIDAD	29
7.3.	LUMINOSIDAD.....	30
7.4.	TEMPERATURA.....	31
7.5.	GIBERELINAS	32
7.6.	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA	32
8.	CONCLUSIONES	33
9.	RECOMENDACIONES.....	34
10.	BIBLIOGRAFÍA	36
11.	TABLAS	39
12.	FIGURAS	41

LISTA DE FIGURAS

TABLA 1. CUADRO COMPARATIVO DE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN TOTAL POR CADA TRATAMIENTO REALIZADO EN SEMILLAS DE <i>SCHINUS MOLLE</i>	39
TABLA 2. TABLA COMPARATIVA DE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN POR CADA TRATAMIENTO REALIZADO EN SEMILLAS DE <i>OREOPANAX SP</i>	39
TABLA 3. PORCENTAJES DE CONTAMINACIÓN POR CADA TRATAMIENTO EN <i>OREOPANAX SP</i>	40
TABLA 4. PORCENTAJES DE CONTAMINACIÓN POR CADA TRATAMIENTO EN <i>SCHINUS MOLLE</i>	40
FIGURA 1. GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN TOTAL Y RELATIVO PARA TODOS LOS TRATAMIENTOS DE <i>SCHINUS MOLLE</i>	41
FIGURA 2. GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN TOTAL Y RELATIVO PARA TODOS LOS TRATAMIENTOS DE <i>OREOPANAX SP</i>	41
FIGURA 3. GRÁFICO COMPARATIVO DE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN ENTRE <i>OREOPANAX SP</i> Y <i>SCHINUS MOLLE</i> Y ENTRE MEDIOS AM Y MS EN AUSENCIA DE LUZ.....	42
FIGURA 4. GRÁFICO COMPARATIVO DE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN ENTRE <i>OREOPANAX SP</i> Y <i>SCHINUS MOLLE</i> Y ENTRE MEDIOS AM Y MS EN PRESENCIA DE LUZ.....	42
FIGURA 5. GRÁFICO COMPARATIVO DE PORCENTAJES DE GERMINACIÓN ENTRE <i>OREOPANAX SP</i> Y <i>SCHINUS MOLLE</i> Y ENTRE MEDIOS AM Y MS A 4°C.....	43
FIGURA 6. GRÁFICO COMPARATIVO DE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN ENTRE <i>OREOPANAX SP</i> Y <i>SCHINUS MOLLE</i> Y ENTRE MEDIOS AM Y MS A 23° C.....	43
FIGURA 7. GRÁFICO COMPARATIVO DE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE <i>OREOPANAX SP</i> ENTRE LOS MEDIOS AM MÁS 1.5µM. GA ₃ Y AM MÁS 3.0µM. GA PARA TODOS LOS TRATAMIENTOS.....	44

1. Introducción

1.1. Germinación

La germinación empieza por el consumo de agua por parte de la semilla seca –imbibición– y se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar la estructura que la rodea (Bewley, 1997). Para que la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla tenga lugar, es necesario que se de una serie de condiciones ambientales favorables, como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

La absorción de agua por la semilla, desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que, generalmente, se produce por la emergencia de la radícula.

La absorción de agua por una semilla madura seca está compuesta por tres fases. Un insumo rápido de agua inicial (fase I), seguido de una fase plató (fase II). Un consumo adicional de agua ocurre solamente cuando la germinación ha finalizado, es decir, cuando el eje embriónico se haya alargado (fase III). Aquellas semillas que estén en fase de dormancia no completan la germinación porque no pueden entrar en la fase III (Bewley, 1997).

La absorción de agua en las células de semillas secas durante la fase I resulta en perturbaciones estructurales temporales (particularmente en las membranas), las cuales llevan a una inmediata y rápida filtración de solutos y metabolitos de bajo peso

molecular dentro de la solución imbibitoria que la rodea (Bewley, 1997). Esto es sintomático de la transición de los componentes de la fase de gel, que ocurre durante la maduración de la fase seca a la fase líquida-cristalina normal hidratada. Durante un período corto de rehidratación, las membranas regresan a su configuración más estable cuando la filtración de solutos ha sido restringida (Bewley, 1997).

1.1.1. Fases de la germinación

En el proceso de germinación se pueden distinguir tres fases (Bewley, 1997):

Fase de hidratación

La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

Fase de germinación

Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

Fase de crecimiento

Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria. Ocurren dos fases discretas de síntesis de ADN en las células de la radícula después de la imbibición (Bewley 1997).

La emergencia de la radícula es un proceso llevado a cabo por la presión de turgencia, que requiere el traspaso de las paredes en las células del eje de la raíz embrionaria, la cual se encuentra entre el ápice de la raíz y la base del hipocótilo (Bewley, 1997). Existen dos posibles motivos para el comienzo del crecimiento de la radícula. Una posibilidad es que, durante la fase tardía de la germinación, el potencial osmótico de las células de la radícula se hace más negativo debido a la acumulación de solutos, quizá como resultado de la hidrólisis de las reservas poliméricas presentes dentro de las células de la radícula. La disminución en el potencial osmótico llevaría a una extensión celular (Bewley, 1997). Una segunda posibilidad es que la extensibilidad de las paredes celulares de la radícula permita su elongación (Bewley, 1997).

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto importante es la relación que existe entre estas fases de germinación y el metabolismo de la semilla (Germinación de semillas, 2005). La primera fase se produce tanto en semillas vivas como muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto, los factores externos que activan el metabolismo (por ejemplo, la temperatura) tienen un efecto estimulante en la última fase (Villé, *et al.*, 1998).

En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles; a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula o, por el contrario, morir (Germinación de semillas, 2005).

1.1.2. Factores que afectan a la germinación

Los factores que afectan a la germinación se pueden dividir en dos tipos:

Factores internos (intrínsecos)

Propios de la semilla: madurez, viabilidad y dormancia.

Factores externos (extrínsecos)

Dependen del ambiente: agua, temperatura y gases.

1.1.2.1. Factores internos

1.1.2.1.1. Madurez de las semillas

Una semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto morfológica como fisiológicamente. La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo, y finaliza cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo (Germinación de semillas, 2005). También se la relaciona con la deshidratación de los diferentes tejidos que forman la semilla. La madurez se suele alcanzar sobre la misma planta; sin embargo, existen algunas especies que diseminan sus semillas antes de que aquella se alcance, como ocurre en las semillas de *Ginkgo biloba* o de muchas orquídeas, que presentan

embriones muy rudimentarios, apenas diferenciados (Germinación de semillas, 2005). Aunque las semillas sean morfológicamente maduras, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar, porque necesitan experimentar aún una serie de transformaciones fisiológicas (Germinación de semillas, 2005). Lo normal es que requieran la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras. En general, necesitan reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas (Germinación de semillas, 2005).

1.1.2.1.2. Viabilidad de las semillas.

Se conoce como el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento.

Dependiendo del tiempo que las semillas permanezcan viables, puede haber semillas que germinen todavía, incluso después de decenas o centenas de años. Esto se da en semillas con una cubierta seminal dura, como en el caso de las leguminosas (Germinación de semillas, 2005). En el extremo opuesto tenemos las que no sobreviven más que algunos días o meses. En general, la vida media de una semilla es de entre 5 y 25 años (Germinación de semillas, 2005).

Las semillas pueden perder su viabilidad por diferentes motivos. Se podría pensar que mueren porque se agotan sus reservas nutritivas, pero en realidad conservan la mayor parte de las mismas cuando ya han perdido su capacidad germinativa (Germinación de semillas, 2005).

Una semilla será más longeva cuanto menos activo sea su metabolismo. Esto, a su vez, origina una serie de productos tóxicos que al acumularse en las semillas producen, a la larga, efectos letales para el embrión. Para evitar la acumulación de esas sustancias, bastará disminuir aún más su metabolismo, con lo cual se habrá incrementado la longevidad de la semilla. Frenar el metabolismo puede conseguirse bajando la temperatura y/o deshidratando a la semilla. Las bajas temperaturas dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que las conservadas a temperatura ambiente. La deshidratación también alarga la vida de las semillas, más que si se conservan con su humedad normal. Pero la desecación tiene límites: por debajo del 2%-5% en humedad se ve afectada el agua constituyente de la semilla, siendo perjudicial para la misma (Germinación de semillas, 2005).

1.1.2.1.3. Dormancia

La dormancia se define como el fracaso de las semillas viables para completar la germinación bajo condiciones favorables. Existen dos tipos de dormancia: la primera, en la que los embriones mismos están “dormidos”, y la segunda, en la que el embrión está limitado por las estructuras que lo rodean. La dormancia está controlada por algunos factores ambientales como la luz y la temperatura y la duración del almacenamiento de la semilla (Koorneef *et.al.*, 2002), y también por factores internos como la cantidad de las hormonas ABA (Ácido absísico) –mantiene dormancia– y GA (Giberelinas) –rompe dormancia–, aunque no se conoce cómo el mecanismo de estas hormonas actúa en la dormancia.

La acumulación de ABA en las semillas en desarrollo es baja, es mayor durante las etapas medias de desarrollo, cuando las reservas almacenadas están siendo

sintetizadas, y declina a medida que la semilla pasa por la sequía durante la maduración (Bewley, 1997). La prevención de la germinación se puede deber al contenido endógeno de ABA de la semilla, el ambiente osmótico de la semilla o ambos (Bewley, 1997). La sequía de maduración y la pérdida de viabilidad de la planta madre son suficientes para liberar estas restricciones en semillas no dormantes. Bajo estas instancias, puede existir un declive asociado al contenido de ABA de la semilla, y la sensibilidad del embrión al ABA se reduce (Bewley, 1997).

Las giberelinas, al parecer, no están involucradas en el control de la dormancia *per se*, pero en cambio son importantes en la promoción y mantenimiento de la germinación, esto es, ellas actúan después de que la inhibición mediada por el ABA ha sido sobrellevada en la germinación (Bewley, 1997). En algunos casos, el rol de las giberelinas está restringido a la inducción de las enzimas que debilitan al endospermo (Bewley, 1997).

Algunas semillas pierden su estado de latencia mientras se encuentran en la etapa seca, cuando su estado metabólico es muy bajo. Sin embargo, las semillas en estado de dormancia son metabólicamente muy activas y, durante este, pueden recibir señales externas (p. ej luz, enfriamiento, alternación de temperaturas y tratamientos químicos u hormonales) que pueden estimular la germinación. Los eventos principales en el rompimiento de la dormancia son la recepción del estímulo por el embrión y la inmediata transducción de cadena de señales que lleva a los eventos secundarios los que pueden involucrar cambios metabólicos y hormonales (Bewley, 1997).

1.1.2.2. Factores externos

1.1.2.2.1. Humedad

La absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación, porque para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos.

La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal, siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico. Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión (Germinación de semillas, 2005).

1.1.2.2.2. Temperatura

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación (Villé *et al.*, 1998). La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio (Germinación de semillas, 2005). Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables. La temperatura mínima sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso.

La temperatura óptima, intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible (Germinación de semillas, 2005).

Las temperaturas compatibles con la germinación varían mucho de una especie a otra. Sus límites suelen ser muy estrechos en semillas de especies adaptadas a hábitats muy concretos, y más dilatados en semillas de especies de amplia distribución (Germinación de semillas, 2005). Las semillas de especies tropicales suelen germinar mejor a temperaturas elevadas, superiores a 25° C. Las máximas temperaturas están entre 40° C y 50° C. Sin embargo, las semillas de las especies de las zonas frías germinan mejor a temperaturas bajas, entre 5° C y 15° C (Kozłowski y Pallardy, 2002). Por otra parte, se sabe que la alternancia de las temperaturas entre el día/noche actúan positivamente sobre las etapas de la germinación. Por lo que el óptimo térmico de la fase de germinación y el de la fase de crecimiento no tienen por qué coincidir. Así, unas temperaturas estimularían la fase de germinación y otras la fase de crecimiento (Germinación de semillas, 2005).

1.1.2.2.3. Gases

La mayor parte de las semillas requiere, para su germinación, un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas. La mayoría de las semillas germinan bien en atmósfera normal con 21% de O₂ y un 0.03% de CO₂. Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de O₂ por debajo del 20%. El efecto del CO₂ es el contrario del O₂, es decir, las semillas no pueden germinar si aumenta la concentración de CO₂. Para que la germinación tenga éxito, el O₂ disuelto

en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión. A veces, algunos elementos presentes en la cubierta seminal como compuestos fenólicos, capas de mucílago, macroesclereidas, etc., pueden obstaculizar la germinación de la semilla porque reducen la difusión del O₂ desde el exterior hacia el embrión. Además, hay que tener en cuenta que la cantidad de O₂ que llega al embrión disminuye a medida que aumenta la disponibilidad de agua en la semilla. La temperatura modifica la solubilidad del O₂ en el agua que absorbe la semilla, siendo menor la solubilidad a medida que aumenta la temperatura (Germinación de semillas, 2005).

1.2. Páramos

Según Josse *et al.* (2001), el páramo es un ecosistema neotropical ubicado entre el límite del bosque cerrado y las nieves perpetuas; se localiza a lo largo de las cordilleras o en picos aislados, a altitudes comprendidas entre los 2.900 y 5.000 msnm. Se extiende entre los 11° N y 8° S de latitud, desde Costa Rica hasta Perú; su distribución es continua sobre las cumbres de los Andes, desde Venezuela hasta el norte de Perú. Los páramos ocupan alrededor de 12.580 km² en las tierras altas de los Andes.

El clima de los páramos ecuatorianos es en general frío y húmedo, con cambios diarios extremos de temperatura; por ejemplo, a 3.900 msnm varía desde 30°C hasta temperaturas bajo 0°C. Las noches heladas aumentan con la altitud, así como la frecuencia y distribución de las plantas a lo largo de las gradientes de elevación. Los patrones de precipitación en los Andes varían en cantidad y distribución, de acuerdo con la elevación, la orientación de los flancos de las cordilleras y la posición geográfica en relación a las influencias oceánicas. En el Ecuador además existen diferencias en sentido norte-sur. En la zona norte y central del país el clima

permanece húmedo la mayor parte del año, en el sur, especialmente en Loja, el clima es más seco y está influenciado por dos masas de aire, una que viene de la planicie amazónica y que ha dejado casi toda su humedad en los flancos orientales, y otra de aire frío que viene del oeste influenciada por la corriente fría de Humboldt (Josse *et al.*, 2001).

El suelo es otro de los factores que determinan el tipo de vegetación existente en los diferentes hábitats. En término general, se puede decir que los suelos típicos de los páramos son húmedos, negros, con pH ácido y alto contenido de materia orgánica. En el Ecuador pueden distinguirse dos grupos básicos de suelos según el tipo de roca madre, ya sea de origen volcánico reciente, y los que no han estado sometidos a la actividad volcánica recientemente. También varían de acuerdo con la zona altitudinal, así en los páramos localizados en las zonas más altas los suelos son diferentes a los de las zonas más bajas porque tienen poco espesor, mucha roca y arena y muy poca materia orgánica, por tanto, tienen escasa capacidad de retención de agua. Entre estas condiciones ambientales también se observan condiciones extremas de sequedad, baja presión atmosférica, intensa radiación ultravioleta y los efectos del viento, granizo y nieve, así también como el fuego producido por el hombre (Josse *et al.*, 2001).

La vegetación en los páramos no es uniforme y se puede encontrar gran variedad de formas vegetales. Las diferentes zonas de vegetación y asociaciones vegetales de los altos Andes pueden ser clasificadas de varias maneras. Se han utilizado clasificaciones con énfasis bioclimático, así como otras con énfasis fisonómico o taxonómico (Josse *et al.*, 2001).

1.3. *Ecología de los bosques andinos*

Los bosques andinos (incluyendo los de páramo) que se encuentran entre los 2.400 y los 4.200 msnm están determinados por un clima templado y con alta incidencia de

niebla. Debido a que el bosque andino, hasta los 3.500 m, se encuentra en pura zona de condensación, la niebla es más frecuente y la irradiación es menor en el páramo. Esto hace que se mantengan con alta humedad durante casi todo el año, aunque no necesariamente haya mucha precipitación. Aparte de la precipitación vertical, la vegetación intercepta niebla que puede ser un aporte considerable a las lluvias totales. En consecuencia, hay baja evapo-transpiración, lento crecimiento y poca descomposición del material orgánico. Arriba de los 3.000 m, el metabolismo de los árboles está limitado por las temperaturas bajas y los suelos más infértiles (por la lenta descomposición) (Hofstede *et al.*, 1998).

Las especies arbóreas típicas para estos bosques, pero que por lo general no dominan son: *Escallonia myrtilloides* (Grossulariaceae), *Hesperomeles heterophylla* (Rosaceae), *Myrsine* spp. (Myrsinaceae) y *Oreopanax* spp. (Araliaceae) (Hofstede *et al.*, 1998).

1.4. Impacto humano y regeneración de la vegetación andina

Para su subsistencia diaria, alrededor de 500.000 personas dependen directamente de este ecosistema (Mena, 2003), es decir, utilizan estas zonas para la agricultura y ganadería (que en Ecuador se practica hace por lo menos 3.000 años a gran escala) y para obtener leña para combustible (Hofstede, *et al.*, 1998). La deforestación ha causado en la zona andina del Ecuador la disminución del bosque natural en un 90-95%. Sin embargo, la deforestación es de un 2% por año y los bosques existentes están amenazados desde todos los lados por la necesidad de madera para construcciones y combustibles, pero principalmente con el fin de abrir el terreno para la agricultura (CESA, 1989). En un ecosistema tan complejo y frágil como el bosque andino, cualquier intervención causa inestabilidad ecológica y requiere años para regenerarse. Mientras más grande sea el área deforestada, más cambios hay en el

microclima y menos factible es que todas las especies originales reaparezcan en el bosque secundario. Parte de los árboles no tienen semillas muy durables que puedan mantenerse años en el suelo y, por ende, dependen para su colonización de la dispersión desde otros bosques naturales o reforestación humana (Hoftsede, 1998). De este modo, es imperativo no solo que los seres humanos tomen parte en la reforestación activa, sino también crear procesos donde los árboles andinos puedan crecer en sitios artificiales en condiciones óptimas para luego ser retransplantados.

1.5. *Especie de estudio*

El Pumamaqui (*Oreopanax sp*) pertenece a la familia de las Araliáceas, orden Apiales. Existen más de 40 especies, pero solamente 20 en Ecuador. Este género tiene varias especies que crecen en la faja montana de Los Andes, entre los 2.000 y 4.000 msnm. Actualmente, se puede encontrar menos del 60% de bosque nativo de Pumamaqui en lugares apartados de centros poblados, terrenos escarpados e inclinados, quebradas dentro de zonas de cultivo o páramos (Josse, 1989). La razón por la que han podido sobrevivir en pendientes muy pronunciadas puede deberse a que, por la inaccesibilidad, el terreno logra conservar una cubierta vegetal densa que puede retener una capa de humus y nutrientes, o también porque los Pumamaqui poseen un sistema radicular que permite una adherencia firme al suelo y, por tanto, les permite crecer en condiciones desfavorables en cantidad y calidad de tierra (Josse, 1989). Generalmente, se los encuentra en terrenos menos inclinados, donde existe mejor calidad de nutrientes y donde el grosor de la capa de humus es mayor; por ejemplo, en riberas de ríos, quebradas no muy profundas, en los estratos bajos de bosques más o menos alterados, en bordes de carreteras y formando parte de las franjas de vegetación que limitan con potreros o terrenos cultivados (Josse, 1989). El Pumamaqui prefiere lugares con mucha humedad y/o precipitación, neblina densa a

ciertas horas del día y no se ve limitado por temperaturas bajas del montano (Josse, 1989). Debido a su posición geográfica, las variaciones de irradiación solar son de 20 minutos a lo largo del año. Esta diferencia de comportamiento fotoperiódico es insignificante para el árbol; la media de la temperatura es de $13.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante todos los meses del año; la precipitación ocurre a lo largo de todo el año, sin embargo dos períodos lluviosos se distinguen de otros dos más secos. Como no se pueden observar cambios anuales marcados en los factores ambientales ni tampoco un crecimiento sincronizado de *Oreopanax*, es difícil visualizar una fuerte influencia de los factores ambientales en el desarrollo de esta especie, por lo que se puede decir que, dentro de las condiciones tropicales del ambiente, su ritmo de crecimiento está determinado mayoritariamente por factores endógenos (Borchert, 1969).

Los miembros del género *Oreopanax* poseen un sistema sexual complicado, usualmente referido como polígamo-dioico, sus flores son unisexuales o macho mezcladas y hermafroditas (Borchsenius, 1997). Las flores pueden presentar todos los óvulos aparentemente abortivos o inviables, o también dos o tres lóbulos y sólo uno con óvulo. Los frutos son negros poco elongados, en casi todas las cabezuelas presentan uno a cinco ovarios que no han madurado (Josse, 1989), presentan cinco y, ocasionalmente, cuatro o seis crecientes formas con endospermo ruminante (Borchsenius, 1997). El máximo de fructificación se alcanza entre los meses de julio y agosto, y disminuye notablemente entre los meses de diciembre a enero (Josse, 1989).

Se los asocia generalmente con los géneros *Weinmannia*, *Polylepis*, *Gynoxis*, *Sauravia*, *Fresiera*, *Columellia*, *Herperomeles*, *Vallea*, *Miconia*, *Siphocampylus*, *Hypericum*, *Escallonia*, *Berberis*, y *Ocotea* (Josse, 1989).

En el género *Oreopanax* se pueden encontrar árboles o arbustos perennifolios a menudo epifitos, glabros o pubescentes con indumento tomentoso o escaloso, con

pelos estelados o dendriformes. Las hojas son variadas, simples, a veces grandes y cordadas, lobadas, palmatífidas o palmaticompuestas. Los lóbulos o foliolos son enteros o agudamente dentados, las estípulas están ausentes o muy inconspicuas, el pecíolo es dilatado en la base pero aligulado. Es un árbol polígamo-dioico y, según Josse, 1989, presentan hermafroditismo con estructuras femeninas y masculinas completas. Las yemas de los árboles jóvenes permanecen inactivas hasta la primera floración, por lo menos hasta los cinco años de edad. Las inflorescencias son terminales o subterminales, a menudo amplias o paniculadas capitadas. Sus flores son sésiles o muy cortamente pediceladas, casi siempre pentámeras, y sostenidas por bractéolas generalmente pubescentes. El tubo floral es obcónico y unido al ovario, las anteras son versátiles y oblongas, existen cinco estilos (-12), persistentes en el fruto. El fruto (baya) es subgloboso o elipsoide con restos de cáliz. La semilla es ovoide subtríquetra, comprimida lateralmente, el endospermo es abundante y ruminado, el embrión es muy pequeño, los cotiledones son ovados u oblongos en la radícula superior (Josse, 1989).

La diferenciación sexual se da en los frutos donde casi todas las cabezuelas presentan uno a cinco ovarios que no han madurado, las flores con todos los óvulos aparentemente abortivos o inviábiles, o flores con dos o tres lóculos y solo uno con un óvulo. Los estambres también están atrofiados. La polinización se da por dípteros (síndrome de miofilia) porque sus inflorescencias poseen flores pequeñas de colores claros, opacos y el tubo de la corola es muy corto, con pétalos libres, el néctar es fácilmente disponible, sin olor fuerte y con muchas flores cercanas (Josse, 1989).

En este trabajo se utilizaron métodos de siembra *in vitro* para evaluar los efectos externos en la germinación de semillas de Pumamaqui. Las semillas fueron

esterilizadas y luego sembradas en medios sólidos con humedad controlada. Las variantes utilizadas fueron de temperatura, salinidad, luz y hormonas.

1.6. Justificación

La germinación *in vivo* de las semillas de Pumamaqui se da entre 36 y 46 días (Samaniego, 1985). El porcentaje de germinación *in vivo*, según diferentes estudios, varía del 22% al 40% (Cárdenas *et al.*, 1984) y su sobrevivencia es menor al 50% cuando las plántulas son de entre 12 a 30 cm de altura (CESA, 1989). No se pueden realizar crecimientos por estaca debido a su falta de enraizamiento (Samaniego, 1985).

Al Pumamaqui se lo utiliza principalmente para construir el azadón o bateas, también como leña, para chapas, pulpa y papel, o para rituales o medicina. También es utilizado para proyectos de reforestación porque es una especie que crece en terrenos escarpados, lo cual contribuye a evitar la erosión y los deslaves (Borja *et al.*, 1990).

La especie de este estudio (Pumamaqui, *Oreopanax sp*) se tomó en cuenta no solo debido a su bajo porcentaje de germinación por métodos *in vivo*, sino también porque su estado es Vulnerable a En peligro según la IUCN (International Union for Conservation of Nature) de las 20 especies de este género descritas para Ecuador (Valencia *et al.*, 2000).

Es importante conocer el proceso de germinación de las semillas de Pumamaqui, para que éste se pueda mejorar y, eventualmente, llevar a cabo un proyecto no solo de reforestación, sino también de conservación.

2. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes factores externos en la germinación de semillas de Pumamaqui (*Oreopanax* sp.).

3. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de *shock* térmico, *shock* de luz y salinidad sobre la germinación de semillas de Pumamaqui
- Determinar el efecto de dos concentraciones de Giberelinas sobre la germinación de semillas de Pumamaqui.

4. Materiales

A continuación se listan los principales materiales y reactivos utilizados en este estudio:

EQUIPOS

- Cámara de flujo laminar (Labconco)
- Cajas Petri
- Pinzas
- Bisturí
- Cernidor de metal

REACTIVOS

- Alcohol (96%)
- Hipoclorito de sodio (2.5%)
- Tween 20
- Medio MS (*Murishage* y *Skoog*, 1962)
- Giberelinas (GA₃)

ESPECIES VEGETALES

- Semillas de Pumamaqui, (adquisición por compra)
- Semillas de Molle (control, adquisición por compra)

5. Métodos

5.1. *Obtención y preparación de la semilla*

Los frutos de *Oreopanax sp* se consiguieron a través de la compra directa a un invernadero (Planchaloma, Cotopaxi) (25.000 semillas aproximadamente). El estado de los frutos se notaba saludable a simple vista, sin embargo habían estado guardados por algún tiempo (indeterminado). Para asegurar la viabilidad de las semillas, éstas fueron separadas de los frutos por agitación en agua y diferentes lavados con jabón de manos y agua destilada estéril. Seguidamente se dejó remojar los frutos en agua destilada estéril (500 mL) por un período de 48 horas, se los colocó en un colador y se los refregó hasta que las semillas se encontraban totalmente libres del pericarpio. Las semillas limpias fueron colocadas en un frasco estéril con agua destilada estéril, aquellas que flotaban fueron descartadas (por inviabilidad) para continuar con su subsiguiente esterilización.

5.2. *Esterilización de las semillas*

La primera fase del proceso de esterilización se realizó en una cámara de flujo laminar, desinfectada con alcohol al 75%. Las semillas (alrededor de 2.000), antes remojadas en agua destilada, se las dejó en 200 mL de etanol al 70% por 5 minutos, moviendo el envase esporádicamente para que llegue la solución a todas las semillas. Enseguida se eliminó el alcohol y se lavaron las semillas con agua destilada estéril, moviendo de la misma manera que antes. La segunda fase de la esterilización se la realizó con 300 mL de hipoclorito de sodio al 2.5% y unas gotas del detergente Tween 20. Se sumergió a las semillas en dos vasos de precipitación con la solución de hipoclorito de sodio y Tween 20. Se las dejó por 20 minutos y se movió ocasionalmente. Para eliminar restos de la solución de hipoclorito de sodio más

Tween 20, se utilizaron lavados de agua destilada estéril. Para ello fue necesario eliminar toda la solución de los vasos de precipitación, tomando en cuenta que las semillas que flotaban podrían ser descartadas y las que se encontraban en el fondo del vaso fueron cernidas con un colador estéril. El agua destilada se vertió sobre las semillas y se movió asegurándose que todas estuvieran expuestas al agua. Se repitió este proceso seis veces hasta que no quedara ninguna semilla flotando. Una vez esterilizadas las semillas, se eliminó toda el agua posible. Para asegurarse que el proceso de esterilización fuera el adecuado, se realizaron varias pruebas denominadas A, B y C. En la primera prueba (A), la exposición al hipoclorito de sodio al 2.5% más Tween 20 varió de 20 a 30 minutos; la prueba (B), de 30 a 35 minutos, y la prueba (C), de 35 a 40 minutos. Asimismo, los lavados con agua destilada estéril variaron de acuerdo con el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio. De este modo, en la prueba (A) se realizaron 4 lavados; en la prueba (B), 6 lavados, y en la prueba (C), ocho lavados.

5.3. Preparación de medios y siembra de semillas

Se utilizó el medio de cultivo de Murishage y Skoog (MS) (1962), adicionando al medio 30gr/L de sacarosa, y 7.0 gr/L de Agar tipo A, a un pH 5.8. El segundo medio utilizado, AM, fue realizado con la mitad de la concentración de sales del medio MS. Ambos medios se repartieron en frascos de vidrio estériles.

La siembra se la realizó en una cámara de flujo laminar estéril. Toda la instrumentación utilizada se la esterilizó con alcohol al 75%. Se utilizó mascarilla y se esterilizaron las manos con alcohol para el proceso. Para la inoculación de las semillas estériles, se las recogió con una pinza muy suavemente, evitando su punción y se las dejó caer sobre el medio. Luego, con la misma pinza, se las esparció homogéneamente evitando que existieran más de un lado que del otro y se trató de

llenar el área con una separación de 1 cm entre ellas. Finalmente, para mantener la humedad al 100%, se cubrió el envase con dos capas de plástico. Se aseguró al plástico con una liga y se incubaron en el cuarto de cultivo.

5.4. Evaluación de los efectos de luz, temperatura y salinidad

Para evaluar los efectos de luz y temperatura se utilizaron tres tratamientos. El primero consistió en la germinación de semillas de Pumamaqui a 23° C (controlados), en presencia de luz por 16 horas y en ausencia de luz por 8 horas. El segundo consistió en el crecimiento de las semillas de Pumamaqui a 4° C en ausencia total de luz (debido a que no se pudo controlar el tiempo de luz dentro del refrigerador, se eliminó el tratamiento en presencia/ausencia de luz). El tercer tratamiento consistió en la germinación de las semillas a temperatura ambiente, pero en ausencia total de luz (*shock* de luz) durante un período de 4 días, para luego dejarlos por 6 días en presencia de luz, por 16 horas, y en ausencia, por 8.

Para evaluar los efectos de la salinidad en la germinación se utilizaron dos diferentes medios de cultivo (MS y AM) que contenían dos concentraciones de sales. Ambos tratamientos fueron incubados en las mismas condiciones de temperatura y luz, antes descritas.

Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones por medio con aproximadamente 12 semillas por frasco. Se observaron los cambios cada 10 días.

5.5. Evaluación del efecto de las Giberelinas (GA_3)

En el medio de cultivo AM se colocó una concentración de 1.5 y 3 μ M de GA_3 ; para ello se preparó una solución madre de 100 mL a una concentración de 100mg/mL de GA_3 . De esta solución se tomaron 250 μ L y se los colocó en 500 mL de medio AM para obtener una concentración final de 1.5 μ M. Para la obtención de una dilución de

3 μM , se colocaron 500 μL de la solución madre y se los vertió en 500 mL de medio AM. Debido a que la GA_3 es termolábil (Dixon y Gonzales, 1994) no se autoclavó al medio junto con la hormona, sino que ésta se la filtró a través de un filtro miliporo. Para cada concentración se realizaron ocho repeticiones con aproximadamente 12 semillas por frasco.

Se utilizaron semillas de Molle como control debido a su alto porcentaje de germinación *in vivo*, y también porque esta especie se desarrolla en ámbitos similares a los de la especie en estudio. Para su siembra se utilizaron las mismas metodologías antes descritas para *Oreopanax sp.*, con excepción de la siembra en presencia de giberelinas.

5.6. *Subcultivo y Evaluación del enraizamiento*

Para evaluar la capacidad de enraizamiento de las plántulas, se realizó un subcultivo cuando estas tenían alrededor de 4 cm de alto. Para ello se extrajeron las plántulas delicadamente con pinza estéril y se las colocó en una caja Petri para poder cortar las raíces justo en el lugar de unión con el tallo y luego se las sembró en medio AM en un frasco estéril. Todo el proceso se realizó en condiciones estériles de la misma manera antes descrita. Cada tratamiento (4 frascos) por especie se colocó a 23° C bajo la luz, por 16 horas. Se observaron los resultados cada diez días.

5.7. *Evaluación del efecto de Auxinas (IAA y NAA) en el enraizamiento*

Se prepararon 5 diferentes soluciones de distintas concentraciones (1, 3, 9, 15 y 21 μM) de IAA (Indole-3-Acetic Acid) y de NAA (1-Naphthaleneacetic acid) para subcultivo de Pumamaqui. El medio, aún caliente, se vertió en cinco tubos de ensayo (25 mL) estériles, por medio y se los cubrió hasta que este se enfríe para la subsiguiente siembra de los brotes de Pumamaqui y Molle.

En cada tubo de ensayo con el respectivo medio se sembró una plántula de Pumamaqui sin raíces como se describió anteriormente. Se las cubrió con plástico y se las dejó a 23° C con 16 horas de luz (8 horas en ausencia de luz) por 10 días para observar resultados.

Adicionalmente, se realizó un subcultivo en el medio AM con IAA y carbón activado, para comprobar si la luz tendría efecto en el enraizamiento. Para ello se realizó un medio AM más IAA 6.0 µM y se agregaron 25 mg de carbón activado. El Molle se subcultivó en dos diferentes tratamientos, el primero contenía el medio antes descrito (AM/IAA carbón activado) y el segundo sin hormonas. Se sembró el molle en cada tubo de ensayo, cinco tubos para cada tratamiento y se los dejó a 23° C con 16 horas de luz (8 horas en ausencia de luz) por 10 días para observar resultados.

5.8. *Análisis de datos*

Todos los resultados se presentaron en porcentajes de germinación. El porcentaje de germinación se calculó a partir de la diferencia entre la sumatoria de semillas germinadas y la sumatoria de semillas contaminadas, y su resultado fue dividido entre la sumatoria de semillas sembradas. Para obtener un valor en términos porcentuales, el resultado fue multiplicado por 100. Debido al alto porcentaje de contaminación, los resultados se presentaron en porcentaje relativo y porcentaje absoluto. En el primer caso, se ignoran las semillas contaminadas y solo se toman en cuenta las germinadas y no germinadas, con lo cual se generó una muestra más pequeña.

El porcentaje de sobrevivencia en este estudio se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% S = \frac{\text{Total de semillas germinadas}}{\text{Total de plántulas vivas}}$$

6. Resultados

6.1. *Obtención de las semillas*

Las semillas se obtuvieron mediante extracción directa a partir de los frutos. Se pudo establecer que el pericarpio de los frutos tenía fenoles, puesto que cuando se colocaron los frutos en los medios MS y AM, a simple vista, se pudo observar que los medios se tornaron de color púrpura oscuro, indicativo que en el pericarpio se encuentran fenoles, los cuales son conocidos por inhibir la germinación (Palazón *et al.*, 2007). Por lo mismo, para contrarrestar el efecto inhibitorio de los fenoles se extrajo manualmente todo el pericarpio visible.

6.2. *Esterilización de las semillas de Oreopanax sp*

El primer protocolo de esterilización (estándar del laboratorio de trabajo) produjo una contaminación total en todos los medios y parámetros analizados, por lo que se tuvo que variar el proceso esterilizante en tiempo de exposición y número de lavados con agua destilada estéril. Así, los tres tratamientos de esterilización denominados A, B y C produjeron resultados similares (A 23% de contaminación ; B 32% de contaminación, C 21% de contaminación), pero para garantizar que las semillas sigan viables se continuó con la metodología A, debido a que su exposición al agente esterilizador fue el menor.

6.3. *Tiempo de germinación de Oreopanax sp*

El tiempo de germinación se lo tomó al observar la primera señal de protrusión de la radícula que se apreció en el medio AM a los 75 días; sin embargo, al adicionar hormonas (GA_3) al medio, la germinación tomó 26 días en mostrar la primera señal de la radícula.

6.4. Salinidad

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de germinación, en dos concentraciones de sales. La primera correspondió a la concentración normal de sales de *Murishage* y *Skoog* (MS) (1962), y la segunda fue la mitad de la concentración de MS, denominada AM. Para todos los parámetros analizados, *i.e.*, luz (ausencia y presencia) y temperatura (4° C y 23° C), el medio AM obtuvo un mayor porcentaje de germinación en comparación con el medio MS, tanto para *Schinus molle* como para *Oreopanax sp* (Tablas 1 y 2, y Figuras 1 y 2). En el caso del Pumamaqui, el medio MS produjo una media en el porcentaje relativo de 25% de germinación para todos los parámetros, mientras que el medio AM obtuvo una media en el porcentaje relativo de 35% de germinación en todos los parámetros. Para el Molle, la media de porcentaje de germinación para el medio MS fue de 67% y para el medio AM fue de 86.75%. En ambos medios, para el Pumamaqui sólo se tomó en cuenta el porcentaje relativo de germinación, debido a que en este valor no se consideraron las semillas contaminadas.

6.5. Luminosidad

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayor germinación se obtuvo en ausencia de luz para ambos medios AM y MS. El porcentaje relativo de germinación (sin incluir las semillas contaminadas) para el medio AM en ausencia de luz fue de 40% en el caso del Pumamaqui y de un 89% para el Molle (Tablas 1 y 2, y Figura 3), mientras que en presencia de luz fue de 25% para el Pumamaqui y de un 85% para el Molle (Tablas 1 y 2, y Figura 4). El porcentaje relativo de germinación para el medio MS en ausencia de luz fue de 31% para el Pumamaqui, y de un 55% para el Molle y, en presencia de luz, el porcentaje de germinación para el Pumamaqui fue de 13% y para el Molle de 69% (Tablas 1 y 2, y Figuras 3 y 4). En el caso del Molle el porcentaje total de germinación también obtuvo valores altos, similares a los del

porcentaje relativo. Esto se debe a que en el caso del Molle el porcentaje de contaminación no fue tan elevado, *i.e.*, 26% (media de ambos tratamientos), mientras que el Pumamaqui obtuvo un porcentaje de contaminación del 54.12% (Tablas 3 y 4).

6.6. *Temperatura*

Para ambas especies, Pumamaqui y Molle, se observó un mayor porcentaje de germinación a menor temperatura, *i.e.*, 4° C. El valor del porcentaje relativo a 4° C del Pumamaqui fue de 38% (media para ambos medios utilizados), mientras que para 23° C fue de 27.5%. En el caso del Molle los porcentajes de germinación fueron los siguientes: 4° C: 80.5%, y 23° C: 77.5% (Tablas 3 y 4, y Figuras 5 y 6).

6.7. *Giberelinas*

De acuerdo con los resultados de salinidad, el medio que mayor porcentaje de germinación produjo fue el de AM, por lo que en este experimento se continuó únicamente con este medio. Los resultados de germinación con diferentes concentraciones de giberelinas (GA₃) y a diferentes temperaturas (4° C y 23° C) y luminosidades (ausencia y presencia), mostraron un porcentaje mayor en ausencia de luz y a temperaturas más bajas, y una mayor germinación a menor concentración de la hormona. Se obtuvo, en ausencia de luz para la concentración de 1.5µM GA₃, 69%, mientras que para el tratamiento con luz se obtuvo un porcentaje de 60% (Tabla 2 y Figura 7). Para la misma concentración a 4° C se dio un porcentaje de germinación de 70%, y para 23° C se obtuvo un porcentaje de germinación de 65% (Tabla 2 y Figura 7). Para la concentración de 3.0µM GA₃ en ausencia de luz, se obtuvo un porcentaje de germinación de 59%, mientras que en presencia de luz se obtuvo un porcentaje de germinación de 54% (Tabla 2 y Figura 7). En el tratamiento de temperatura, para la

misma concentración, se consiguió un porcentaje de 61% en el régimen de 4° C, y 60% en el régimen de 23° C (Tabla 2 y Figura 7).

6.8. Subcultivo

En el primer intento de subcultivo se observó que las raíces de *Oreopanax* sp estaban debilitadas y de color negruzco. Al momento de realizar el subcultivo, las raíces se rompieron, y solamente se sembró el brote (1) en medio AM. En cambio *Schinus molle* no mostró enraizamiento alguno. Para fomentar el enraizamiento se colocaron auxinas en tubos de ensayo (una plántula por medio). Para *Oreopanax* sp se realizó el subcultivo en IAA y NAA a diferentes concentraciones (1, 3, 9, 15, 21 µM) en cada uno. A *Schinus molle* se lo subcultivó en medio IAA más carbón activado y sin carbón activado. Los resultados fueron observados al mes y no se obtuvo ninguna respuesta.

6.9. Porcentaje de sobrevivencia

El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo a partir del total de semillas germinadas sobre el total de plántulas vivas obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas de Pumamaqui, y después de haberlas subcultivado. El porcentaje conseguido fue del 13.71%.

7. Discusión

7.1. Obtención y almacenaje de semillas

La producción de las semillas en árboles es muy irregular e impredecible (Kozlowski & Pallardy, 1997) y, por tanto, su cosecha puede variar no sólo entre especies sino también entre árboles de la misma especie, e incluso de año a año. Por ende, las semillas se deben almacenar en condiciones viables (período de tiempo en que las

semillas conservan su capacidad para germinar) y, de esta manera, poder preservar la especie que, de otro modo, podría extinguirse, y también para poder mantener su diversidad genética. Las semillas son mejor colectadas y almacenadas cuando están fisiológicamente maduras, después de que han alcanzado su máximo de peso seco, esto es, cuando los recursos han dejado de trasladarse desde la planta madre hacia la semilla (Kozlowski, 2002). Las proteínas de las semillas maduras pueden deshidratarse y rehidratarse sin pérdida de su función (Harrington, 1972). Cuando las semillas maduran, su capacidad de germinación entra en declive progresivamente, así como también la síntesis de proteínas, lípidos y sistemas de reparación; adicionalmente, entra en declive la síntesis de ARN, aumentan las aberraciones cromosomales, cambios de actividad enzimática, cascadas de la respiración y compuestos de almacenaje; las membranas se vuelven más permeables a iones orgánicos e inorgánicos (Kozlowski, 2002).

Las semillas se pueden clasificar, de acuerdo con sus características de desecación, en ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas pueden mantenerse viables por mucho tiempo, y se pueden deshidratar hasta el 5% o, a veces, hasta el 2%. Por el contrario, las semillas recalcitrantes tienen un tiempo de vida muy corto, y deben permanecer húmedas para que no pierdan su viabilidad y, aún húmedas, algunas semillas recalcitrantes pueden perder su capacidad de germinación en unas pocas semanas o meses (Kozlowski, 2002).

Las semillas almacenadas no sólo dependen de la humedad del entorno, sino también de la temperatura a la que deben ser guardadas. Las semillas recalcitrantes pueden ser almacenadas dentro de un rango de 15° C a 21° C, mientras que las semillas ortodoxas pueden ser almacenadas a temperaturas de entre -2° C y -20° C (Tompsett, 1992).

No existe un estudio formal para clasificar a las semillas del Pumamaqui, no obstante, según las observaciones hechas, podrían pertenecer, tentativamente, a la clasificación de ortodoxas debido al tiempo que estuvieron guardadas y mostraron un porcentaje alto de germinación. Empero, como se mencionó anteriormente, la biología de las semillas podría variar no sólo entre especies, sino dentro de la misma especie. Tampoco existe un estudio con datos exactos que determine la pérdida de capacidad de germinación para semillas de *Oreopanax sp*, ni tampoco un método de almacenaje; sin embargo, según Brandbyge & Holm-Nielsen (1986) y *El verdor de los Andes* (1992), la viabilidad de las semillas de *Oreopanax sp* disminuye después de tres meses de almacenaje. Por cuestiones de tiempo del estudio realizado, no se pudieron recolectar las semillas (tiempos de fructificación, ver Introducción), por lo que estas se obtuvieron mediante compra directa de frutos secos a un invernadero (Planchaloma, Cotopaxi, 2004), lo que supone que las semillas estaban almacenadas por el tiempo necesario para mantener la viabilidad. Sin embargo, no existe un dato exacto de cuándo, ni dónde, ni cómo fueron almacenadas estas semillas. También es importante notar que entre los frutos se encontraron pedazos de hojas secas de *Eucalyptus sp* y abundante *debris*. Según Kozłowski (2002), los frutos se deberían almacenar a bajas temperaturas por encima del congelamiento y aumentando la concentración de CO₂ en las cámaras de almacenaje de 2 al 6%, y también disminuyendo la concentración de O₂ del 2% al 3% para, de esta manera, retrasar las tasas metabólicas y de senescencia (envejecimiento), pero de acuerdo con el ingeniero Rafael Muenala del Invernadero Planchaloma, en el lugar no cuentan con cámaras de almacenaje, debido a que su metodología es artesanal (Comunicación Personal, 2004).

Las condiciones en que las semillas fueron almacenadas y recolectadas (no solamente de los árboles sino también del piso, evidenciado por el *debris*), tienen que

ver directamente con el alto porcentaje de contaminación encontrado, si se compara con el control (Molle). La fuente de contaminación debería provenir solamente de las capas externas de la semilla y no del embrión; sin embargo, se evidenció que las semillas se contaminaban después de algún tiempo de haber sido colocadas en el medio de cultivo y se podía observar que los contaminantes (principalmente los hongos) se esparcían a su alrededor. Podría pensarse que el proceso de esterilización no fue el correcto; sin embargo, era evidente que las semillas tenían pequeños orificios, cuya causa no fue identificada, por donde pudieron haber ingresado contaminantes dentro de la semilla.

Otro factor que pudo intervenir en la germinación de *Pumamaqui* tiene que ver con los restos de fenoles, que no se eliminaron por completo de la superficie de las semillas. Como se mencionó anteriormente, se pudo observar que los frutos (pericarpio) contenían fenoles, y a pesar de que la limpieza del pericarpio fue exhaustiva, pudo haber quedado algún residuo del mismo. Las semillas acumulan importantes cantidades de fenoles en sus cubiertas que actúan como un filtro para que el oxígeno no llegue al embrión, inhibiendo su germinación (Palazón, Cusidó y Morales, 2007).

7.2. Salinidad

En los suelos tropicales, el agua subterránea es considerada como la mayor fuente de agua para los árboles y está sujeta a una frecuente salinación (Agboola, 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos, la germinación de *Oreopanax sp* se ve afectada por la concentración de sales en el medio. A menor concentración, mayor fue la germinación. Sin embargo, es difícil decir cuál sería la concentración necesaria para una germinación óptima, porque solamente se investigaron dos diferentes concentraciones, 1X MS y 0.5X MS.

Las especies de árboles tropicales se ven afectadas de la misma manera, es decir, a menos salinidad de sustrato, mayor es la germinación (Agboola 1998, Rashid *et al.*, 2004), pero la tasa de germinación varía entre especies e incluso entre semillas. La salinidad en el sustrato puede afectar la germinación, ya sea aumentando la presión osmótica de la solución de la tierra/sustrato a una planta (retardando o previniendo el insumo de agua) o causando toxicidad al embrión (Johnston, 1971). No obstante, no está definido todavía el límite entre el efecto osmótico predominante y el efecto tóxico de las sales (Agboola, 1998).

La temperatura y la luminosidad fueron factores que también se analizaron y que se pueden correlacionar con el sustrato de siembra. Así, a menor temperatura y a menor salinidad del medio de cultivo, se observó una mayor germinación, como también, a menor salinidad y en oscuridad, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación. Esto se puede deber a que el Pumamaqui habita en condiciones extremas evidenciadas en el páramo, como son: una baja temperatura y en pendientes pronunciadas donde predomina la sombra.

7.3. Luminosidad

Por la posición geográfica en donde habita el Pumamaqui, la variación en la longitud del día es sólo de 20 minutos en el año, por lo que se podría decir que esta diferencia es insignificante en términos de comportamiento fotoperiódico del árbol (Borchert, 1969) y, por ende, afectaría poco en la germinación. Los datos obtenidos en este estudio, demuestran que las semillas de *Oreopanax sp* germinaron mejor en oscuridad, lo cual podría deberse, a que la germinación ocurre mayormente bajo tierra, es decir en ausencia de luz.

La luz promueve o inhibe la germinación de semillas en algunas especies. Entre las semillas sensibles, aquellas que son inhibidas por la luz son denominadas fotoblásticas negativas. La influencia de la luz es ejercida por el efecto de longitud de onda (calidad), intensidad y por la duración (fotoperíodo). En las semillas fotosensibles, el fitocromo es el fotoreceptor principalmente asociado con la captación y transmisión del estímulo bajo la forma activa (Pfr), (Everham *et al.*, 1996), lo que pudo haber sucedido con las semillas de Pumamaqui.

7.4. Temperatura

La germinación fue mayor cuando se dejaron las semillas a 4° C por cuatro días en una primera instancia, y luego se mantuvieron a 23° C, y fue menor cuando solamente se mantuvieron a 23° C. Esto podría deberse a que las enzimas que inician con la germinación se hayan adaptado para que se activen a una baja temperatura, como la del páramo, hábitat natural del Pumamaqui (Josse, 1989; Josse *et al.*, 2001). Estos resultados son similares a los de Walck *et al.* (2004), en donde las semillas de *Schoenolirion croceum* germinaron no solo en la oscuridad sino también en el frío, pero esto se debe a que este árbol tiene un crecimiento sincronizado con las estaciones, y por ende estos parámetros son los responsables de la rotura de la dormancia cuando los factores externos son los óptimos. El Pumamaqui no habita en zonas donde esto sucede, por lo que no se puede hablar de dormancia en estas semillas.

La temperatura óptima de germinación no pudo ser establecida, ya que solamente se estudiaron dos temperaturas.

7.5. Giberelinas

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que en el medio con giberelinas (GA₃) se obtuvo un mayor porcentaje de germinación a una concentración de 1.5 µM y a menor temperatura (4° C). Esto podría deberse a que esta hormona induce la acción de enzimas, amilasas, responsables de liberar azúcares para el embrión en crecimiento. De esta manera es como se induce la biosíntesis de giberelinas por retroalimentación. Al contrario, cuando existe una concentración muy alta de giberelinas, la germinación es inhibida (Giberelina, 2007).

7.6. Porcentaje de sobrevivencia

El porcentaje de germinación obtenido no podría ser el único factor limitante para poder conservar esta especie. Es igual de relevante conocer cuántas plántulas sobreviven después de haber germinado. El porcentaje de sobrevivencia obtenido fue del 13.71%, el cual es muy bajo para poder realizar un proyecto de reforestación. No existe un estudio similar *in vitro* para fines de comparación; sin embargo, en *El Verdor de los Andes* (1992) se cita una mortalidad del 10% para un porcentaje de germinación del 65% en arena y turba, con un porcentaje de sobrevivencia del 55%. Es mucho mayor al obtenido en este estudio; de todas maneras, debido a la reducción del tamaño de la muestra (por problemas de contaminación), no se podría determinar cuál de los dos es mejor. Josse (1989) en su tesis de pregrado cita que, de las 4-5 semillas que se encuentran por fruto, tres de ellas son abortivas, lo que quiere decir que en aquellas semillas que se contaminaron podrían encontrarse no solo las abortivas, sino también las que tienen el potencial de germinar.

Por otro lado, de acuerdo con comunicaciones personales (Ing. Muenala, Invernadero Planchaloma; Señor Jorge Herrera, Profafor), el porcentaje de germinación *in vivo* es menor al citado anteriormente. En promedio, el porcentaje de

germinación en siembras artesanales es del 30 al 40%. Este porcentaje no varía mucho del obtenido en este estudio (30% en todos los tratamientos excepto adicionando giberelinas). Si se toma en cuenta la hormona, el porcentaje de germinación fue de 46%, sin embargo considerando todos aquellos tratamientos que obtuvieron una mayor germinación, se puede decir que el porcentaje relativo promedio de ellas fue del 55%.

La falta de germinación se podría explicar no solamente por el reducido tamaño de la muestra (alta contaminación), sino por una posible inmadurez de las semillas, un problema común en la altura y en altas latitudes (Leadem, *et al.*, 1997), así también como la inmadurez de la madre. Esto no se puede saber con certeza debido a que, como se mencionó anteriormente, las semillas se adquirieron por compra. También es posible que insectos, hongos y otras pestes pudieran haber atacado a las semillas y disminuido su calidad y viabilidad (Leadem, *et al.*, 1997)

El intrincado proceso sexual del Pumamaqui podría influenciar en el estado de la semilla, sin embargo no se encontraron otros estudios que sustenten esta teoría.

8. CONCLUSIONES

Los factores externos evaluados en este estudio (temperatura, salinidad del sustrato, luminosidad) demostraron tener una influencia en la germinación de semillas de Pumamaqui, dando mayores porcentajes de germinación a menor temperatura, ausencia de luz, y a una menor concentración del sustrato.

El Pumamaqui se ha adaptado a las condiciones extremas de su hábitat natural, como se observó en la germinación de sus semillas a bajas temperaturas, temperatura con la cual su metabolismo trabaja en óptimas condiciones.

Las semillas de Pumamaqui germinaron mejor en ausencia de oscuridad.

La utilización de GA₃, para evaluar su influencia en la germinación de semillas de Pumamaqui demostró una mayor germinación a una menor concentración, debido, quizá, a que las concentraciones intrínsecas a la semilla se compensaron con las encontradas en las del ambiente.

Oreopanax consta de 20 especies en Ecuador y todas se encuentran en la lista de la IUCN. Por lo que un proyecto de conservación para la misma es fundamental, especialmente por su bajo porcentaje de germinación en su hábitat natural. En este estudio se intentó mejorar el porcentaje de germinación por metodología *in vitro*. Sin embargo, el porcentaje obtenido estuvo afectado por el tamaño de la muestra no representativa.

9. Recomendaciones

Los páramos de Ecuador están dentro de los ecosistemas más amenazados del país, debido a que se han convertido, extensivamente, en zonas agrícolas, ganaderas, o en bosques secundarios, que son plantaciones de árboles para la cosecha de madera, como el pino. Es un requisito conocer temas como la germinación y el establecimiento de las plántulas para que los esfuerzos de restauración de estos bosques sean exitosos. También es recomendable un óptimo almacenaje para poder preservar la diversidad genética y prevenir la extinción de la especie.

Existieron problemas en este estudio, principalmente por haber comprado las semillas y no saber cuál es la mejor manera de almacenaje de las mismas. Para mejorar este estudio, quizá sea mejor que las semillas (frutos) sean recogidas(os) directamente de los árboles para asegurar una menor contaminación y también conocer el estado de la madre (la germinación mejora cuando la madre es adulta). El recolector no debería enfocarse solamente en un sitio de recolección sino en varios con el propósito de asegurar una muestra más representativa.

Las giberelinas ayudan en el proceso de germinación, y sería importante conocer cuál es la concentración exacta necesaria, para lo que se recomienda hacer un estudio con mayor rango de concentraciones (al menos cuatro) siendo $1.5\mu\text{M}$ la mayor de ellas. De la misma manera, deberían investigarse diferentes concentraciones de sales, con miras a saber cuál es la óptima para la germinación de la especie de estudio. La germinación se realiza mejor a una temperatura óptima. En este estudio no se investigó ese parámetro, para lo que se recomienda investigar un rango de diferentes temperaturas (al menos cuatro) para asegurar una mayor germinación de semillas de Pumamaqui.

Para saber cuál semilla es viable se debería utilizar Tetrazolium, cuyo objetivo es determinar cuáles tejidos del embrión están vivos y que, por tanto, tienen el potencial de germinar bajo condiciones óptimas. El tetrazolium es un químico sin color que reacciona con las células vivas y las tiñe de rojo (Seed Viability (Tetrazolium) Tests, 2007). En este estudio no se lo utilizó por falta de acceso al mismo.

Quizá sea importante realizar propagaciones vegetativas o cultivo de embriones, para apresurar un proyecto de reforestación.

10. Bibliografía

- Agboola D. A. (1998). Effect of saline solutions and salt stress on seed germination of some tropical forest tree species. *Revista de Biología Tropical*. **46**(4).
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. **9**. 1055-1066.
- Borchert, R. (1969). Unusual Shoot Growth in a Tropical Tree, *Oreopanax* (Araliaceae). *American Journal of Botany*. **56**(9): 1033-1041.
- Borchsenius, F. (1997). *Oreopanax* (Araliaceae) in Ecuador. *Nordic Journal of Botany*. **17**(4): 376-396.
- Borja F., P. Ramos y A. Tobar. (1992). *Investigación y Propagación de Especies Nativas en los Andes*. Quito.
- Branbyge J. y L. B. Holm-Nielsen. (1986). Reforestation of the High Andes with Local Species. *Reports from the Botanical Institute, University of Aarhus*. 48-79.
- Cárdenas F. (1984). *Pumamaqui (Oreopanax sp): Tratamientos para la Producción de plántulas*. Quito: Ministerio de Agricultura.
- CESA. (1989). *Estudio Preliminar de las Propiedades Físicas y Mecánicas de Diez Especies de la Sierra del Ecuador*. Quito.
- Dixon R. A. y R. A. Gonzales. (1994). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- “El Verdor de los Andes”. (1992). *Proyecto Forestal Participativo en los Andes*. 63-65. Quito.
- Everham E. M., W. Myster y E. VanDeGenachte. (1996). Effects of light, Moisture, Temperature, and Litter on the Regeneration of Five Tree Species in the Tropical Montane Wet Forest of Puerto Rico. *American Journal of Botany*. **83**(8): 1063-1068.
- “Germinación de Semillas: Parte III,, Tema 17”. Universidad Politécnica de Valencia. <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm#Introducción>. (Ag. 19, 2005).
- “Giberelina”. Wikipedia. <<http://es.wikipedia.org/wiki/Giberelina>>. (Oct. 17, 2007).
- Koornneef M., L. Bentsink y H. Hilhorst. (2002). Seed Dormancy and Germination. *Plant Biology*. **5**: 33-36.
- Kozlowski T. (1997). *Responses of Woody Plants to Flooding and Salinity*. Tree Physiology.

- and S. G. Pallardy. (2002). Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses. *The Botanical Review*. **68**(2): 270-334.
- Harrington J. F. (1970). Seed Storage and Longevity. *Seed Biology*. **3**: 145-249.
- Hofstede R., J. Lips, W. Jongsma y Y. Sevink. (1998). Geografía, Ecología y Forestación de la Sierra Alta del Ecuador. Quito: Ediciones Abya-Yala.
- Johnston M.E.H. (1971). Effect of Salinity and Water Potential on Germination. 17-18. *Advances in Research and Technology of Seeds C.T.A Wagenigen, Netherlands*.
- Josse, C. (1989). Estudio Taxonómico de las Especies de Hojas Enteras de *Oreopanax* (Araliaceae) en el Bosque Montano Alto Ecuatoriano. Quito: PUCE, tesis de pregrado.
- (ed.). (2001). La Biodiversidad del Ecuador: Informe 2000. Quito: Ministerio de Ambiente, EcoCiencia, IUCN. 1-378.
- Kyereh B., M.D: Swaine, y J. Thompson. (1999). Effect of Light on Germination of Forest Trees in Ghana. *Journal of Ecology* **87**: 772-783.
- Leadem L.L., S.L. Gillies, H.K. Yeasley, V. Sit, D.L. Spittlehouse y P.J. Burton. Field Studies of Seed Biology: Land Management Handbook. British Columbia, Ministry of Forests Research Program.
- Mena P. V. y D. Ortiz (eds.). (2003). Lecciones desde las Alturas: Un Resumen de la Sistematización del Proyecto Páramo.. Páramos y Bosques Andinos 13: Páramo. Quito: GTP, EcoCiencia.
- Murishage T. y F. Skoog. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology* **15**: 473-479.
- Palazón J., R. M. Cusidó, y C. Morales. "Metabolismo y Significación Biológica de los Polifenoles del Vino." <http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm> (4 Agosto 2007).
- Rashid M.M., A.K.F. Hoque, y M.S. Mekhar. (2004). Salt Tolerance of Some Multipurpose Tree Species as Determined by Seed Germination. **4**(3): 288-292.
- Samaniego E. M. E. (1985). Estudio de Propagación de Pujún (*Hespermoles heterophylla*) y Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis*) a nivel de invernadero. Riobamba.
- "Seed Viability (tetrazolium) Tests." Seed Quality Tests. <<http://www.niab.com/services/laboratory-services/test-detail-pages.html>> (Oct. 17, 2007)
- Tompsett, P. B. (1992). A Review on the Literature on Storage of Dicotyledon Seeds. *Seed Science & Technology* **20**: 251-267.

Valencia, R., N. Pitman, S. León-Yáñez y P. M. Jørgensen. (eds.) (2000). Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Quito: Herbario QLA, PUCE. 87-88.

Villé C., L.R. Berg, D.W. Martin, E.P. Solomon. (1998). Biología de Villé. Mexico: McGraw-Hill Interamericana.

11. Tablas

Tabla 1. Cuadro comparativo de porcentajes de germinación total por cada tratamiento realizado en semillas de *Schinus molle*.

MEDIO	TRATAMIENTO	REGIMEN	% RELATIVO	%TOTAL
MS	LUZ	CON	55	53
		SIN	69	61
	TEMP (°C)	4	76	72
		23	68	67
AM	LUZ	CON	89	86
		SIN	83	82
	TEMP (°C)	4	85	83
		23	87	83

Tabla 2. Tabla comparativa de porcentajes de germinación por cada tratamiento realizado en semillas de *Oreopanax sp.*

MEDIO	TRATAMIENTO	REGIMEN	% RELATIVO	%TOTAL
MS	LUZ	CON	13	1
		SIN	31	1
	TEMP (°C)	4	35	2
		23	21	1
AM	LUZ	CON	25	2
		SIN	40	2
	TEMP (°C)	4	41	4
		23	34	3
	1.5µM GA ₃ LUZ	CON	60	5
		SIN	69	7
	1.5µM GA ₃ TEMP (°C)	4	70	8
		23	65	5

Tabla 3. Porcentajes de contaminación por cada tratamiento en *Oreopanax sp*

MEDIO	TRATAMIENTO	REGIMEN	%contaminación
MS	LUZ	CON	87
		SIN	69
	TEMP (°C)	4	65
		23	79
AM	LUZ	CON	75
		SIN	60
	TEMP (°C)	4	59
		23	66
	1.5µM GA ₃ LUZ	CON	40
		SIN	31
	1.5µM GA ₃ TEMP (°C)	4	30
		23	35
	3.0µM GA ₃ LUZ	CON	46
		SIN	41
	3.0µM GA ₃ TEMP (°C)	4	39
		23	40

Media % Contaminación	53,875
-----------------------	--------

Tabla 4. Porcentajes de contaminación por cada tratamiento en *Schinus molle*

MEDIO	TRATAMIENTO	REGIMEN	%Contaminación
MS	LUZ	CON	45
		SIN	31
	TEMP (°C)	4	24
		23	32
AM	LUZ	CON	11
		SIN	17
	TEMP (°C)	4	15
		23	13

Media %Contaminación	23,5
----------------------	------

12. Figuras

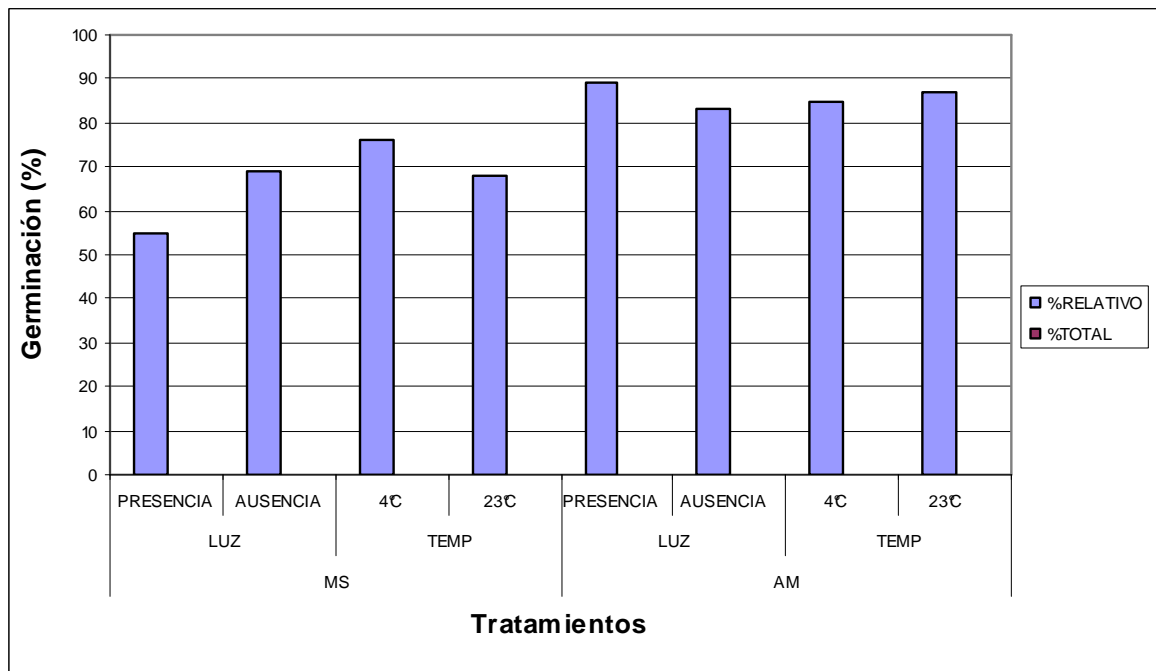


Figura 1. Gráfico comparativo entre porcentajes de germinación total y relativo para todos los tratamientos de *Schinus molle*.

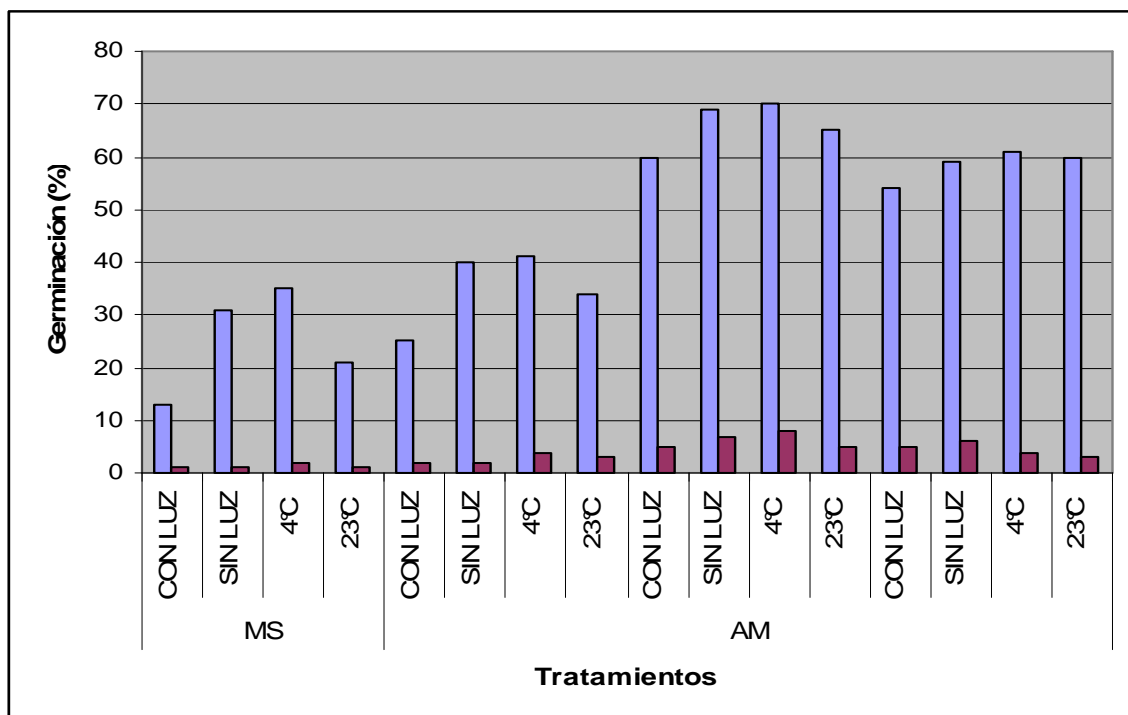


Figura 2. Gráfico comparativo entre porcentajes de germinación total y relativo para todos los tratamientos de *Oreopanax sp.*

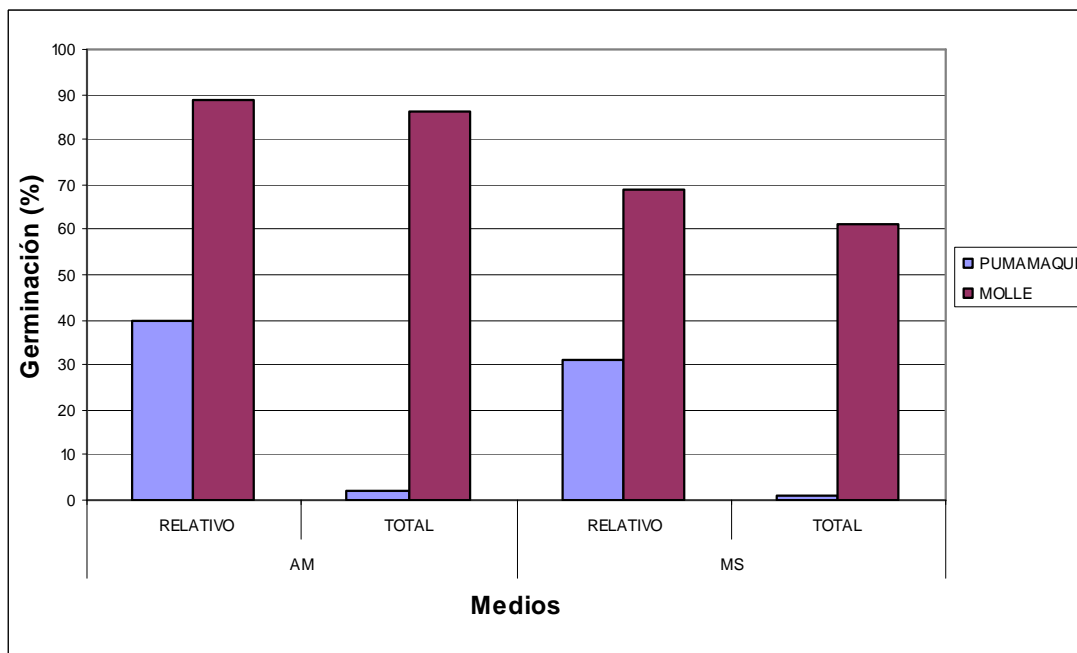


Figura 3. Gráfico comparativo de porcentajes de germinación entre *Oreopanax sp* y *Schinus molle* y entre medios AM y MS en ausencia de luz.

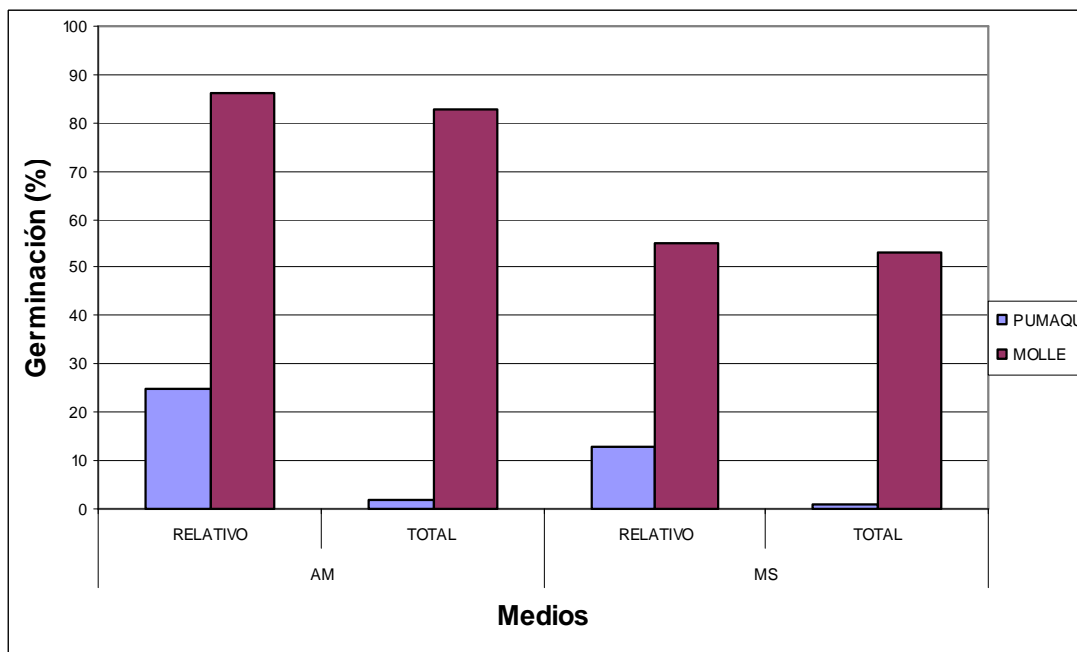


Figura 4. Gráfico comparativo de porcentajes de germinación entre *Oreopanax sp* y *Schinus molle* y entre medios AM y MS en presencia de luz.

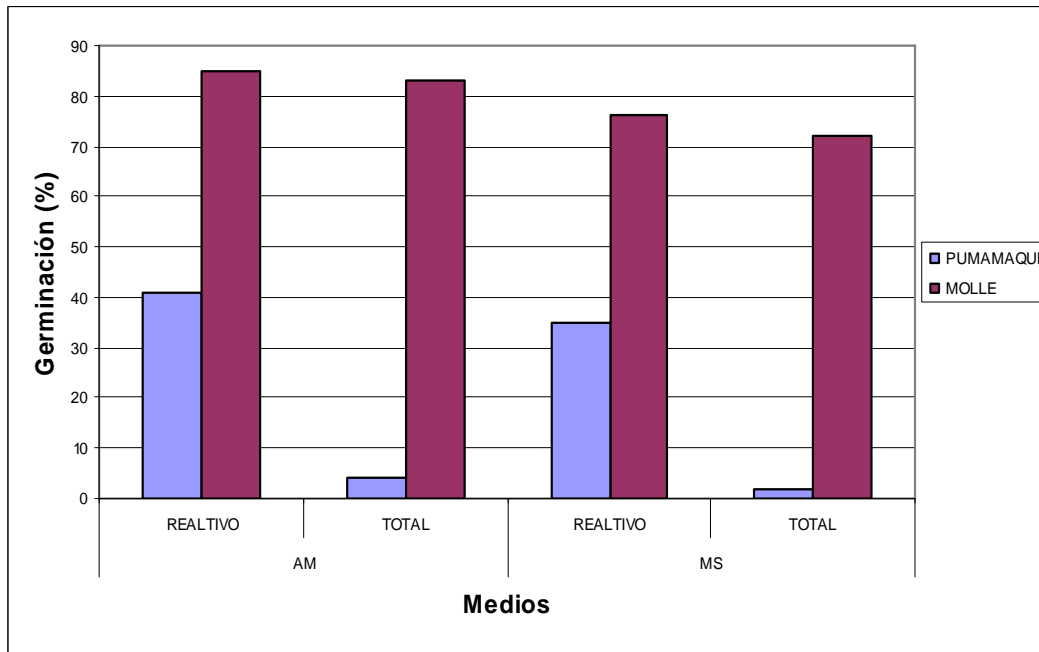


Figura 5. Gráfico comparativo de porcentajes de germinación entre *Oreopanax sp* y *Schinus molle* y entre medios AM y MS a 4°C.

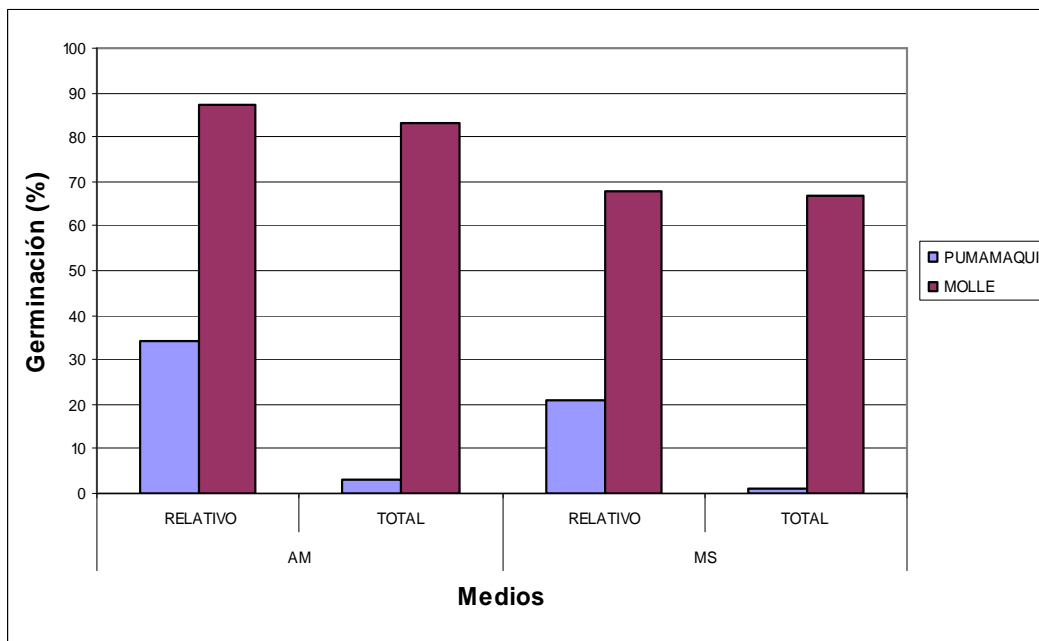


Figura 6. Gráfico comparativo de Porcentaje de germinación entre *Oreopanax sp* y *Schinus molle* y entre medios AM y MS a 23° C

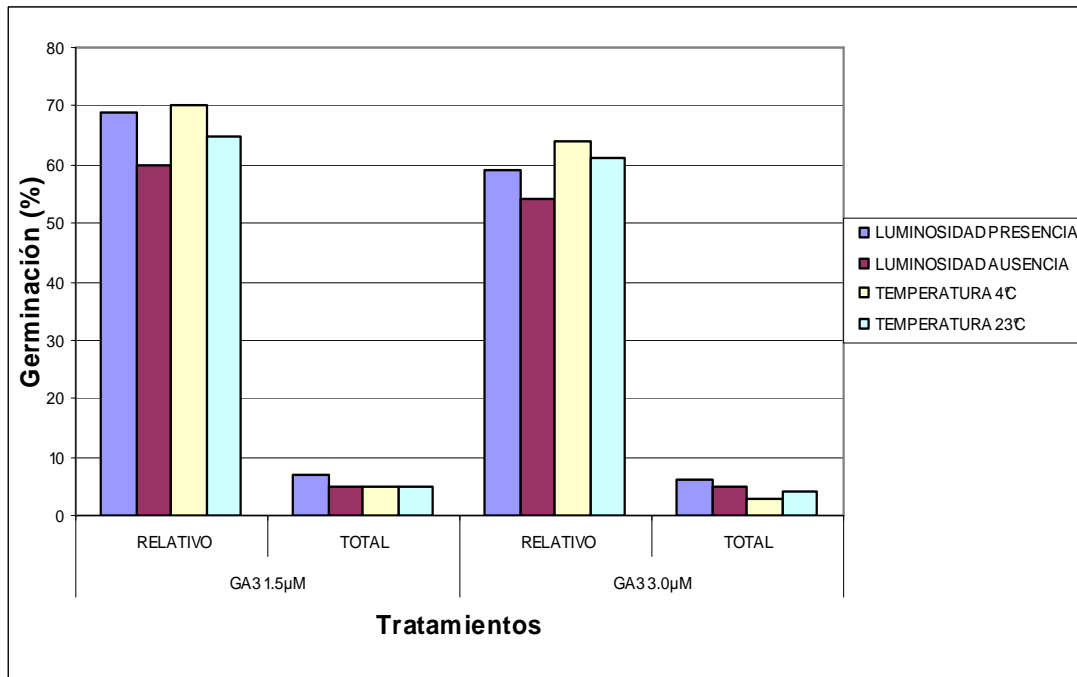


Figura 7. Gráfico comparativo de porcentaje de germinación de *Oreopanax sp* entre los medios AM más 1.5µM. GA₃ y AM más 3.0µM. GA para todos los tratamientos.

