

UCH-FC
DDC-B
C382
C.1

BANCOS DE SEMILLAS Y ESTRATEGIAS DE GERMINACIÓN EN *Phacelia secunda* J.F. Gmel (Hydrophyllaceae): VARIACIONES A LO LARGO DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN LOS ANDES DE CHILE CENTRAL (33°S)

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Por

LOHENGRIN ALEXIS CAVIERES GONZALEZ

Mayo, 1999

25 OCT 2000



Director de Tesis: Dr. Mary Kalin Arroyo

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

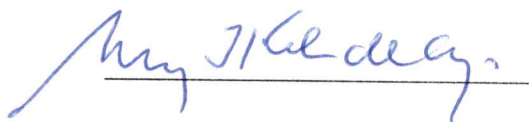
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

LOHENGRIN ALEXIS CAVIERES GONZÁLEZ

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Diciembre de 1998.

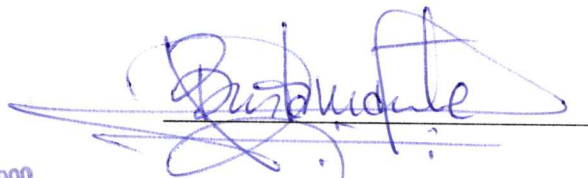
Director de Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo



Comisión de evaluación de tesis:

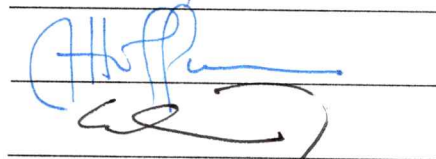
Dr. Ramiro Bustamante:



Dra. Gladys Fernández:

25 OCT 2000

Dra. Alicia Hoffmann:



Dra. Carolina Villagrán:



A Katuska, Ian y Pablo

a Luis y María

25 OCT 2000



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi esposa Katty, quien ha sido el mejor y más constante apoyo durante todos estos años. A mis hijos Ian y Pablo, que con su existencia iluminan y vigorizan mi vida, y que con su inocencia inspiran mi pasión por la naturaleza y sus misterios. A mis padres, Luis y María, que con mucho esfuerzo me brindaron las oportunidades que ellos no tuvieron, y que han sido mis mas fieles aliados cuando las cosas no marcharon como hubiese querido. Gracias por dejarme ser...

Gracias a la música por dejarme algo de tiempo para dedicarlo a las ciencias y a esta tesis...

A mi tutora Mary Kalin, que con sus retos y enojos, me enseñaron la virtud de la rigurosidad y perseverancia. A los miembros de mi comisión, en especial a Ramiro Bustamente por su profesionalismo en la corrección de esta tesis. A mis profesores Carolina Villagrán, Juan Armesto, Javier Simonetti y Rodrigo Medel por sus palabras de aliento.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de Botánica y Ecología terrestre de la Facultad de Ciencias, que siempre fueron un apoyo constante. En especial a Ana María Humaña, Alejandro Peñaloza, Pedro León, Hector Jiménez, Carolina Henríquez y Javier Figueroa, que contribuyeron no sólo con ayuda en la elaboración y la planificación del trabajo, sino también con una palabra de aliento y algunos merecidos retos. Al monito, al pipe, a la ceci, y el Juanca... a la popic, la leo, la gordi, y la flaca... a la Carmen y el Cuevas. A los que quieran sentirse parte de esto, también gracias.

Este estudio fue posible gracias al apoyo de la Fundación A.W. Mellon que financió parte de mis estudios de Doctorado y a la Cátedra Presidencial en Ciencias de Mary Kalin

Arroyo que me financió en las etapas finales de redacción de la tesis. A los proyectos Fondecyt 2950072 y 1950461 que financiaron la elaboración de la tesis. A la Red Latinoamericana de Botánica, que financió mi estadía en el Centro de Estudios Ecológicos de los Andes Tropicales (CIELAT), Mérida, Venezuela. Al centro de Sky Valle Nevado, en especial al Sr. Samuel Bahamondes, por su apoyo logístico en terreno y la cooperación en la supervisión de los experimentos.

A todos, muchas gracias

INDICE DE MATERIAS

Lista de Figuras	i
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Anexos.....	v
Resumen	vi
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Latencia	6
2. Condiciones de almacenamiento en el suelo.....	8
3. Selección de latencia en semillas y formación de BSPa lo largo de gradiente altitudinal . 8	
3.1 Fluctuaciones interanuales en producción de semillas y condiciones de germinación 10	
3.2 Perturbaciones temporal y espacialmente impredecibles	14
4. Planteamiento del problema	18
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y METODOS.....	25
1. Especie de estudio	25
2. Area de estudio.....	25
3. Clima general del área de estudio.....	35
4. Tamaño del banco de semillas.....	37
5. Colecta de semillas.....	38
6. Viabilidad de semillas	39
7. Experimentos recíprocos de entierro de semillas	39
7.1 Análisis de los datos	40
8. Germinación en laboratorio.....	42
8.1 Estratificación.....	42
8.2 Termoperíodo	43
8.3 Ensayos de germinación.....	43
8.4 Análisis de los datos	45
RESULTADOS	46
1. Tamaño del banco de semillas.....	46
2. Viabilidad inicial de semillas	46
3. Experimentos de entierros recíprocos.....	48
4. Germinación en ambientes comunes en laboratorio.....	55
4.1 Germinación sin estratificación.....	55
4.2 Germinación con estratificación.....	57

4.3 Efecto del termoperíodo	60
4.4 Efecto de la luz	62
DISCUSIÓN	65
1. Banco de semillas naturales.....	65
2. Variación altitudinal en la latencia y formación de BSP	66
3. Adaptación local.....	67
4. Factores que determinan la latencia en <i>Phacelia secunda</i>	72
REFERENCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelos gráficos de las tendencias altitudinales esperadas en la fluctuación del ambiente, la importancia de las perturbaciones en la germinación y reclutamiento, y las condiciones para el almacenamiento de semillas en el suelo.....17
- Figura 2. Esquema simplificado de un experimento de entierro recíproco (o cruzado). Las flechas indican el lugar donde son enterradas las semillas colectadas a una determinada altitud.....21
- Figura 3. Mapa de la zona de estudio, indicando los sitios (círculos negros) donde se realizaron las colectas y los entierros de semillas de *Phacelia secunda*.....26
- Figura 4. Fisionomía del bosque esclerófilo montano de Chile central, dominado por *Kageneckia angustifolia*, a 1.600 m s.n.m. en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca.....28
- Figura 5. *Phacelia secunda* creciendo en los espacios abiertos del bosque esclerófilo montano a 1.600 m s.n.m.....28
- Figura 6. Fisionomía del piso sub-andino de la vegetación andina de Chile central a 2.200 m s.n.m., dominado por arbustos achaparrados como *Acaena alpina*.....29
- Figura 7. *Phacelia secunda* creciendo en los espacios abiertos del matorral sub-andino a 2.200 m s.n.m.....29
- Figura 8: Variación altitudinal de la densidad promedio de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) en los Andes de Chile central (33°S). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de Mann-Whitney como *test a posteriori*.....30
- Figura 9. Variación altitudinal de la morfología de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S). a) Diámetro promedio (± 2 E.E.) de rosetas individuales de *Ph. secunda*. b) Número promedio de inflorescencias por individuos (± 2 E.E.) en rosetas de *Ph. secunda*. c) Altura promedio por sobre el nivel del suelo (± 2 E.E.) en inflorescencias de rosetas individuales de *P. secunda*.....31
- Figura 10. Fisionomía del piso andino inferior de la vegetación andina de Chile central, a 2.900 m s.n.m., dominado por plantas en cojín como *Laretia acaulis*.....33
- Figura 11. *Phacelia secunda* creciendo en el piso andino inferior a 2.900 m s.n.m.....33

- Figura 12. Fisionomía del piso andino superior o subnival de la vegetación andina de Chile central, a 3.400 m s.n.m., dominado por plantas en cojín como *Azorella monantha* y hierbas perennes como *Nassauvia spp.*.....34
- Figura 13. *Phacelia secunda* creciendo en el piso andino superior a 3.400 m s.n.m.34
- Figura 14 Esquema del procedimiento experimental utilizado en los entierros recíprocos de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes altitudes en los Andes mediterráneos de Chile central.....41
- Figura 15 Diagrama de flujo que representa la metodología empleada en los experimentos de germinación en laboratorio.....44
- Figura 16. Variación altitudinal del Banco de semillas de *Phacelia secunda* (número de semillas/m² ± 2 E.E.). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis).....47
- Figura 17. Variación altitudinal en semillas de *Phacelia secunda* que no germinaron después de permanecer un año enterradas. a) semillas enterradas en 1995. b) semillas enterradas en 1996. Los diferentes achurados corresponden a las diferentes altitudes en que fueron enterradas las semillas.....50
- Figura 18. Variación altitudinal en el porcentaje de viabilidad en semillas de *Phacelia secunda* que no germinaron después de un año de permanecer enterradas. a) Semillas enterradas en 1995. b) Semillas enterradas en 1996. Los diferentes achurados corresponden a las diferentes altitudes en que fueron enterradas las semillas.....53
- Figura 19. Porcentajes de germinación en dos regímenes térmicos (10°/5°C y 20°/10°C) de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes y mantenidas por 2 y 6 meses en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente en el laboratorio. Los diferentes achurados de las barras corresponden a presencia y ausencia de luz. Con 2 meses de almacenamiento las semillas no germinaron.....56
- Figura 20. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes y mantenidas por diferentes lapsos de tiempo en condiciones de estratificación húmeda (4°C-oscuridad). La germinación se realizó en presencia de luz.....58
- Figura 21. Efecto del tiempo de estratificación en el porcentaje de germinación en dos regímenes térmicos (10°/5° y 20°/10°) de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. La estratificación se realizó por 2 y 6 meses en condiciones húmedas a 4°C y oscuridad. La germinación es en presencia de luz. En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación.....61

- Figura 22. Efecto del régimen térmico ($10^{\circ}/5^{\circ}\text{C}$ y $20^{\circ}/10^{\circ}\text{C}$) en el porcentaje de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. a) semillas mantenidas por 2 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C -oscuridad). b) semillas mantenidas por 2 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C -oscuridad). La germinación es en presencia de luz. En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación.....63
- Figura 23. Efecto de la luz en el porcentaje de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. Las semillas fueron mantenidas por 2 y 6 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C -oscuridad). La germinación se realizó en dos régimen térmico ($10^{\circ}/5^{\circ}\text{C}$ y $20^{\circ}/10^{\circ}\text{C}$) En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación...64
- Figura 24. Variación altitudinal del grosor de la testa de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S).....76

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Viabilidad de semillas (promedio \pm 2 E.E.), sometidas a diferentes períodos de estratificación (meses). Viabilidad de las semillas (promedio \pm 2 E.E.), mantenidas por diferentes períodos de tiempo (meses) en condiciones de laboratorio (sin estratificación).....48
- Tabla 2. Tabla 2. ANOVA para determinar el efecto de la altitud en que se entierran semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S) en el porcentaje de semillas que permanecen intactas en el suelo después de 1 año de permanecer enterradas.....49
- Tabla 3. ANOVA para determinar el efecto de la procedencia de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S) sobre el porcentaje de semillas que permanecen sin germinar en el suelo después de 1 año.....51
- Tabla 4. ANOVA para determinar el efecto de la procedencia de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S) sobre la viabilidad de las semillas que permanecen sin germinar en el suelo después de 1 año.....54
- Tabla 5. Tabla ANOVA multifactorial para determinar los efectos del Tratamiento (con o sin estratificación), el Tiempo transcurrido (meses), Termoperíodo, la presencia de Luz y las respectivas interacciones, en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).....55
- Tabla 6. Valores de F calculados con un ANOVA trifactorial para determinar los efectos del tiempo sin estratificación, termoperíodo y la presencia de luz en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).....59
- Tabla 7. Valores de F calculados con un ANOVA trifactorial para determinar los efectos del tiempo de estratificación, termoperíodo y la presencia de luz en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).....59

LISTA DE ANEXOS

1

ANEXO: Variación altitudinal en la longevidad del banco de semillas

RESUMEN

La capacidad de crecer y reproducirse exitosamente en hábitats muy distintos en especies con amplia distribución se denomina "adaptación local". La capacidad de adaptación local de una especie puede estar mediada por dos grandes grupos de mecanismos: diferenciación genética y plasticidad fenotípica. *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Hydrophyllaceae) es una hierba perenne que habita en todo el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta el extremo sur de Sudamérica. En Chile, esta hierba presenta una extraordinaria amplitud tanto en su distribución latitudinal como altitudinal, habitando desde Parinacota (18°S) hasta Tierra del Fuego (54°S), y desde el nivel del mar hasta cerca del límite altitudinal de la vegetación andina (3.500 m). A diferencia de otras especies con amplia distribución en Chile, *P. secunda* se desarrolla exitosamente en climas muy diferentes como son el clima costero, el clima tipo mediterráneo del valle central y el clima altoandino. Considerando esta amplia distribución surge la interrogante si el éxito de esta especie en climas tan diversos es producto de una amplia plasticidad fenotípica o producto de la formación de poblaciones genéticamente diferenciadas y altamente adaptadas a las condiciones locales de cada ambiente en que se desarrolla. Esta tesis se centra en aspectos relacionados con el proceso de germinación de semillas de *P. secunda*, y su variación a lo largo de un gradiente altitudinal en los Andes de Chile central, entre los 1.600 y 3.400 m s.n.m. La revisión de modelos teóricos que han sido elaborados para estudiar bajo que condiciones la evolución de la latencia en semillas es ventajosa sugiere que la latencia y la formación de BS podría ser una estrategia seleccionada en ambientes de mayores altitudes. Si la latencia en las semillas y la consecuente formación de BS es un atributo de historia de vida seleccionado hacia mayores altitudes en las zonas alpinas, entonces

debería existir una tendencia a aumentar el grado de latencia en las semillas y formar BS más persistentes a medida que las semillas provienen de mayores altitudes. Esto constituiría una adaptación al ambiente. Sin embargo, es necesario a su vez determinar si esta adaptación local representa una plasticidad fenotípica de la especie en relación a la capacidad de formar distintos tipos de BS o son resultado de diferenciaciones poblacionales con base genética. Existen antecedentes que sugieren bajas probabilidades de intercambio genético entre poblaciones de *Phacelia secunda* ubicadas a diferentes altitudes, por lo que existiría un alto grado de diferenciación genética entre poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal. Esto debería expresarse como respuestas de germinación y de latencia independientes del sitio en que son enterradas las semillas y de las condiciones en que son germinadas en laboratorio. Para abordar este problema se utilizaron dos acercamientos; uno fue enterrar en forma cruzada semillas provenientes de diferentes altitudes en sus ambientes naturales y observar su germinación después de un año de permanecer enterradas. En forma complementaria, se realizaron experimentos de germinación de semillas de distintos orígenes en ambientes comunes en laboratorio. Para esto se simularon algunas condiciones ambientales que ocurren en ambos extremos del gradiente estudiado y se registró la germinación de semillas provenientes de distintas altitudes. Los experimentos de germinación en laboratorio permiten a su vez explorar algunos factores que puedan estar involucrados en la latencia de semillas de *P. secunda*.

Se encontró que en *Phacelia secunda*, existe una marcada tendencia a que las semillas tengan una mayor latencia hacia mayores altitudes. Esto permite la formación de BS más persistentes hacia mayores altitudes. Esta diferenciación en la capacidad de formar BSP sería una adaptación a las mayores fluctuaciones ambientales que ocurren con la altitud, representando una adaptación local de las poblaciones a su ambiente. Esta adaptación local

estaría originada por una diferenciación genética entre las poblaciones de *Phacelia secunda* que crecen a diferentes altitudes. La exploración de los factores involucrados en la variación altitudinal en la latencia de las semillas sugieren que habría un aumento en la latencia innata de las semillas determinada por restricciones físicas y químicas de la testa. La amplia distribución que presenta *Phacelia secunda*, y su capacidad de habitar ambientes muy contrastantes, se debería a la capacidad de formar poblaciones diferenciadas genéticamente y localmente adaptadas a su medio ambiente, al menos en las respuestas de germinación y capacidad de formar BS.

ABSTRACT

Local adaptation could be defined as a successful grow and reproduction in very different habitats in species with wide distributional range. Local adaptation can be achieved by two mechanisms: genetic differentiation and phenotypic plasticity. *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Hydrophyllaceae) is a perennial herb inhabiting the Americas, from the south of the United States to southern South America. This herb shows an extraordinary latitudinal and altitudinal range in Chile, inhabiting from Parinacota (18°S) to Tierra del Fuego (54°S), and from the sea up to the altitudinal limit of Andean vegetation (3.500 m). Throughout this wide altitudinal distribution, *P. secunda* grows in very different climate zones including coastal, mediterranean-type and the high-alpine climates. Taking into account this wide distribution arise the question if the success of this species in diverse climates resulted from a wide phenotypic plasticity or due to the formation of populations genetically differentiated and highly adapted to the local conditions of each environment in which species developed. This thesis is centered in aspects related with the process of seed germination in *P. secunda*, and its variation along an altitudinal gradient in Andes of central Chile, between 1600 and 3400 m a.s.l. Theoretical models suggest that the formation of seed bank (SB) could be a selective strategy with the increase in elevation in alpine environments. If seed dormancy, and the consequent formation of SB, is a life history attribute selected in alpine zones, then a tendency should exist to increase the degree of seed dormancy and form more persistent SB with increasing elevation. This strategy might constitute an adaptation to the environment. However, it is necessary determine if this local adaptation represents a phenotypic plasticity of the species in relation to its capacity to form different types of SB, or there are differentiation with a genetic base among populations. Previous studies suggest low probabilities of genetic exchange between populations of *Phacelia secunda*

located at different elevations, thus high genetic differentiation between populations along an altitudinal gradient might exist. This could be expressed as seed germination responses and dormancy patterns independent of the site in which seeds were buried and of the laboratory conditions in which they were germinated. In order to solve this problem, two approaches were used, one was reciprocal burial of seeds from different elevations in their natural environments and observe their germination after a year of burial. In complementary form, germination experiments with seeds from different elevations in common environments in laboratory were performed. Some environmental conditions that prevail in the extremes of the altitudinal gradient studied were simulated, and germination of seeds from different elevations was registered. Additionally, germination in laboratory conditions allow the exploration of some factors that could be involved in dormancy of *P. secunda* seeds.

A strong tendency to higher seed dormancy toward higher elevations was registered in *Phacelia secunda*. This allows the formation of more persistent SB with increasing elevations. This differentiation in the capacity to form PSB would be an adaptation to higher fluctuations in environment with increasing elevation, representing a local adaptation. This local adaptation is originated by a genetic differentiation between *Phacelia secunda* populations that grow at different elevations. The study of factors involved in the altitudinal variation seed dormancy suggests that there seems to be an increase in the innate dormancy determined by physical and chemical restrictions of the testa. The wide altitudinal distribution of *Phacelia secunda* in central Chile, and their capacity to occupy very contrasting environments, seems to be determined by its capacity to form genetically differentiated and locally adapted populations, as suggested by its seed germination response and the capacity to form SB.

INTRODUCCIÓN

Existen especies que presentan un amplio rango de distribución, creciendo y desarrollándose en hábitats muy diferentes unos de otros. Esta capacidad de crecer y reproducirse exitosamente en hábitats muy distintos se denomina “adaptación local” (Bradshaw 1989). La capacidad de adaptación local de una misma especie para crecer y reproducirse en hábitats diferentes puede estar mediada por dos grandes grupos de mecanismos: *diferenciación genética* y *plasticidad fenotípica*.

La diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie se produce cuando el flujo de genes entre las poblaciones es bajo, de modo que dentro de cada población comienza un proceso de fijación de determinados alelos. Los alelos que se fijan en una determinada población serían aquellos que le confieren la mayor adecuación a los individuos en las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan (Roff 1994). El reducido flujo génico entre poblaciones facilita entonces la formación de genotipos altamente adaptados a las condiciones locales en el cual crecen los individuos. Las plantas son organismos sésiles, donde el intercambio genético, que se produce a través del polen y las semillas, es espacialmente muy limitado (Sork *et al.* 1993). Esto facilita la diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie, aún en distancias muy cortas, lo cual ha sido documentado en poblaciones de plantas (Briggs & Walter 1997).

La plasticidad fenotípica en cambio, se define como la capacidad de un genotipo de expresar distintos fenotipos, de acuerdo al tipo de ambiente en que se encuentra (Schlichting 1986). La respuesta plástica emerge como un cambio en la secuencia de desarrollo típica de un carácter debido a la interacción del genotipo del organismo con el ambiente en que se desarrolla.

La capacidad de muchas especies de plantas de modificar su morfología y fisiología de acuerdo a las condiciones del ambiente ha sido vista como una plasticidad fenotípica, lo cual se ha interpretado como variaciones adaptativas (Schlichting 1986). Sin embargo, modificaciones morfológicas o fisiológicas de un individuo en respuesta a un cambio en el ambiente no necesariamente traen como consecuencia un aumento en la adecuación biológica (Via 1993, Via *et al.* 1995). Algunos autores postulan que la plasticidad es un carácter en sí y que por lo tanto estaría sujeta a selección, proponiéndose incluso la presencia de genes para la presencia de plasticidad (Bradshaw 1989, Schlichting 1986).

Dentro del ciclo de vida de las plantas, la germinación de semillas es el paso entre la unidad de dispersión (semilla) a un individuo joven (plántula). El estadio de plántula es el más vulnerable dentro del ciclo de vida de las plantas (Harper 1977). [por lo tanto *dónde* y *cuándo* se produce la germinación de semillas son claves en determinar las probabilidades de éxito en el reclutamiento de las plántulas.] Según Angevine & Chabot (1979) el proceso de germinación de semillas, al ser un paso clave dentro del ciclo reproductivo de una planta, es objeto de selección y por lo tanto, los mecanismos involucrados en determinar *dónde* y *cuándo* germinar las semillas deberían cambiar de acuerdo a los riesgos ambientales asociados a la sobrevivencia de las plántulas. Esto sugiere que las especies que son capaces de crecer en una diversidad de ambientes tendrían la capacidad de “adaptar localmente” su germinación a las condiciones ambientales en que crecen. Existe mucha evidencia que demuestra que las variaciones en los patrones de germinación dentro de una misma especie se correlacionan con cambios en el ambiente (van der Vegte 1978, Barclay & Crawford 1984, Probert *et al.* 1985, Borghetti *et al.* 1989, Inoue & Washitani 1989, Meyer *et al.*, 1989, 1990, 1997, Meyer & Monsen 1991, Meyer & Kitchen 1994, Schütz & Milberg 1997), apoyando la tesis de Angevine &

Chabot (1979). Sin embargo, también existen evidencias contrarias a esta conclusión (e.g., Thompson *et al.* 1979, Baskin & Baskin 1993) sugiriendo que las estrategias de germinación serían un rasgo muy conservador.

La germinación de semillas ha sido un proceso muy estudiado, detectándose una gran variedad de mecanismos fisiológicos involucrados en dicho proceso (Bewley & Black 1982, Bradbeer 1988). En términos ecológicos los aspectos importantes en el proceso de germinación serían aquellos involucrados en determinar dónde y cuándo germinar, de modo de asegurar mayores probabilidades de sobrevivencia para las plántulas emergentes.

Existen varias razones por las cuales se esperaría que las semillas germinen tan pronto sean dispersadas de la planta madre. La germinación rápida disminuye el tiempo generacional incrementando la tasa intrínseca de crecimiento poblacional sin un incremento en la fecundidad. Mientras menos tiempo pasen las semillas en el suelo, menores son las probabilidades de que sean consumidas por depredadores. Las semillas que germinan antes tienen una considerable ventaja sobre las semillas que germinan en forma más tardía, especialmente cuando la densidad de plántulas es alta y la competencia se torna más fuerte (Angevine & Chabot 1979). Por lo tanto cuando se pospone la germinación de las semillas se corren riesgos al menos en los tres aspectos mencionados, de modo que el retardo de la germinación debería ser una estrategia que compensa estos riesgos a través de asegurar mayores probabilidades de sobrevivencia de las plántulas emergentes.

Cuando la semilla es dispersada y no germina inmediatamente permanece en el suelo formando un "banco de semillas" (BS) (Fenner 1985). De acuerdo al tiempo de permanencia de las semillas en el suelo los BS se clasifican en transitorios o persistentes (Thompson & Grime 1979). *Bancos de semillas transitorios* (BST) son aquellos en que las semillas germinan el mismo año en

que son producidas. Es decir, si las semillas son dispersadas entre fines del verano y comienzos de otoño, estas germinan en forma inmediata o durante la primavera inmediatamente siguiente. *Bancos de semillas persistentes* (BSP) en cambio, son aquellos en que una proporción de las semillas germina durante el año de producción, quedando un remanente de semillas viables que germinan bajo condiciones naturales al menos un año después de su producción. La mantención de una fracción de semillas latentes que no germinan en el año en que las semillas son producidas, pudiendo hacerlo en temporadas posteriores, permite a una especie explorar la variabilidad del ambiente en eje un temporal. Esta "exploración" temporal de las condiciones ambientales ha sido llamada *dispersión en el tiempo* (Venable & Lawlor 1980).

Los BS, en particular los BSP, juegan un rol importante en la dinámica de regeneración en varias comunidades de plantas (Grime 1979, Grime & Hillier 1992, Thompson 1992), ya que actúa como fuente de propágulos para el reclutamiento especialmente en ambientes fluctuantes. Se ha propuesto además que los BSP, al almacenar semillas producidas en diferentes temporadas, podrían actuar como una fuente de variabilidad genética (Templeton & Levin 1979, Baker 1989, Levin 1990), permitiendo la estabilidad a largo plazo en poblaciones de especies con poco flujo de polen y/o baja dispersión espacial de semillas. Una serie de estudios han demostrado cualitativa y cuantitativamente diferenciación genética entre las semillas del banco y las semillas recientemente producidas en varias especies que forman BSP (McGraw *et al.* 1991, Bennington *et al.* 1991, Vavrek *et al.* 1991, McGraw 1993, Tonsor *et al.* 1993, Cabin 1996, McCue & Holtsford 1998, Cabin *et al.* 1998).

La capacidad de las semillas de explorar temporalmente las condiciones bióticas y abióticas a través de un BSP depende de: i) la existencia de mecanismos de latencia (o dormancia) que impiden la germinación inmediata de la semilla y ii) condiciones adecuadas de almacenamiento en el suelo,

de modo que las semillas se mantengan vivas mientras se encuentran en estado de latencia.

1. Latencia

Se define latencia de la semilla como la incapacidad de una semilla viable para germinar bajo ciertas condiciones ambientales que posteriormente permiten la germinación de la semilla cuando el estado restrictivo ha terminado, ya sea por medios naturales o artificiales (Bradbeer 1988). Se definen dos tipos de latencia en las semillas (Bewley & Black 1982, Bradbeer 1988): *Latencia forzada* y *Latencia innata*.

Latencia forzada es la incapacidad de una semilla para germinar debido a una restricción ambiental, determinada generalmente, por la falta de algún factor importante para realizar la germinación como puede ser la ausencia de agua y oxígeno. Si las semillas no son expuestas a condiciones de temperaturas adecuadas, en muchos casos tampoco ocurre germinación. Otro ejemplo clásico de latencia forzada ocurre en aquellas semillas que requieren de la presencia de luz para germinar (Fenner 1985). Si las semillas no son expuestas a la luz, aunque se encuentren bajo condiciones adecuadas de oxígeno, humedad y temperatura, no habrá germinación. En estos casos, la ausencia de un factor ambiental está determinando la presencia de latencia en las semillas.

Latencia innata es la incapacidad de una semilla para germinar debido a factores intrínsecos de la semilla, tales como la inmadurez del embrión o la presencia de compuestos en el interior del embrión que inhiben la germinación (Bewley & Black 1982). En el caso de la inmadurez del embrión sólo se requiere de tiempo para que el embrión madure y la semilla germine. En el caso en que hay compuestos inhibidores en el embrión, como la presencia de Acido Abscísico (ABA), se ha establecido que se requiere que las semillas pasen por un período de frío (estratificación) para

germinar. Se supone que durante la estratificación en frío se produciría la activación de una serie de genes y complejos proteicos relacionados con la síntesis de giberelinas que inactivan el ABA (Bradbeer 1988). Investigaciones recientes sugieren que la activación de los complejos proteicos durante la estratificación estaría mediada por una enzima (NAD kinasa) modulada por Calcio/Calmodulina. Las bajas temperaturas activarían bombas que aumentarían la concentración de Calcio citosólico, lo que produciría la activación de la enzima NAD-k, la que a su vez activaría los complejos proteicos involucrados en la síntesis de giberelinas (Ross 1996).

La latencia innata también puede estar originada en las envolturas que rodean al embrión (generalmente la testa de la semilla), reconociéndose a su vez dos tipos; una de origen mecánico o físico y otra de origen químico. En la restricción mecánica, la testa puede ser impermeable al agua o al oxígeno, de modo que no permite el paso de estos elementos al embrión. Para terminar este tipo de latencia es necesario la fracturación de la testa de modo de permitir el paso de estos elementos al embrión. Otro tipo de restricción mecánica ocurre cuando la testa es tan dura que impide el crecimiento del embrión. En esta caso también se requiere del fracturamiento de la testa para permitir la germinación. La restricción mecánica es común en semillas de especies de muchas familias (e.g., Anacardiaceae, Rhamnaceae, Leguminosae (Baskin & Baskin 1989)) y el fracturamiento de las testas en forma natural ocurriría por el paso de las semillas por el tracto digestivo de animales, la degradación de la testa por hongos, abrasión del suelo, criofracturación, etc.

En la restricción química, existen en la testa de la semilla compuestos que inhiben la germinación. Para terminar con este tipo de latencia se requiere que los compuestos inhibidores sean liberados de la testa ya sea por la fracturación de ésta o por lavado de estos compuestos con agua. Este tipo de latencia es común en especies que habitan zonas desérticas donde las lluvias son

esporádicas (Bewley & Black 1982).

2. Condiciones de almacenamiento en el suelo

La persistencia de las semillas en el suelo de un ambiente determinado depende, entre otras cosas, de las condiciones de almacenamiento que ofrece el ambiente (Silvertown 1982). Los principales factores que afectan la persistencia de las semillas en el suelo son: la depredación de semillas y el ataque de patógenos (Simpson *et al.* 1989). El almacenamiento de semillas en el suelo, sería particularmente favorecido en ambientes con bajos niveles de depredación de semillas y bajos niveles de ataque de patógenos (McGraw & Vavrek 1989). Las zonas de clima frío son particularmente favorables para la mantención de semillas viables en el suelo (McGraw & Vavrek 1989). Por un lado, producto de la rigurosidad climática del ambiente la abundancia de depredadores de semillas y de hongos patógenos es baja. Por otro lado, las bajas temperaturas del ambiente determinan una baja tasa metabólica en el embrión y otros tejidos internos de las semillas lo que produce una lenta tasa de consumo de las reservas nutricionales de las semillas (Billings & Mooney 1968), favoreciendo la mantención de semillas viables en el suelo por prolongados períodos de tiempo (McGraw & Vavrek 1989, Murdoch & Ellis 1992, Probert 1992).

3. Selección de latencia en semillas y formación de BSP a lo largo de un gradiente altitudinal

Los gradientes altitudinales se caracterizan por condiciones climáticas que se tornan progresivamente más estresantes para el desarrollo de la biota hacia mayores altitudes (Bliss 1971, 1985). Por otro lado estos cambios ambientales ocurren en distancias relativamente cortas.

A comienzos de la década de los 70's algunos autores postularon que producto de la

rigurosidad climática, en ambientes árticos y alpinos la reproducción vegetativa y la producción de semillas a través de apomixis serían más importantes que la reproducción sexual (Bliss 1971, Billings 1974a, 1974b). Considerando además que los individuos que habitan estas zonas presentan una alta longevidad, Archibold (1984) postuló que la *mantención de grandes cantidades de reserva de semillas en el suelo no sería necesaria*. Sin embargo, numerosos estudios han documentado la presencia de bancos de semillas en el suelo de muchas zonas de clima frío como las zonas árticas y alpinas (McGraw 1980, Freedman *et al.* 1982, Fox 1983, Roach 1983, Archibold 1984, McGraw 1987, Miller & Cummins 1987, Morin & Payette 1988, Guariguata & Azocar 1988, McGraw & Vavrek 1989, Ebersole 1989, Chambers *et al.* 1990, Spence 1990, Thompson 1992, Ingersoll & Wilson 1993, Chambers 1993, Diemer & Prock 1993, Onipchenko *et al.* 1998, Arroyo *et al.* 1999).

Como se mencionó con anterioridad, las zonas de clima frío son particularmente favorables para la mantención de semillas viables en el suelo, favoreciendo la mantención de semillas viables en el suelo por prolongados períodos de tiempo (McGraw & Vavrek 1989, Murdoch & Ellis 1992, Probert 1992). Por otro lado, Barclay & Crawford (1984), han sugerido que producto de la corta duración de la estación favorable, las semillas producidas en ambientes de alta montaña, no logran su completa madurez antes de ser dispersadas, y por lo tanto, a pesar de que las semillas son viables, estas no tienen la capacidad de germinar en forma inmediata. De lo anterior se podría sugerir que los BS documentados en zonas alpinas a partir de muestras de suelo, son simplemente el reflejo de un acumulo de semillás que no poseen la madurez fisiológica necesaria para germinar en el año de producción y cuya persistencia en el tiempo se ve potenciada por las condiciones del suelo que favorecen una longevidad prolongada de las semillas en el suelo.

Una hipótesis alternativa sería que la latencia representa un rasgo de historia de vida que ha

sido seleccionado a medida que el ambiente es de mayor altitud. Para esto se requiere que la presencia de latencia en las semillas de un individuo represente una ventaja comparativa frente a las semillas que no tienen latencia. Teóricamente se espera que las semillas germinen tan pronto como puedan ya que si permanecen latentes en el suelo corren el riesgo de morir sin antes germinar (Rees 1996). Esto impone un costo a la evolución de la latencia en semillas y para que sea seleccionada las ventajas de presentar latencia deben sobrecompensar el riesgo de muerte de la semilla antes de que germine. A continuación se discuten modelos teóricos que han sido elaborados para estudiar bajo que condiciones la evolución de la latencia en semillas es ventajosa, y *su aplicación a gradientes altitudinales hacia zonas de alta montaña.*

3.1 Fluctuaciones interanuales en producción de semillas y condiciones de germinación

En una serie de modelos teóricos, generados a partir de los pioneros artículos de Cohen (1966, 1967) se sugiere que la latencia de semillas y la formación de BSP serían favorecidas cuando las condiciones para germinación y producción de semillas son fluctuantes entre años. (Venable & Lawlor 1980, Brown & Venable 1986, Klinkhamer *et al.* 1987, Venable & Brown 1988, Venable 1989, Cohen & Levin 1991, Rees 1994, 1996) Una especie que forma BSP podría maximizar su adecuación al eliminar los riesgos de una germinación fallida en años en que las condiciones para la germinación no aseguran un reclutamiento exitoso (“Bet-hedging strategy” Phillipi 1993a, 1993b). Un ejemplo clásico de esta estrategia son los BSP que forman especies anuales en los desiertos en respuesta a la impredecibilidad de las precipitaciones en estos ambientes (Venable & Brown 1988).

Acoplado a la fluctuación en las condiciones de germinación, si la producción de semillas varía entre años, los individuos de una especie podrían maximizar su adecuación biológica

manteniendo algunas semillas en un BSP, las cuales podrían germinar en años en que las condiciones para la germinación son buenas pero la producción de semillas ha sido baja o nula (Venable 1989, Rees 1994).

Considerando el modelo original de Cohen (1966):

$$W = \prod (s(1-G) + Y_i G)^{P_i}$$

Donde:

W: es la fracción óptima de germinación de semillas en un ambiente fluctuante

s: es la tasa de sobrevivencia de las semillas latentes en el BS

G: es la proporción de semillas que germina en un año i (año bueno para la germinación)

P_i: es la probabilidad de ocurrencia del año i

Y_i: es el promedio de la producción de semillas por semilla germinada en un año tipo i

En este modelo es posible apreciar que, la fracción óptima de germinación (W) es una función creciente de la probabilidad de años buenos para la germinación y producción de semillas (año i). Por lo tanto en una especie que se desarrolle simultáneamente en ambientes con diferentes probabilidades de ocurrencia de años buenos para la germinación y producción de semillas, debería presentar diferencias en la fracción óptima de germinación entre los diferentes ambientes. En otras palabras, *en una especie que se distribuya a lo largo de un gradiente de variabilidad* en las condiciones de germinación y producción de semillas, a medida que los factores del ambiente que afectan a la germinación y producción de semillas se tornen más variables, una mayor proporción de las semillas producidas presentarían latencia pudiendo formar un BSP (Philippi 1993a, 1993b).

A la fecha no existen estudios que aborden específicamente el problema de cuan fluctuantes se tornan los ambientes ha medida que se asciende en altitud. Dentro de los cambios ambientales que ocurren con la altitud, uno de los más importantes es la duración de la estación de crecimiento (Galen & Stanton 1995). En ambientes de altitudes bajas la duración de la estación de crecimiento corresponde a la duración de las estaciones de primavera y verano, sin embargo, en ambientes alpinos está determinada por la duración del período libre de nieve (Galen & Stanton 1993). Se ha documentado que variaciones interanuales relativamente modestas en la fecha en que se derrite la nieve produce grandes fluctuaciones en la duración del período favorable para el crecimiento (Walker et al. 1994). Esta variación, no sólo afecta la productividad total del ecosistema (Scott & Billings 1964) o la distribución de algunas especies (Bell & Bliss 1979), sino que además puede tener efectos en una serie de parámetros reproductivos en las plantas. Galen & Stanton (1993) demuestran que en Colorado, variaciones de 12 días en el tiempo en que se derrite la nieve conllevan a variaciones del orden del 30% en el período disponible para el crecimiento y maduración de semillas de *Ranunculus odoneus*. Las fluctuaciones documentadas por Galen & Stanton (1993) estarían dentro del rango de variación entre años en la longitud de la estación de crecimiento observada en otros hábitats árticos y alpinos (Billings & Bliss 1959, Foster 1989, Galen & Stanton 1991). Galen & Stanton (1991) y Stanton & Galen (1997) demuestran que en *Ranunculus odoneus* la duración del período de crecimiento es fundamental en la emergencia y sobrevivencia de plántulas. En años donde la duración del período libre de nieve es más corta, producto de un derretimiento tardío de la cubierta de nieve, la emergencia de plántulas y la sobrevivencia de las mismas es muy baja, llegando a ser incluso nula en algunos años. Kudo (1991) estudiando durante 3 años la fenología de floración y producción de semillas entre los 1.790 a 1.910 m.s.n.m. en la zona norte de Japón (45°N), encontró

que fluctuaciones de hasta un mes en la duración de la cubierta de nieve entre un año y otro provocan variaciones en la reproducción de muchas especies. A modo de ejemplo, algunas especies no florecieron en aquellos años donde la duración del período libre de nieve era más corta (e.g., *Vaccinium vitis-idaea*, *V. ovalifolium*, *Rhododendron aureum*, *Phyllodoce caerulea*, *Ph. aleutica*, *Harrimanella stelleriana* y *Deschampsia flexuosa*), mientras que otras especies no producían semillas maduras en años donde la cubierta de nieve era más prolongada (e.g., *Sieversia pentapetala*, *Peucedanum multivittatum*, *Veronica stelleri*, *Solidago virga-aurea*, *Gentiana nipponica*, *Carex flavocuspis* y *Juncus beringensis*). Marchand & Roach (1980) en dos años de muestreo detectaron una variación interanual en la producción de semillas desde 0 a 416 semillas/m² en *Arenaria borealis*, *A. Groenlandica*, *Diapensa lapponica* y *Juncus trifidus* en la zona alpina de las White Mountains. Chambers (1989) en un estudio de 4 años de duración documenta variaciones interanuales significativas (63-72%) en el porcentaje de semillas maduras en dos especies de gramíneas de las Rocky Mountains, sugiriendo que dichas variaciones en la producción de semillas se deberían a fluctuaciones interanuales en las condiciones ambientales, en particular a las temperaturas del suelo y el aire y a la fecha del derretimiento de la nieve.

La duración de la cubierta de nieve depende de la cantidad de nieve caída durante el invierno y de las temperaturas de la época invernal. Walker *et al.* (1994) analizando datos climáticos registrados durante 9 años (1982-1990) a 3.650 m en Niwot Ridge, Colorado, destaca que la precipitación invernal puede variar hasta 1.5 veces entre años consecutivos (desde 764 mm en 1985 hasta 1120 mm en 1984), mientras que un estimador de la temperatura (total annual thawing-degree days) puede variar hasta 1.6 veces. De su análisis Walker *et al.* (1994) concluyen que la duración de la estación de crecimiento en las zonas alpinas es altamente fluctuante entre años, no así en zonas no

alpinas de menor altitud donde la duración de la estación de crecimiento no está restringida por la presencia de nieve. Wagner & Reichegger (1997) documentan que en los Alpes Austriacos, a 2.247 m las fluctuaciones interanuales en la duración de la estación de crecimiento son mayores que a 527 m. Miller & Cummins (1987) en un detallado estudio de 12 años en *Calluna vulgaris*, un arbusto polinizado bióticamente, en las zonas montañosas de Inglaterra, encuentran que en poblaciones a mayor altitud hay una mayor variación interanual (de hasta un 100%) en la producción de semillas lo que estaría relacionado a la mayor fluctuación interanual en la duración de la estación de crecimiento hacia mayores altitudes. En consecuencia, a lo largo de un gradiente altitudinal existiría un gradiente de mayores fluctuaciones interanuales en la duración de la estación de crecimiento hacia mayores altitudes, lo cual produce ambientes altamente fluctuante tanto para las condiciones de germinación como para la producción de semillas.

3.2 Perturbaciones temporal y espacialmente impredecibles

Se ha propuesto que la latencia podría ser seleccionada en hábitats donde las perturbaciones favorecen el proceso de reclutamiento (Grime 1979). Este modelo supone que las perturbaciones: i) crean nuevas condiciones que favorecen un reclutamiento exitoso de nuevos individuos en la población, y ii) son temporal y espacialmente impredecibles. Si una semilla es capaz de esperar viable en el suelo a que se generen condiciones adecuadas para el desarrollo post-germinación, entonces tendrá mayores posibilidades de reclutar en comparación a una semilla que germina en forma inmediata en un sitio desfavorable (Rees 1996). Este modelo es sustentado por semillas de especies arbóreas tropicales que requieren de luz para germinar (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia 1996), y por lo tanto sólo germinan cuando hay formación de un claro al interior del bosque. Como la

formación de un claro es un proceso temporal y espacialmente impredecible (Grime 1979), la presencia de una latencia (a través de requerimientos de luz) en especies sombra intolerantes permite a los nuevos individuos "esperar" la formación de un sitio adecuado para el establecimiento.

En ambientes árticos y alpinos, las perturbaciones naturales son muy variadas tanto en magnitud como en frecuencia (McGraw & Vavrek 1989). El proceso de congelamiento/derretimiento del agua en el suelo es el principal factor generador de perturbaciones en este tipo de ecosistemas (Fox 1981). Estas van desde las perturbaciones muy locales y de baja intensidad como la formación de acículas de hielo, hasta perturbaciones de gran escala y devastadoras como las avalanchas de nieve o barro.

En una escala anual, en las zonas alpinas el suelo sufre un período de congelamiento cuando está cubierto por la nieve durante el invierno, para luego descongelarse cuando comienza la primavera. Este proceso es recurrente todos los años permitiendo la presencia de agua en el suelo, que es fundamental para los procesos de criopedogénesis. Dentro del período libre de nieve, el agua contenida en el suelo puede congelarse durante la noche para luego derretirse durante el día. El proceso de congelamiento/descongelamiento día tras día produce la fracturación del suelo y la exposición de capas más profundas del mismo, fenómeno conocido como *crioturbación* (Johnson & Billings 1962). Se ha demostrado que la frecuencia de crioturbación está asociada a la estabilidad del sustrato y a la formación de diferentes tipos de suelos. Por ejemplo, cuando las crioturbaciones son muy frecuentes el material criopedogénico producido es arena y en consecuencia el sustrato se torna altamente inestable. En contraste cuando, cuando las crioturbaciones son menos frecuentes, el material producido es arcilla produciendo sustratos más estables. Una serie de estudios han documentado cambios en el tipo de vegetación de zonas alpinas en relación a la frecuencia de

crioturbaciones (Johnson & Billings 1962, Bryan & Scheinberg 1970, Belski & Del Moral 1982, Komárková 1993). El proceso de crioturbación depende de la existencia de un ciclo día/noche de temperaturas congelantes/descongelantes, lo cual es más frecuente a medida que se aumenta la altitud. En consecuencia, a lo largo de un gradiente altitudinal hay un gradiente de perturbaciones asociadas a la crioturbación que aumenta con la altitud.

Tanto en zonas árticas como alpinas, se ha demostrado que los sitios perturbados constituyen mejores ambientes para el establecimiento y crecimiento de plántulas que los sitios no perturbados (Chapin & Chapin 1980, McGraw & Shaver 1982, McGraw & Vavrek 1989, Chamber *et al.* 1990). Las perturbaciones (como la crioturbación) remueven el suelo y parte de la vegetación produciendo cambios en la estructura del suelo que resultan en condiciones relativamente más fértiles que favorecen el reclutamiento (Chapin & Bloom 1976, Matson & Vitousek 1981, McGraw & Vavrek 1989, Chambers *et al.* 1990). Una semilla que es capaz de esperar viable en el suelo a que se generen crioturbaciones que mejoran la calidad del sitio tiene mayores posibilidades de un reclutamiento exitoso que una semilla que germina en forma inmediata en un sitio desfavorable. Bajo estas condiciones, la latencia en las semillas podría ser un rasgo de historia de vida que podría ser seleccionado en ambientes de mayores altitudes.

Considerando entonces que en un gradiente altitudinal hacia zonas de alta montaña las fluctuaciones en las condiciones climáticas que afectarían tanto las condiciones para la germinación de semillas y producción de semillas y la impredecibilidad de las perturbaciones naturales aumentan con la altitud (Fig. 1), es posible sugerir que la latencia de semillas sería una estrategia de historia de vida seleccionada en ambientes de mayor altitud.

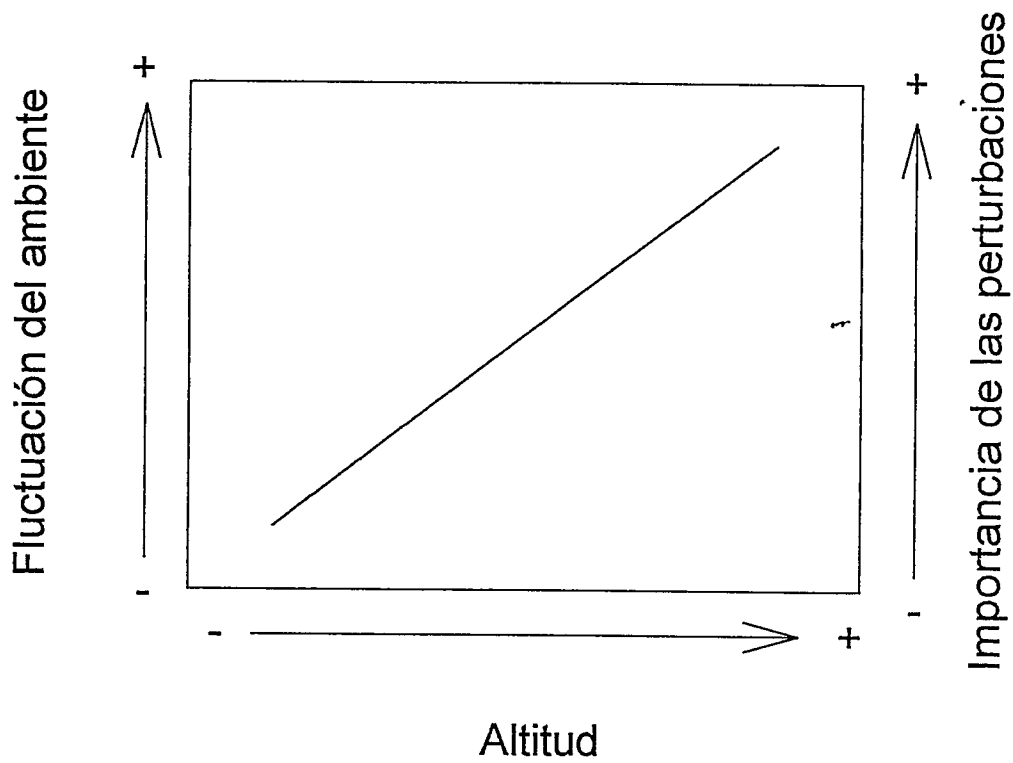


Figura 1. Modelo gráfico de las tendencias altitudinales esperadas en la fluctuación del ambiente y la importancia de las perturbaciones en la germinación de semillas y reclutamiento de plántulas.

4. Planteamiento del problema

Phacelia secunda J.F. Gmel. (Hydrophyllaceae) es una hierba perenne que habita en todo el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta el extremo sur de Sudamérica (Deginani 1982). En Chile esta hierba presenta una extraordinaria amplitud tanto en su distribución latitudinal como altitudinal, habitando desde Parinacota (18°S) hasta Tierra del Fuego (54°S), y desde el nivel del mar hasta cerca del límite altitudinal de la vegetación andina (3.500 m). En Chile, una distribución tan amplia como esta sólo es conocida para *Deschampsia antarctica* Desv. (Graminae) y *Colobanthus quitensis* (H.B.K.) Bartl. (Caryophyllaceae) que se encuentran a lo largo de toda la cordillera de los Andes hasta la Antártica. A diferencia de las otras especies con amplia distribución en Chile, *P. secunda* se desarrolla exitosamente en climas muy diferentes como son el clima costero, el clima tipo mediterráneo del valle central y el clima alto-andino. En Argentina, *P. secunda* también presenta una amplia distribución tanto altitudinal como latitudinal, habitando desde Jujuy hasta Tierra del Fuego y desde el mar a la cordillera de los Andes (Deginani 1982). Considerando esta amplia distribución surge la interrogante si el éxito de esta especie en climas tan diversos es producto de una amplia plasticidad fenotípica o producto de la formación de poblaciones genéticamente diferenciadas y altamente adaptadas a las condiciones locales de cada ambiente en que se desarrolla.

En esta tesis me centraré en aspectos relacionados con el proceso de germinación de semillas de *P. secunda*, y su variación a lo largo de un gradiente altitudinal.

Para la formación de poblaciones localmente diferenciadas genéticamente, se requiere un bajo intercambio genético entre poblaciones (Roff 1994), con el supuesto de que las combinaciones genéticas de cada población representan finas adaptaciones al medio (Stanton & Galen 1997). En *Phacelia secunda*, existen antecedentes que permiten suponer un bajo grado de intercambio génico

entre las poblaciones a lo largo de un gradiente de altitud. Arroyo *et al.* (1981) en un estudio comunitario de los patrones de fenología de floración de especies andinas documentan que poblaciones de *Phacelia secunda* que crecen a 2.300 m s.n.m. comienzan a florecer desde mediados de diciembre hasta mediados de enero, con un máximo de floración hacia fines de diciembre. Poblaciones ubicadas a 3.200 m comienzan a florecer a mediados de enero hasta mediados de marzo, con un máximo de floración hacia fines de enero. A 3.550 m de altitud, la floración se extiende desde comienzos de enero hasta finales de abril, con un máximo a comienzos de marzo. De acuerdo a observaciones de terreno, el máximo de floración a 1.600 m corresponde al mes de diciembre. En consecuencia, existe un fuerte desfase en la fenología de floración de esta especie a lo largo del gradiente de altitudinal, de modo que la época en que podría ocurrir intercambio de genes vía polen no coincide entre las poblaciones ubicadas en los extremos del gradiente. Por otra parte, *Phacelia secunda* es una especie polinizada por insectos (Arroyo *et al.* 1982). Estos mismos autores documentan cambios en los ensambles de insectos que visitan las flores de *P. secunda* con la altitud. Entre los 2.200-2.600 m s.n.m. *Phacelia secunda* es visitada por 19 especies de himenópteros y 4 especies de dípteros, mientras que entre 3.200-3.500 m es visitado por sólo 5 especies de himenópteros y 1 díptero, de las cuales sólo 3 (2 himenópteros y el díptero) son comunes con las altitudes menores. Aunque se desconoce el ensamble de polinizadores para 1.600 m, se ha documentado que en otras especies el ensamble de polinizadores en el matorral montano es completamente diferente al de la zona andina (Cavieres *et al.* 1998b). Por último, las semillas de *Phacelia secunda* no presentan adaptaciones morfológicas que permitan suponer una dispersión de semillas a gran distancia, de hecho, la presencia de semillas en el suelo está asociada a la presencia de individuos adultos (Cavieres, datos no publicados). En consecuencia, considerando los desfases

fenológicos, las diferencias en los ensambles de polinizadores y la baja dispersabilidad de las semillas, parece probable la formación de poblaciones con un alto grado de diferenciación genética a lo largo de un gradiente altitudinal. Si la latencia en las semillas, y la consecuente formación de BSP, es seleccionada hacia mayores altitudes, entonces debería existir una tendencia a aumentar el grado de latencia en las semillas y formar BS más persistentes a medida que las semillas provienen de mayores altitudes.

Una de las aproximaciones experimentales que se ha utilizado para determinar el potencial que tiene una especie de formar un BSP en un ambiente determinado es enterrar sus semillas y recuperarlas después de un año (Zhang & Maun 1994). Si después de un año una fracción importante de las semillas que originalmente se enterraron permanecen viables, se puede inferir que tal especie, en ese ambiente, tiene el potencial para formar BSP. Este método ha sido utilizado en estudios de BS para una o más especies en diversos tipos de hábitats (Pavone & Reader 1982, Lonsdale et al. 1988, Guariguata & Azocar 1988, Zhang & Maun 1994).

Sin embargo, si se quiere demostrar que la capacidad de formar BSP cambia con la altitud, es necesario a su vez determinar si esta adaptación local representa una plasticidad fenotípica de la especie en relación a la capacidad de formar distintos tipos de BS o son resultado de diferenciaciones poblacionales con base genética. Para abordar este problema existen dos acercamientos; uno es enterrar en forma cruzada las semillas en sus ambientes naturales (Chapin & Chapin 1981, Chapin & Oechel 1983, McGraw & Antonovic 1983) (Fig. 2). En este tipo de experimentos, en cada altitud donde se realiza un entierro se deben colocar, al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, semillas colectadas en esa altitud y semillas colectadas en otras altitudes. Si las semillas de una determinada altitud se comportan de un modo similar, independientemente de la altitud en que son

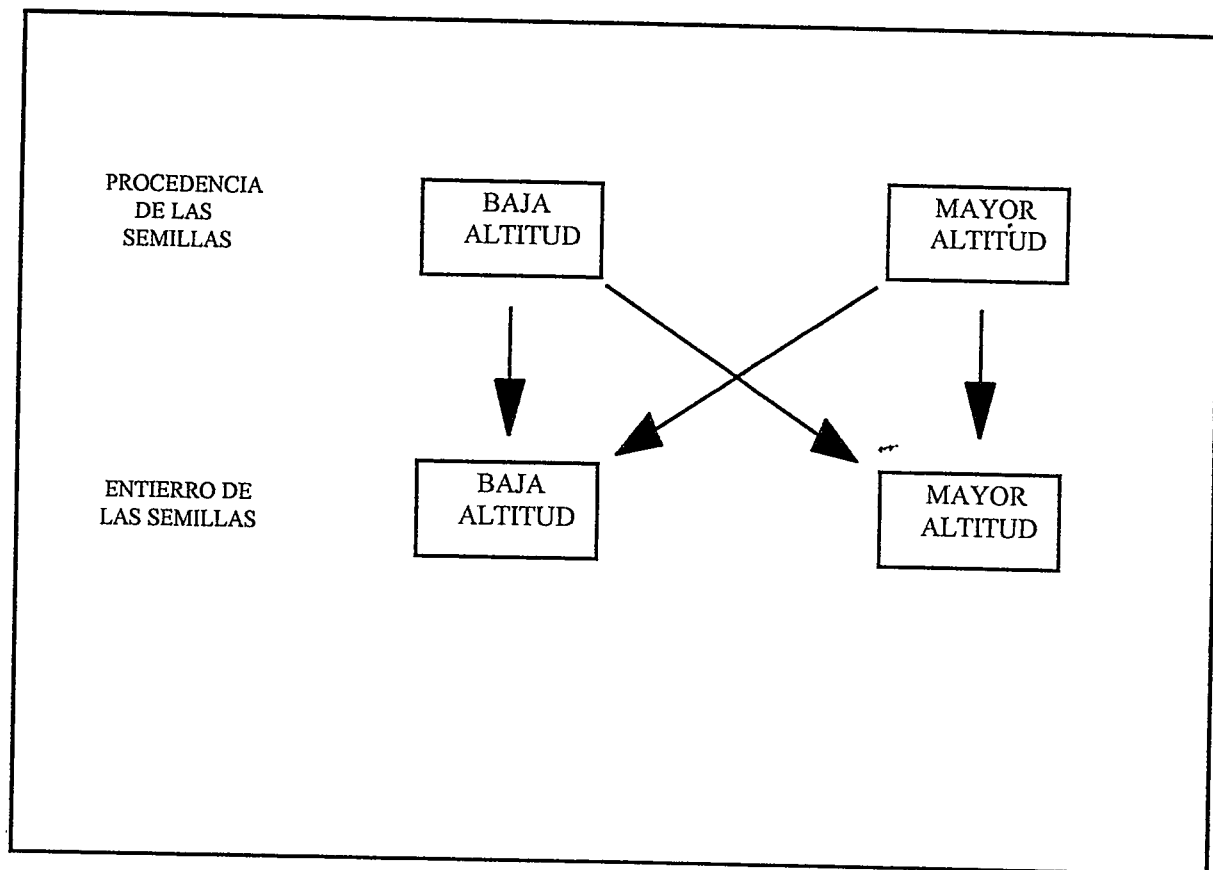


Figura 2. Esquema simplificado de un experimento de entierro recíproco (o cruzado). Las flechas indican el lugar donde son enterradas las semillas colectadas a una determinada altitud.

enterradas, entonces es posible inferir que la adaptación local tiene bases genéticas. Por otro lado, si la respuesta de germinación no depende de la altitud de origen de las semillas sino de la altitud de entierro, entonces es posible inferir que la adaptación es producto de una plasticidad fenotípica en la respuesta de germinación.

En forma complementaria, se pueden realizar experimentos de germinación de semillas de distintos orígenes en ambientes comunes en laboratorio (Ledig & Korbobo 1983). Si la adaptación local es producto de una plasticidad fenotípica la respuesta de germinación en un ambiente común será igual en todas las semillas en forma independiente de su origen. Por el contrario, si hay diferenciación las respuestas de germinación dependerán del origen de las semillas.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este estudio es determinar si el grado de latencia de semillas y la capacidad de formar BSP en una hierba de amplia distribución en Chile central cambia a lo largo de un gradiente altitudinal y determinar si esta respuesta sería resultado de una plasticidad fenotípica o bien producto de una diferenciación con base genética entre poblaciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de BS naturales en *Phacelia secunda* a lo largo de un gradiente de altitud.
2. Cuantificar a lo largo de un gradiente altitudinal la proporción de semillas que germinan en terreno y determinar el grado de persistencia en el suelo en aquellas semillas que no germinan.
3. Caracterizar el tipo de latencia en semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes altitudes a lo largo de un gradiente de altitud.
4. Determinar si las adaptaciones en la capacidad de formar BS de *Phacelia secunda* a lo largo de un gradiente de altitud corresponden a plasticidad fenotípica o diferenciación poblacional con base genética.
5. Explorar factores que determinen la latencia en semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes altitudes.

HIPÓTESIS

1. En una especie, con amplia distribución altitudinal como *Phacelia secunda*, la latencia en las semillas sería un atributo de historia de vida seleccionado hacia mayores altitudes. Se esperaría entonces que la probabilidad de formar BSP incrementa con la altitud.
2. Considerando las bajas probabilidades de intercambio genético entre poblaciones de *Phacelia secunda* ubicadas a diferentes altitudes, existiría un alto grado de diferenciación genética entre poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal. Esto debería expresarse como respuestas de germinación y de latencia independientes del sitio en que son enterradas las semillas y de las condiciones en que son germinadas en laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Especie de estudio

Se utilizó *Phacelia secunda* J.F. Gmel (Hydrophyllaceae) una hierba perenne que en Chile presenta una amplia distribución latitudinal y altitudinal. Habita desde Parinacota (18°S) hasta Tierra del Fuego (54°S), y desde el nivel del mar hasta cerca del límite altitudinal de la vegetación andina (3.500 m). Esta amplitud altitudinal en su distribución la hacen un excelente objeto de estudio en la comprobación de las hipótesis planteadas.

El género *Phacelia* comprende aproximadamente 100 especies, que habitan desde el oeste de Norteamérica (donde se encuentra la mayoría de las especies) hasta el sur de Argentina y Chile (Deginani 1982). *Phacelia secunda* J.F. Gmel. es una hierba perenne, arrosetada o con tallos erguidos, con rizoma vertical, tallos con pilosidad argéteo-seríceo. Puede producir entre 1-4 semillas por flor. Las semillas son cimbiformes, de 2-3 mm de longitud por 1 mm de ancho; tienen un extremo marcadamente agudo, faveoladas en ambas caras y son de color castaño oscuro. Los frutos y semillas de esta especie no presentan adaptaciones morfológicas para dispersión a larga distancia. Según Arroyo & Squeo (1990) esta es una especie parcialmente autocompatible.

2. Área de estudio

Las colecciones de semillas, así como los experimentos de terreno se realizaron en laderas de exposición W a S, entre los sectores del Santuario de la Naturaleza Yerba Loca y el Cerro Negro del centro invernal de Ski Valle Nevado, en los Andes de Chile central (33°S) (Fig. 3). En esta zona se encontraron poblaciones de *Phacelia secunda* desde los 1.600 a los 3.400 m s.n.m., abarcando una diferencia de 1.800 m de altitud entre ambos extremos del gradiente.

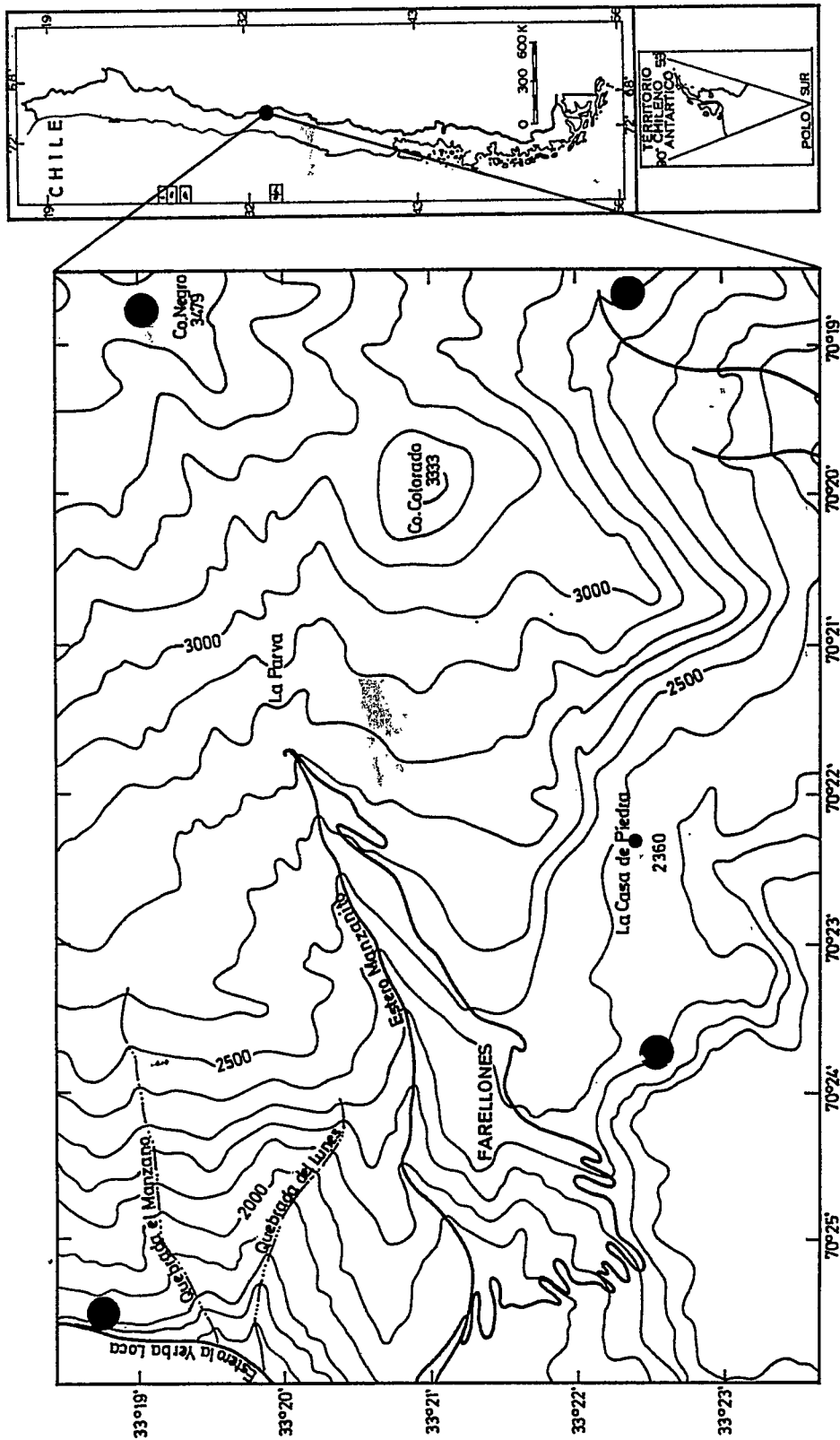


Figura 3. Mapa de la zona de estudio, indicando los sitios (círculos negros) donde se realizaron las colectas y los entierros de semillas de *Phacelia secunda*.

Se establecieron 4 niveles altitudes donde se realizaron tanto la colecta de semillas como los entierros de las mismas:

1.600 m: En el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca, localizado en el valle del estero de la Yerba Loca a 50 km al este de Santiago. Vegetacionalmente corresponde al bosque esclerófilo montano de Chile central, que se caracteriza por la dominancia del árbol *Kageneckia angustifolia* y el arbusto *Guindilia trinervis* (León 1994, Peñaloza 1996), con una fisionomía de matorral abierto (Fig. 4), y una rica flora herbácea tanto anual como perenne (Arroyo & Uslar 1993). *Kageneckia angustifolia* marca el límite arbóreo para esta zona alrededor de los 2.000-2.200 m de altitud. En esta altitud *Phacelia secunda* se encuentra preferentemente en los espacios abiertos entre los árboles de *K. angustifolia*, y en los cursos efimeros de agua. La densidad de *P. secunda* (estimada a partir del conteo de individuos adultos en 25 parcelas de 1 m² distribuidas al azar dentro de este nivel) es de 0,84 individuos/m² (Fig. 8). Las rosetas individuales en promedio tienen ca. 10 cm de diámetro, conteniendo en promedio 2 inflorescencias por individuo (Fig. 5), las que tienen una altura promedio de 24,3 cm por sobre el nivel del suelo (Fig. 9).

2.200 m: Localizado en una ladera de exposición W en la ruta al complejo de Ski Valle Nevado. La vegetación corresponde a un matorral sub-andino dominado por arbustos achaparrados. El matorral sub-andino se encuentra entre los 2.100 a 2.500 m s.n.m., inmediatamente sobre el límite arbóreo de *Kageneckia angustifolia*, y se caracteriza por la dominancia de arbustos achaparrados como *Acaena alpina*, *Chuquiraga oppositifolia* y *Anarthrophyllum cumingii* (Fig. 6) acompañados de varias especies de geófitas y algunas hierbas anuales (Arroyo *et al.* 1981, Cavieres *et al.* datos no



Figura 4. Fisionomía del bosque esclerófilo montano de Chile central, dominado por *Kageneckia angustifolia*, a 1.600 m s.n.m. en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca.



Figura 5. *Phacelia secunda* creciendo en los espacios abiertos del bosque esclerófilo montano a 1.600 m s.n.m.



Figura 6. Fisionomía del piso sub-andino de la vegetación andina de Chile central a 2.200 m s.n.m., dominado por arbustos achaparrados como *Acaena alpina*.



Figura 7. *Phacelia secunda* creciendo en los espacios abiertos del matorral sub-andino a 2.200 m s.n.m.

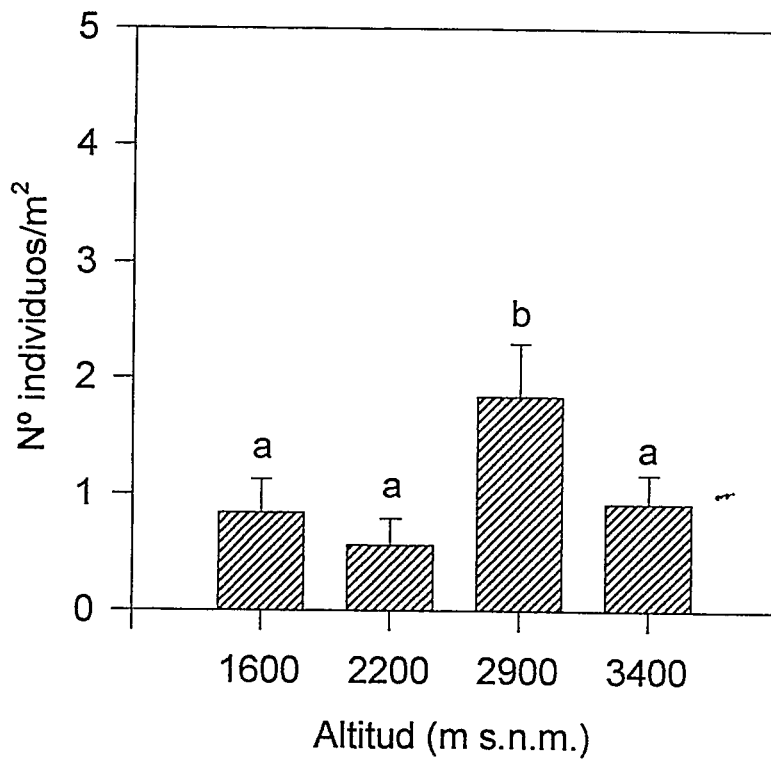


Figura 8: Variación altitudinal de la densidad promedio de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) en los Andes de Chile central (33°S). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de Mann-Whitney como test *a posteriori*.

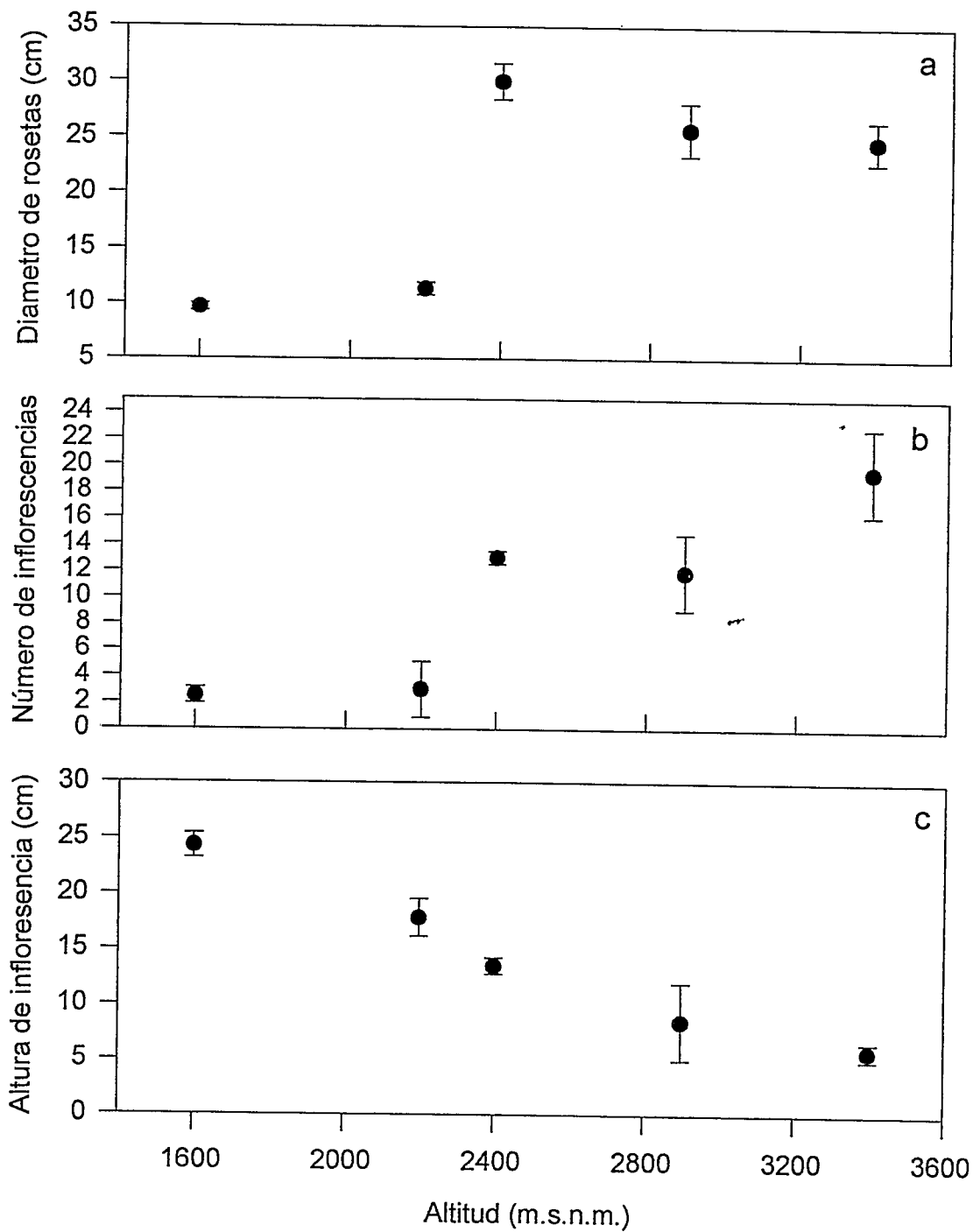


Figura 9. Variación altitudinal de la morfología de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S). a) Diámetro promedio (± 2 E.E.) de rosetas individuales de *P. secunda*. b) Número promedio de inflorescencias por individuos (± 2 E.E.) en rosetas de *P. secunda*. c) Altura promedio por sobre el nivel del suelo (± 2 E.E.) en inflorescencias de rosetas individuales de *P. secunda*.

publicados). En este sitio *Phacelia secunda* se encuentra preferentemente en los espacios abiertos entre arbustos. La densidad de *P. secunda* es de 0,56 individuos/m² (Fig. 8). Las rosetas individuales tienen en promedio de 11,6 cm de diámetro, conteniendo en promedio 3 inflorescencias por individuo (Fig. 7), las que tienen una altura promedio de 17,8 cm por sobre el nivel del suelo (Fig. 9).

2.900 m: Ubicado en una ladera de exposición SW, muy cerca del centro de Ski Valle Nevado. La vegetación corresponde al piso andino inferior, que se encuentra entre los 2.600 a 3.200 m s.n.m. (Cavieres *et al.* datos no publicados) y se caracteriza por la dominancia de especies en cojín como *Laretia acaulis* y *Anarthrophyllum gayanum* (Fig. 10). En este sitio *Phacelia secunda* se encuentra en espacios abiertos, formando manchones con una alta densidad de individuos, siendo la especie herbácea más abundante. La densidad de *P. secunda* es de 1,84 individuos/m² (Fig. 8). Las rosetas individuales tienen en promedio 25,8 cm de diámetro, conteniendo un promedio de 12 inflorescencias por individuo, las que tienen una altura promedio de 8,5 cm por sobre el nivel del suelo (Fig. 9, Fig. 11).

3.400 m: Localizado en una ladera de exposición S en las faldas del Cerro Negro (Fig. 3) aproximadamente a 3 km al norte del centro de Ski Valle Nevado. Este sitio corresponde al piso andino superior (o subnival) de vegetación, caracterizado por la baja cobertura vegetal (Fig. 12), y que está dominado por especies herbáceas de bajo tamaño como *Nassauvia pyramidalis* y *Pozoa coriacea*, y la presencia de otras especies en cojín como *Azorella monantha* (Cavieres *et al.* datos no publicados). En este sitio *Phacelia secunda* se encuentra formando manchones casi monoespecíficos. La densidad de *P. secunda* en este sitio es de 0.92 individuos/m² (Fig. 8). Las rosetas individuales



Figura 10. Fisionomía del piso andino inferior de la vegetación andina de Chile central, a 2.900 m s.n.m., dominado por plantas en cojín como *Laretia acaulis*.



Figura 11. *Phacelia secunda* creciendo en el piso andino inferior a 2.900 m s.n.m.



Figura 12. Fisionomía del piso andino superior o subnival de la vegetación andina de Chile central, a 3.400 m s.n.m., dominado por plantas en cojín como *Azorella monantha* y hierbas perennes como *Nassauvia spp.*



Figura 13. *Phacelia secunda* creciendo en el piso andino superior a 3.400 m s.n.m.

tienen en promedio de ca. 25 cm de diámetro, conteniendo de 2-3 inflorescencias por individuo, las que tienen una altura promedio de 25 cm por sobre el nivel del suelo (Fig. 9, Fig. 13).

3. Clima general del área de estudio

En general, el clima de Chile central es del tipo mediterráneo (di Castri & Hajek 1976) con una marcada estacionalidad tanto en las temperaturas como en las precipitaciones. Se caracteriza además por una alta variabilidad interanual en las precipitaciones (Aceituno 1990) y una moderada oscilación térmica entre el período invernal y la época estival.

Dentro de la zona de clima tipo mediterráneo más típico hacia las altas cumbres de los Andes se desarrolla un clima de alta montaña. Basados en datos disponibles para la Región Metropolitana, se ha clasificado el clima de alta montaña de esta zona como clima templado mediterráneo microtermal subhúmedo (Santibañez y Uribe 1990). Di Castri & Hajek (1976) plantean que en la zona cordillerana de Chile central, a pesar de la predominancia de las influencias del clima tipo mediterráneo, existirían fuertes influencias continentales, las que se acentuarían a medida que se asciende en altitud.

A 1.600 m s.n.m, en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca, la temperatura media anual es de 12,7°C, presentando una marcada estacionalidad térmica (Peñaloza 1996). Las temperaturas medias mensuales varían entre una máxima promedio de 19,5°C (febrero) y una media mínima de 6,2°C (julio). En relación a las temperaturas absolutas, la máxima se eleva hasta 30°C, mientras que la mínima puede ser tan baja como -6.0°C (op. cit.) A 2.600 m s.n.m., en el valle del río Molina, la temperatura media anual es alrededor de 6,5°C, con temperaturas medias mensuales que varían entre una máxima promedio de 10,0°C y una media mínima de -1.0°C (Cavieres & Arroyo 1999). A 3.150

estudio con excepción del sitio 2 (2.200 m s.n.m.), mientras que en el verano de 1996, se colectaron semillas en todos los sitios de colecta. En ambos años, las semillas recolectadas fueron limpiadas y almacenadas en el laboratorio en bolsas de papel en un lugar fresco y seco hasta el inicio de los experimentos.

6. Viabilidad de semillas

Antes de iniciar los experimentos de entierro de semillas en el campo y los experimentos de germinación en laboratorio, para cada uno de los niveles altitudinales de colecta se determinó la viabilidad de 4 réplicas de 50 semillas cada una, mediante el test de Tetrazolium (Moore 1973, Hendry & Grime 1993). Las semillas eran colocadas en papel filtro humedecido por 24 h, y posteriormente, con la ayuda de un bisturí se realizó un corte longitudinal a lo largo del eje de la semilla partiéndola en dos. Las mitades fueron incubadas en una solución de Cloruro de Tetrazolium al 0.5 % por 24 h a 25°C en oscuridad. Aquellas semillas en que el embrión se tiñó completamente de rojo fueron consideradas semillas viables. Este mismo procedimiento se siguió para las semillas que no germinaron al final del período experimental.

7. Experimentos recíprocos de entierro de semillas

Tanto en 1995 como en 1996, en cada nivel altitudinal se escogieron en forma aleatoria 6 sitios de entierro. En cada uno de estos sitios se enterró una jaula metálicas a 5 cm de profundidad, en cuyo interior se depositaron sobres de malla mosquitera conteniendo cada uno 50 semillas de una procedencia en particular.

En 1995 en cada jaula se colocaron 3 sobres; uno de los sobres contenía semillas colectadas a

1.600 m, otro contenía semillas de 2.900 m y el restante contenía semillas colectadas a 3.400 m. Los sobres con semillas fueron enterrados en las siguientes fechas: 1.600 m: 5 de abril de 1995; 2.200 m: 10 de abril de 1995; 2.900 m: 12 de abril de 1995 y 3.400 m: 22 de abril de 1995. El desentierro, después de 1 año, se realizó en las siguientes fechas: 1.600 m: 5 de mayo de 1996; 2.200 m, 2.900 m y 3.400 m: 1 de mayo de 1996.

En 1996 se realizó el mismo sistema experimental pero ahora incluyendo semillas colectadas a 2.200 m (Fig. 14). Los sobres con semillas fueron enterrados en las siguientes fechas: 1.600 m: 5 de mayo de 1996; 2.200, 2.900 y 3.400 m: 1 de mayo de 1996. El desentierro, después de 1 año, se realizó en las siguientes fechas: 1.600 y 2.200 m: 10 de mayo de 1997; 2.900 y 3.400: 5 de mayo de 1997.

En ambos experimentos (semillas enterradas en 1995 y enterradas en 1996) las jaulas recuperadas conteniendo en su interior los sobres con semillas eran transportados al laboratorio. Para cada sobre recuperado se determinó la proporción de semillas que germinaron durante el período de entierro. La fracción de semillas restantes que quedaron sin germinar se sometió a la prueba del Tetrazolium con el propósito de determinar su viabilidad.

7.1 Análisis de los datos

Se analizó el porcentaje de semillas germinadas y el porcentaje de viabilidad de las semillas que quedaron sin germinar, con un Análisis de Varianza de dos vías utilizando la procedencia de la semilla y el sitio de entierro como factores, previa normalización de los datos con una transformación angular (Steel & Torrie 1981). Este análisis se realizó para cada año por separado, para luego realizar una comparación entre años.

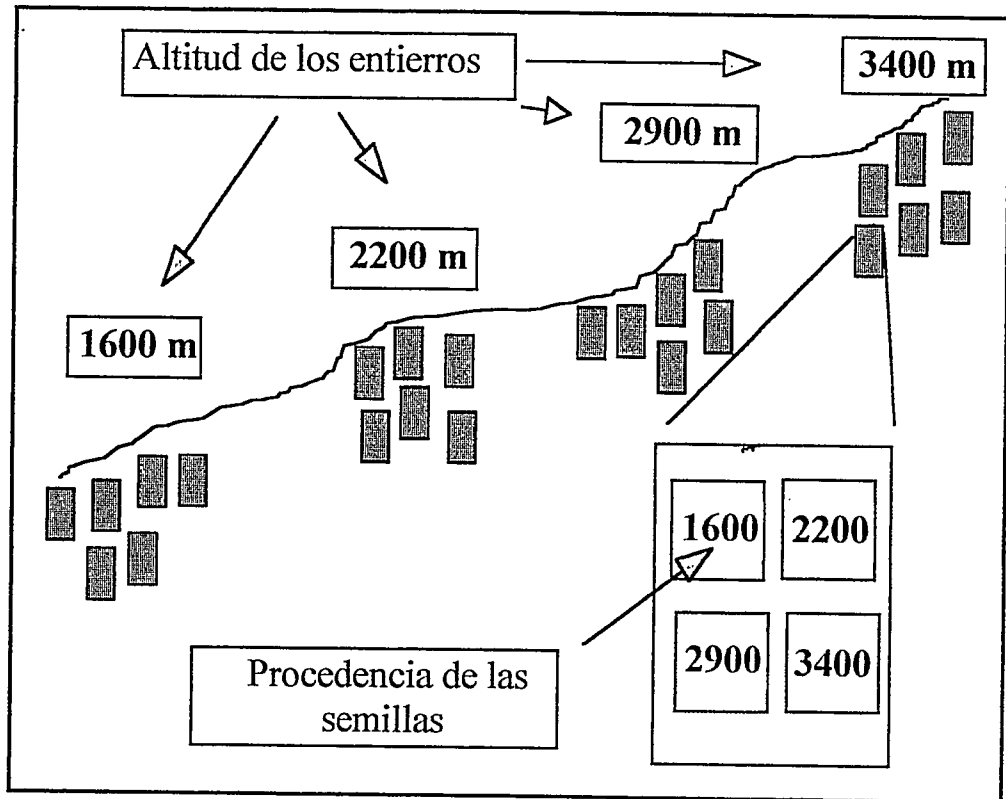


Figura 14. Esquema del procedimiento experimental utilizado en los entierros recíprocos de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes elevaciones en un gradiente altitudinal en los Andes mediterráneos de Chile central.

8. Germinación en laboratorio

En el laboratorio se simularon algunas de las condiciones ambientales que ocurren en terreno en ambos extremos del gradiente (1.600 y 3.400 m), y se estudió la germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes altitudes con el objetivo de determinar si las respuestas de germinación al ser expuestas a un ambiente común son diferentes para los distintos tipos de semillas estudiados. En particular se estudió la respuesta de germinación a dos regímenes de temperatura y después que las semillas han pasado por diferentes períodos de estratificación en frío que simulan la diferencia en la duración de la cubierta de nieve.

8.1 Estratificación

Una de las principales diferencias entre ambos extremos del gradiente es la duración de la cubierta de nieve. A 1.600 m la nieve perdura en promedio 2 meses, mientras que a 3.400 m la nieve perdura 5 meses. Con el fin de evaluar la capacidad de germinación después de tiempos variables de estratificación en frío, en mayo de 1996 alrededor de 1.600 semillas de cada nivel altitudinal fueron puestas a 4°C en condiciones de humedad (Hendry & Grime 1993). Las semillas se mantuvieron bajo estas condiciones 2 y 6 meses. Cumplidos los períodos de 2 y 6 meses, 800 semillas por nivel altitudinal fueron retiradas del refrigerador y preparadas para realizar los ensayos de germinación.

Como control del período de estratificación, alrededor de 1.600 semillas provenientes de cada nivel altitudinal fueron puestas en sobres de papel kraft, y almacenadas por los mismos períodos de tiempo (2 y 6 meses) en un lugar seco y fresco, a temperatura ambiente en el laboratorio.

8.2 Termoperíodo

Dos regímenes térmicos se utilizaron en los experimentos de laboratorio, intentando representar las condiciones térmicas promedio que ocurren en el campo en ambos extremos del gradiente durante el período en que teóricamente germinan las semillas de *Phacelia secunda*. Se utilizaron dos cámaras de crecimiento con termoperíodo y fotoperíodo controlado (12:12 día/noche). La fuente de luz en ambas cámaras fue luz blanca-fría, con un promedio de densidad de flujo de fotones de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Una de las cámaras se programó con 20°C día y 10°C noche mientras la segunda cámara se programó con 10°C día y 5°C noche.

8.3 Ensayos de germinación

Una vez finalizado el período con o sin estratificación, las semillas fueron colocadas en placas petri, entre dos trozos de toalla nova humedecida. En cada tratamiento (con o sin estratificación), para cada nivel altitudinal se prepararon 16 placas petri, cada una conteniendo 50 semillas. De estas 16 placas petri, un sub-conjunto de 8 fueron envueltas en papel de aluminio con el propósito de prevenir la penetración de luz y estudiar de este modo la germinación bajo condiciones de obscuridad. Tanto en semillas estratificadas, como no estratificadas, un conjunto de 8 placas de cada nivel altitudinal fueron colocadas en cada una de las cámaras de crecimiento. De estas 8 placas, 4 estaban envueltas en papel aluminio. En la Figura 15 se presenta un esquema de la metodología empleada.

En cada experimento, cada dos a tres días y por una período total de dos meses, se registró el número de semillas germinadas. El criterio para considerar una semilla germinada fue la emergencia

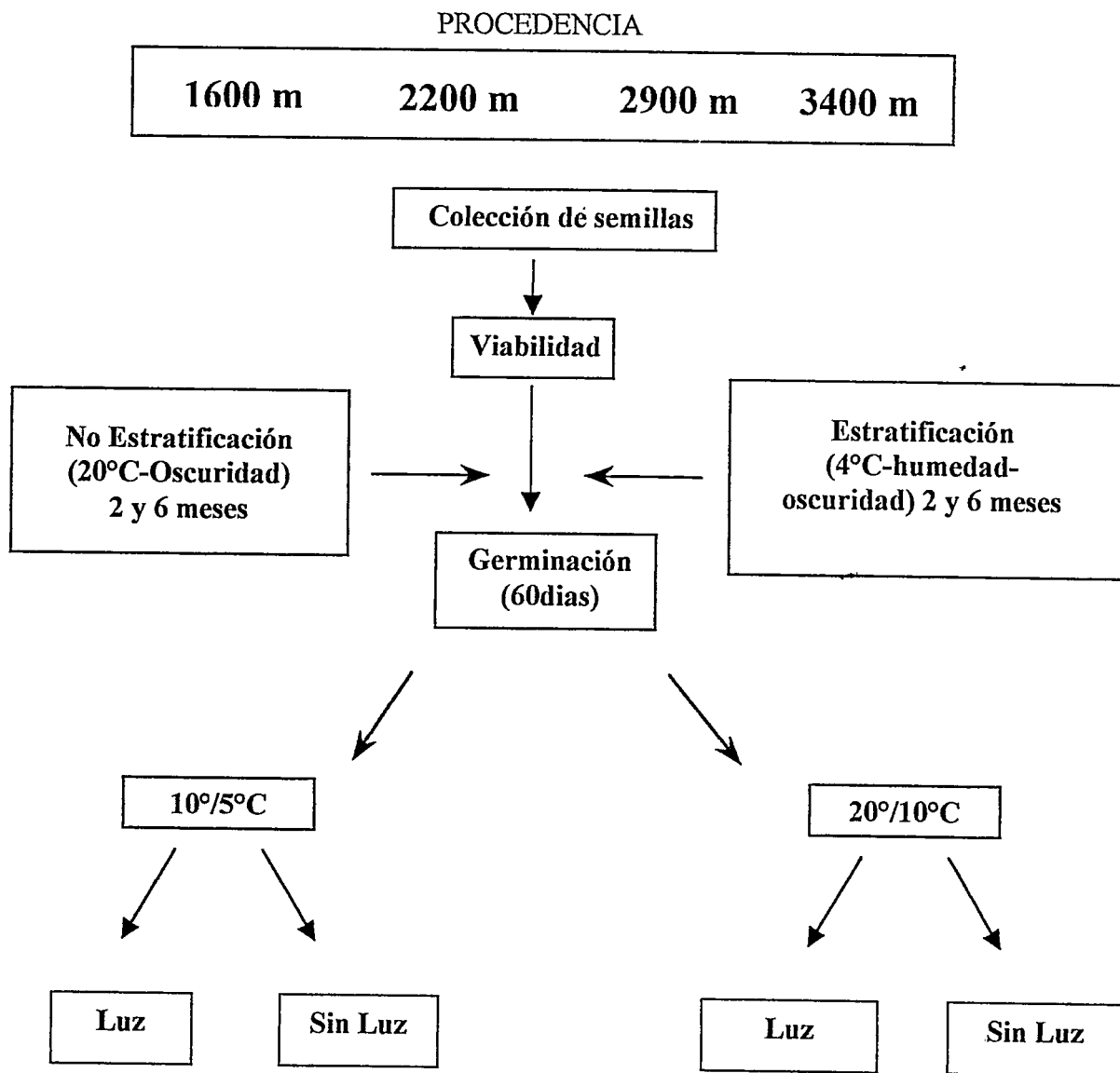


Figura 15. Diagrama de flujo que representa la metodología empleada en los experimentos de germinación en laboratorio.

visible de la radícula (Kloet & Hill 1994). En el caso de las placas envueltas en papel de aluminio para evitar la entrada de luz, éstas se revisaron al término del experimento después de 60 días. En aquellas semillas que no germinaron durante el período de observación se realizó un test de Tetrazolium para detectar su viabilidad (Moore 1973).

Los experimentos de germinación en laboratorio tienen un diseño factorial donde los factores estudiados en diferentes combinaciones fueron la procedencia de la semilla (4 niveles), el tratamiento de estratificación (2 niveles), la duración del tratamiento (3 niveles), el termoperíodo (2 niveles) y la presencia de luz (2 niveles). Cada factor consta con 4 réplicas conteniendo 50 semillas cada una.

8.4 Análisis de los datos

A través de Análisis de Varianza (ANDEVAs) Multifactoriales (Potvin 1994), se estudiaron los efectos de la estratificación (es decir, la presencia o ausencia del factor), del tiempo transcurrido con y sin estratificación, régimen térmico y presencia o ausencia de luz, sobre el porcentaje final de germinación de semillas provenientes de cada uno de los niveles altitudinales. El modelo multifactorial consideró los factores luz y estratificación (con o sin) anidados bajo el régimen térmico, ya que este último se simula con diferentes cámaras de germinación. La variable dependiente fue el porcentaje final de germinación, previa normalización con la transformación angular (Steel & Torrie 1981).

RESULTADOS

1. Tamaño del BS

A 1.600 m hay un promedio de $19,6 \pm 26,7$ semillas/m², a 2.200 m este promedio es de $39,3 \pm 60,1$ semillas/m², a 2.900 m aumenta a $255,4 \pm 155,9$ semillas/m² y a 3.400 decae a $186,6 \pm 167,4$ semillas/m². El BS más numeroso resulta a 2.900 m, mientras que el menos numeroso ocurre a 1.600 m. Los niveles de mayor altitud (2.900 y 3.400 m) tienen BS significativamente más numerosos que los niveles más inferiores (1.600 y 2.200 m) (KRUSKALL-WALLIS = 9,610, p= 0,022), no existiendo diferencias significativas dentro de estos pares (Fig. 16).

2. Viabilidad inicial de semillas

En ambos años la viabilidad inicial de las semillas de *Phacelia secunda* es alta. Los porcentajes promedio ($\pm 2E.E.$) de viabilidad de las semillas colectadas en 1995 fueron: 1.600 m: $98,7 \pm 0,7\%$, 2.900: $98,1 \pm 0,3 \%$ y 3.400: $97,5 \pm 0,5 \%$. La viabilidad inicial de las semillas colectadas en 1996 también fue muy alta ($> 97\%$) en todos los niveles altitudinales, no encontrándose diferencias significativas en la viabilidad de semilla con la altitud (ANOVA, $F_{3,12} = 1,921$; p = 0,179; Tabla 1). Estas semillas fueron utilizadas en los experimentos de germinación en laboratorio de modo que su viabilidad fue monitoreada después de 2 y 6 meses. A lo largo de todo el período experimental la viabilidad de las semillas permaneció alta, no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes períodos de almacenamiento y entre los diferentes niveles altitudinales (ANOVA, $F_{3,24} = 3,038$; p = 0,291; Tabla 1).

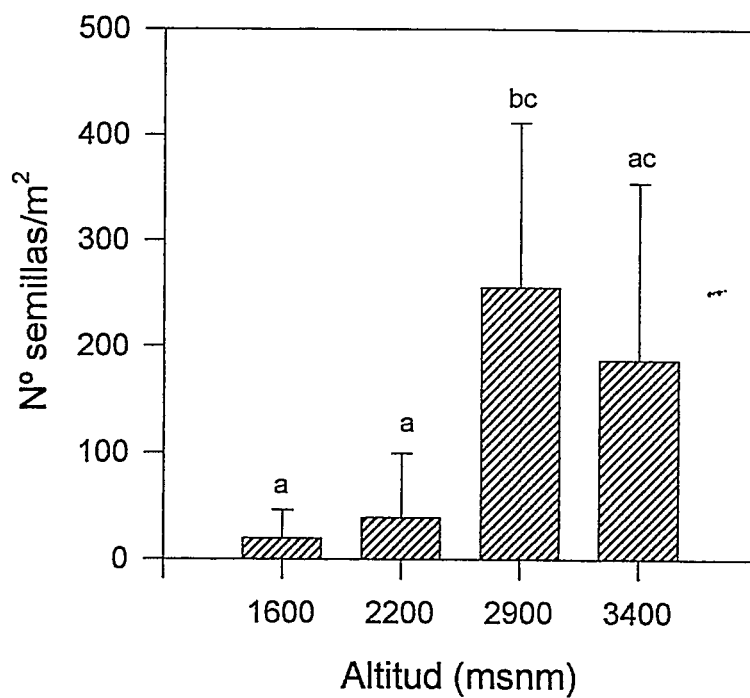


Figura 16. Variación altitudinal del Banco de semillas de *Phacelia secunda* (número de semillas/m² ± 2 E.E.). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 1. Viabilidad de semillas (promedio \pm 2 E.E.), sometidas a diferentes períodos de estratificación (meses). Viabilidad de las semillas (promedio \pm 2 E.E.), mantenidas por diferentes períodos de tiempo (meses) en condiciones de laboratorio (sin estratificación).

Procedencia de las semillas (m s.n.m.)	Meses de estratificación			Meses de almacenamiento	
	0	2	6	2	6
1600	98.8 \pm 1.3	100	100	98.8 \pm 2.3	98.8 \pm 1.3
2200	100	99.5 \pm 0.9	100	97.8 \pm 1.3	98.5 \pm 0.5
2900	99.3 \pm 0.8	99.3 \pm 0.8	100	99.8 \pm 1.4	99.3 \pm 0.8
3400	97.8 \pm 1.8	100	100	98.3 \pm 1.0	97.8 \pm 1.8

3. Experimentos de entierros recíprocos

Tanto la procedencia de la semillas (ANOVA: $F_{2,60} = 824,7$ $p < 0,01$ en 1995 y $F_{3,72} = 71,9$ $p < 0,01$ en 1996; Tabla 2) como el nivel altitudinal en que son enterradas ($F_{3,60} = 110,9$ $p < 0,01$ en 1995 y $F_{3,72} = 12,9$ $p < 0,01$ en 1996, Tabla 2) tienen efectos significativos en el porcentaje de semillas que no han germinado después de 1 año de permanecer enterradas. Un análisis de componentes de la varianza indica que la procedencia de la semillas explica el 81,8% y 74,8% de la variación total de los datos en 1995 y 1996, respectivamente. La altitud a la cual se entierran las semillas explica el 10,9% y 12,6% de la variación total en 1995 y 1996, respectivamente.

En ambos experimentos, y en todas las altitudes en que fueron enterradas, un bajo porcentaje (ca. 20%) de las semillas de altitudes menores (1.600 y 2.200 m) permanecen sin germinar (Fig. 17), no presentando diferencias significativas entre las altitudes de entierro (Tabla 3). Por su parte, semillas de mayores altitudes (2.900 y 3.400 m) presentan mayores porcentaje de semillas que

Tabla 2. ANOVA para determinar el efecto de la altitud en que se entierran semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S) en el porcentaje de semillas que permanecen intactas en el suelo después de 1 año de permanecer enterradas

a) 1995

Fuente de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
Procedencia semilla	16435,5	2	1105,4	110,9	<<0,001
Altitud entierro	3316,3	3	8217,7	824,7	<<0,001
Interacción	4100	6	683,4	68,6	<<0,001
Error	597,9	60	9,9		

b) 1996

Fuente de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
Procedencia semilla	2252,2	3	750,7	12,9	<<0,001
Altitud entierro	12525,4	3	4175,1	71,98	<<0,001
Interacción	3634,6	9	403,8	6,9	<<0,001
Error	4181,7	72	58,1		

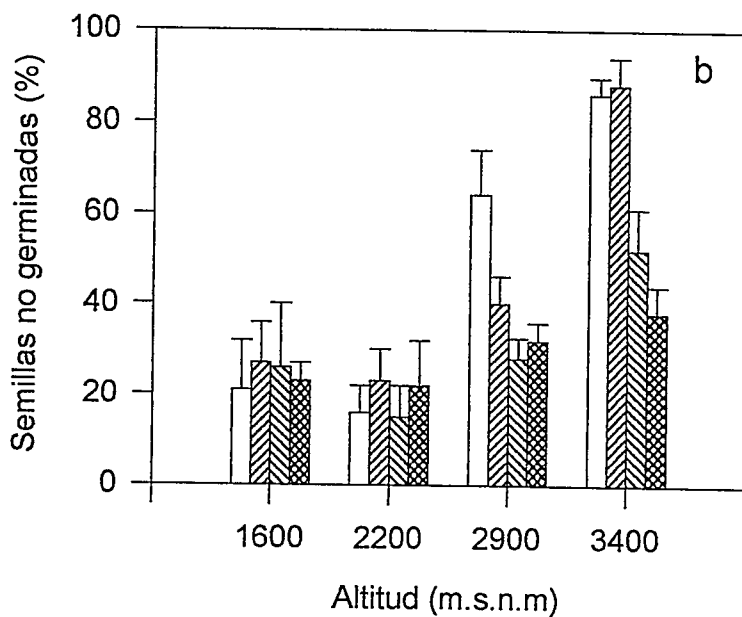
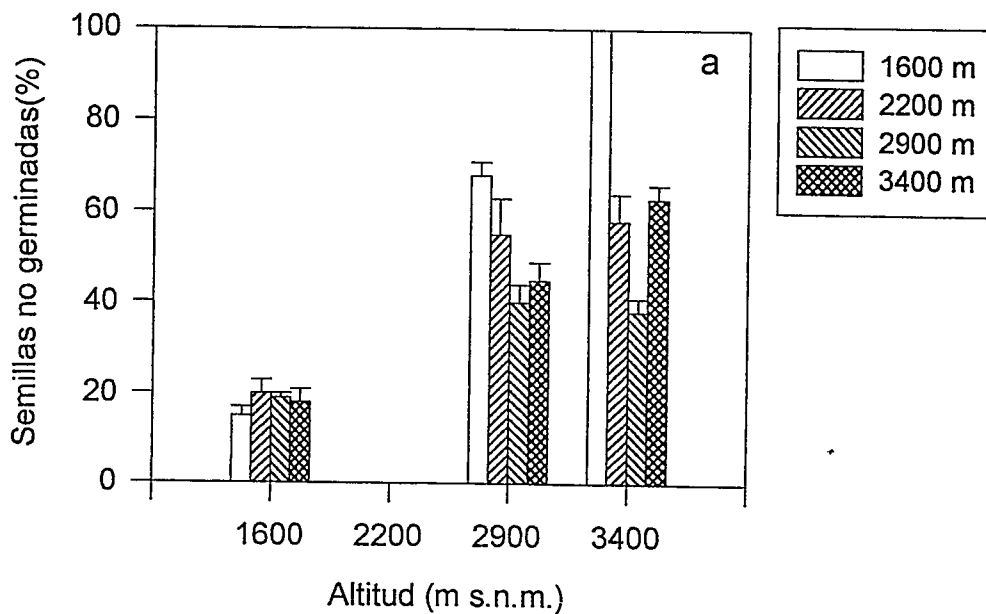


Figura 17. Variación altitudinal en semillas de *Phacelia secunda* que no germinaron después de permanecer un año enterradas. a) semillas enterradas en 1995. b) semillas enterradas en 1996. Los diferentes achurados corresponden a las diferentes altitudes en que fueron enterradas las semillas.

Tabla 3. ANOVA para determinar el efecto de la procedencia de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S) sobre el porcentaje de semillas que permanecen sin germinar en el suelo después de 1 año.

a) 1995

Fuente de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
1.600	49,9	3	16,3	3,0	0,06
Error	112,17	20	5,6		
2.900	944,7	3	314,9	18,4	<<0,001
Error	341,4	20	17,1		
3.400	6421,9	3	2140,6	296,6	<<0,001
Error	144,3	20	7,2		

b) 1996

Fuente de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
1.600	61,7	3	20,6	0,2	0,88
Error	1694,9	18	94,2		
2.200	152,6	3	50,9	0,7	0,57
Error	1333,1	18	74,1		
2.900	1412,9	3	470,9	16,6	<<0,001
Error	511,1	20	28,4		
3.400	4259,6	3	1419,9	39,8	<<0,001
Error	642,5	20	35,7		

permanecen en el suelo sin germinar en comparación con las altitudes menores (Fig. 17). En semillas de 2.900 y 3.400 m entre 37-70% y 38-100% permanecieron sin germinar, dependiendo del año y de la altitud del sitio de entierro (Fig. 17). En ambos casos, el porcentaje de semillas que permanece en el suelo sin germinar disminuye significativamente con la altitud del entierro (Tabla 3) (Fig. 17).

En semillas de 1.600 m, en todas las altitudes de entierro, la viabilidad de las semillas que no germinaron fue baja, fluctuando entre 10-60% dependiendo del año y de la altitud del entierro (Fig. 18). La viabilidad de las semillas remanentes aumenta significativamente con la altitud del sitio de entierro (Tabla 4). En semillas de 2.200 m la viabilidad de las semillas que no germinan fluctúa entre 50-80%, dependiendo de la altitud del entierro (Fig. 18), no encontrándose diferencias significativas entre estas últimas (Tabla 4). Los valores de viabilidad de las semillas de 2.900 que no germinaron son mayores que en las semillas de 1.600 m (Fig. 18). La viabilidad de las semillas de 2.900 que no germinaron es superior al 80%, en ambos experimentos y en todas las altitudes de entierro (Fig. 18), mientras que en semillas de 3.400 m la viabilidad en todos los casos fue superior al 93% (Fig. 18). En ambos tipos de semillas una alta proporción de las semillas que no germinaron después de 1 año permanecen viables en estado de latencia, no encontrándose diferencias significativas con la altitud del sitio de entierro (Tabla 4).

Existen diferencias significativas entre los valores de germinación entre 1995 y 1996 (ANOVA, $F_{1,114} = 10,03$; $p = 0,002$). Sin embargo, a pesar de las diferencias en los valores, la tendencia general se mantiene. Las semillas de 1.600 m germinan en su gran mayoría al primer año de permanecer enterradas, quedando muy pocas semillas viables; las semillas de los niveles superiores en cambio muestran progresivamente menor germinación y mayor viabilidad de aquellas semillas que quedaron sin germinar después de un año. Por el contrario, no se encontraron diferencias

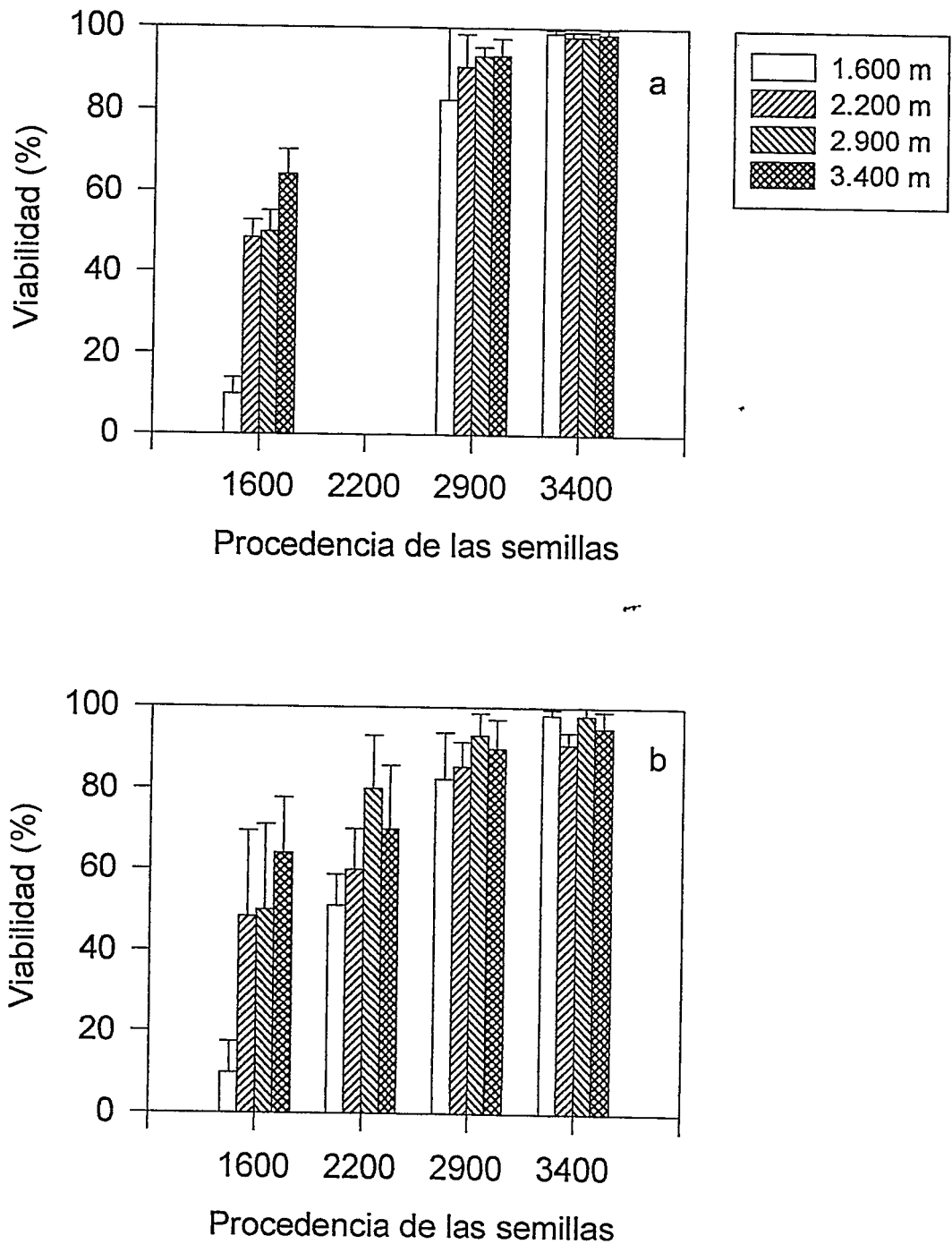


Figura 18. Variación altitudinal en el porcentaje de viabilidad en semillas de *Phacelia secunda* que no germinaron después de un año de permanecer enterradas. a) Semillas enterradas en 1995. b) Semillas enterradas en 1996. Los diferentes achurados corresponden a las diferentes altitudes en que fueron enterradas las semillas.

Tabla 4. ANOVA para determinar el efecto de la procedencia de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S) sobre la viabilidad de las semillas que permanecen sin germinar en el suelo después de 1 año.

a) 1995

Fuente de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
1.600	4578,8	3	1526,3	42,6	<<0,001
Error	717,1	20	35,9		
2.900	162,8	3	54,3	0,251	0,860
Error	4331,1	20	216,6		
3.400	22,9	3	7,6	0,3	0,844
Error		558,9	20	27,9	**

b) 1996

Fuente de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
1.600	4814,6	3	1604,9	4,6	0,01*
Error	6242,3	18	346,8		
2.200	1703,9	3	567,9	2,871	0,065
Error	3560,6	18	197,8		
2.900	505,9	3	168,6	1,6	0,229
Error	1920,9	18	106,7		
3.400	534,4	3	178,1	3,7	0,031
Error	870,2	18	48,3		

significativas en la viabilidad de las semillas remanentes entre ambos años ($F_{1,114} = 1,31$; $p = 0,255$).

4. Germinación en laboratorio

La procedencia de las semillas tiene un efecto significativo, indicando que las semillas de diferentes altitudes no responden del mismo modo a los factores de germinación analizados (Tabla 5) A continuación se analiza la germinación de los diferentes tipos de semillas para cada uno de estos factores.

Tabla 5. Tabla ANOVA multifactorial para determinar los efectos del Tratamiento (con o sin estratificación), el Tiempo transcurrido (meses), Termoperíodo, la presencia de Luz y las respectivas interacciones, en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).

Efecto	df	MS	P
<i>Tratamiento</i>	1	88851.2	<<0.001*
<i>Tiempo</i>	1	18782.6	<<0.001*
<i>Termoperíodo</i>	1	442.1	<<0.001*
<i>Luz</i>	1	281.1	<<0.001*
<i>Procedencia de las semillas</i>	3	6968.8	<<0.001*
Error	192	9.9	

4.1 Germinación sin estratificación

Ninguna de las semillas colectadas durante la temporada 1996 germinó en forma inmediata en las condiciones experimentales ofrecidas. En la Figura 19 se muestra los porcentajes de germinación de semillas almacenadas por períodos de 2 y 6 meses en el laboratorio. Se aprecia que en ambos

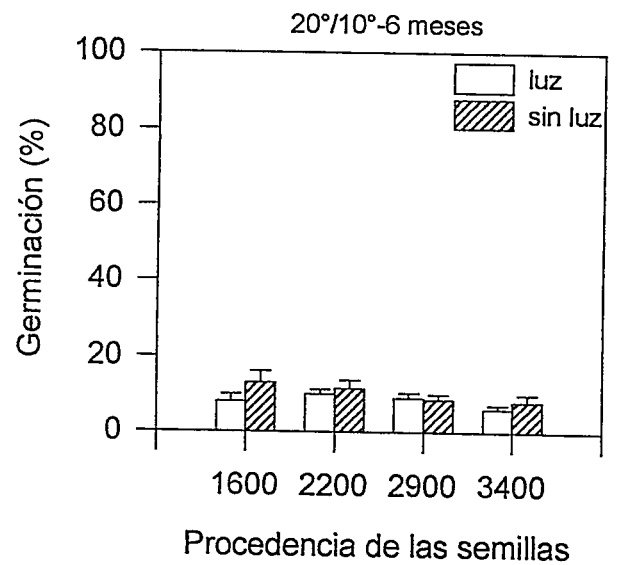
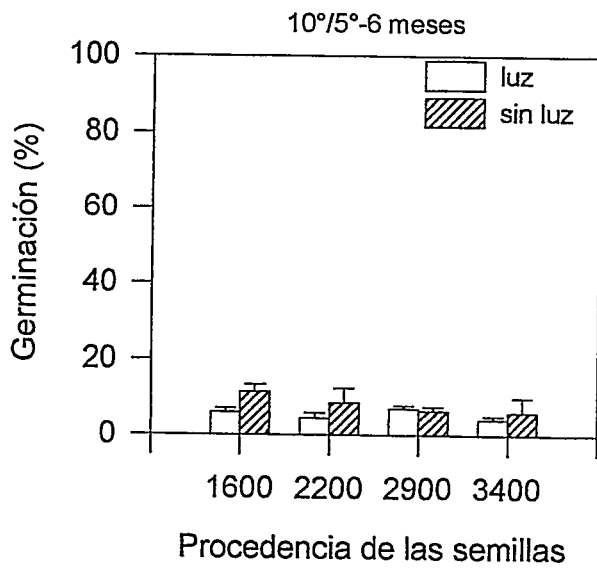
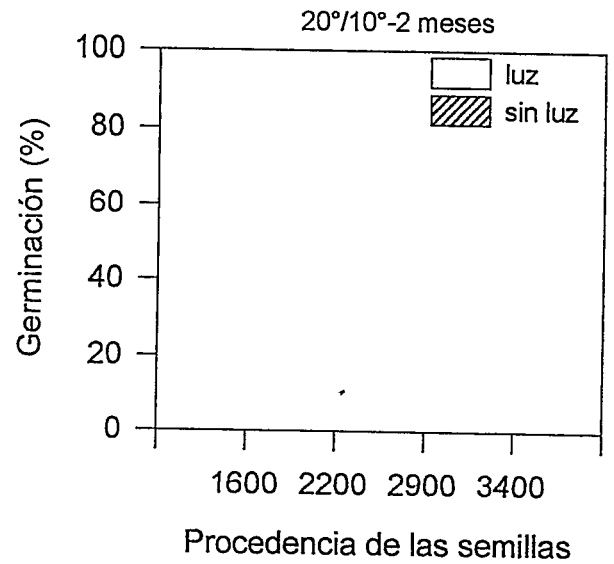
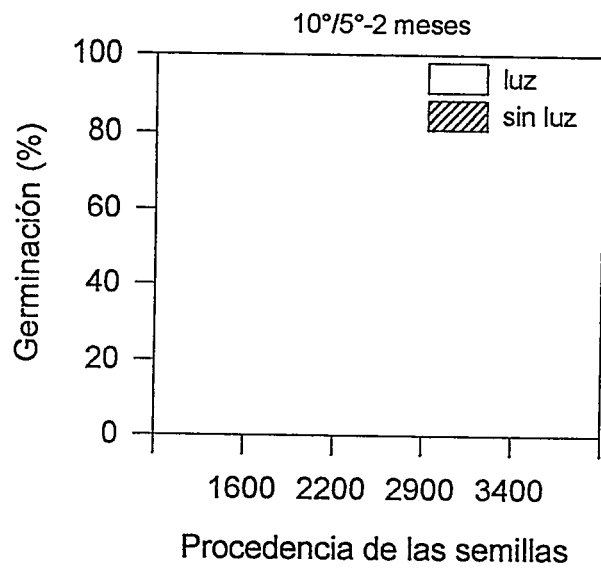


Figura 19. Porcentajes de germinación en dos regímenes térmicos (10°/5°C y 20°/10°C) de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes y mantenidas por 2 y 6 meses en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente en el laboratorio. Los diferentes achurados de las barras corresponden a presencia y ausencia de luz. Con 2 meses de almacenamiento las semillas no germinaron.

termoperíodos, no hay germinación en las semillas que han permanecido 2 meses almacenadas en el laboratorio (Fig. 19). En semillas almacenadas durante 6 meses, los porcentajes finales de germinación obtenidos son muy bajos, siendo menores al 20% en todos los casos. De acuerdo a lo anterior, en todas las altitudes, períodos más largos de almacenamiento en laboratorio aumentan significativamente el porcentaje final de germinación. Sin embargo, tanto la procedencia de las semillas, como el termoperíodo empleado y la presencia o ausencia de luz tienen efectos significativos en la germinación (Tabla 6). Al analizar las diferentes procedencias de las semillas, se encuentra que las semillas de menores altitudes (1.600 y 2.200) germinan significativamente más que las semillas de mayores altitudes (2.900 y 3.400) (ANOVA: $F_{3, 192} = 14.104, p < 0,001$).

4.2 Germinación con estratificación

En la Figura 20, se muestran los porcentajes de germinación acumulados a lo largo del período experimental destacándose que con los 60 días de duración de los experimentos de germinación se alcanzan los máximos de germinación posible en cada caso.

En casi todas las semillas, el porcentaje final de germinación tras someter las semillas a diferentes períodos de estratificación es significativamente mayor que el porcentaje final de germinación obtenido sin estratificación (Tabla 5) (Fig. 21). Con la excepción de semillas de 3.400 m que después de 2 meses de estratificación o almacenamiento no germinan.

El período de estratificación afecta significativamente el porcentaje final de germinación (Tabla 7), aumentando la germinación en casi todas las semillas, exceptuando las semillas de 1.600 m (Fig. 21). Después de 2 meses de estratificación semillas de 1.600 m alcanzan un porcentaje de

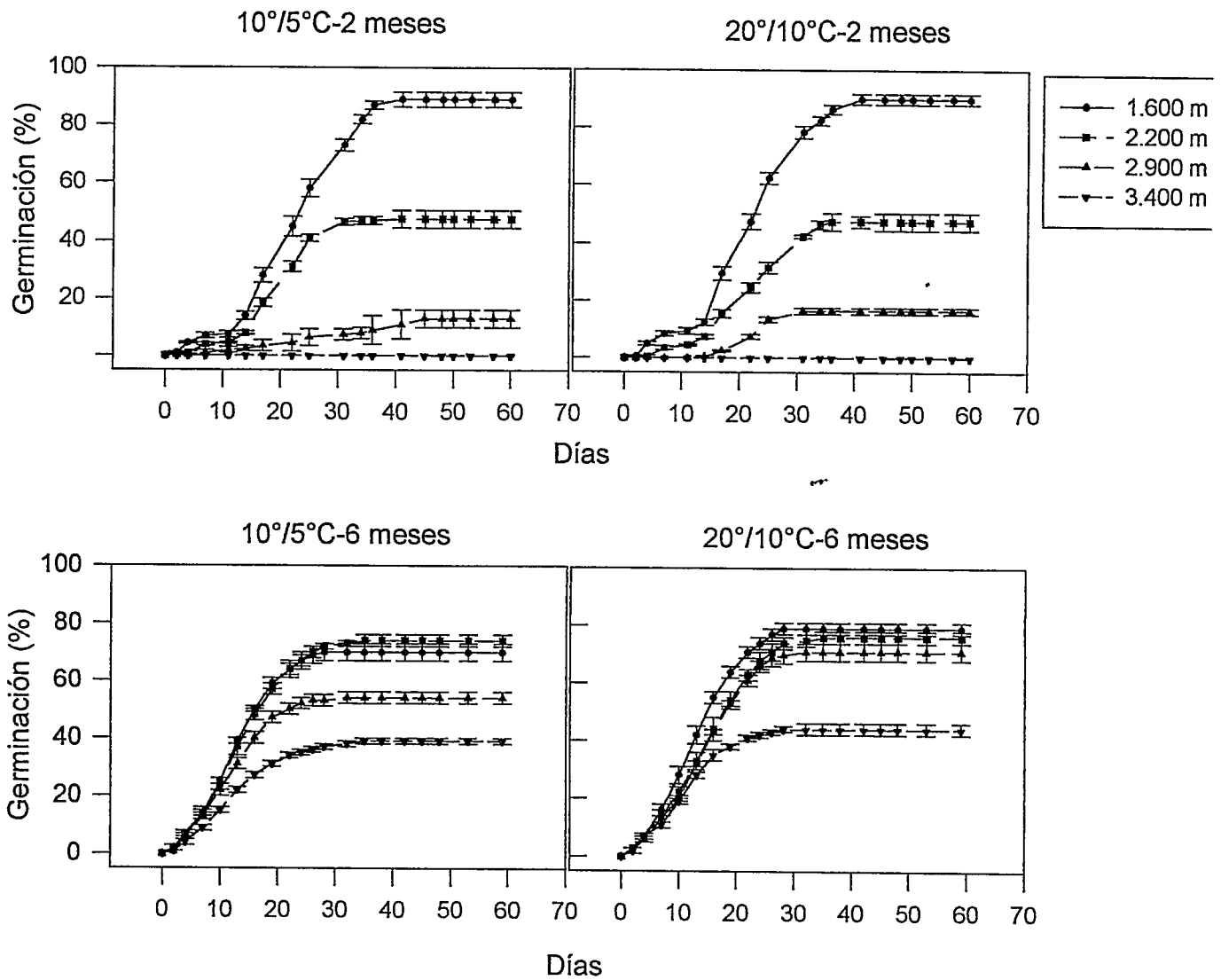


Figura 20. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes y mantenidas por diferentes lapsos de tiempo en condiciones de estratificación húmeda (4°C-oscuridad). La germinación se realizó en presencia de luz.

Tabla 6. Valores de F calculados con un ANOVA trifactorial para determinar los efectos del tiempo sin estratificación, termoperíodo y la presencia de luz en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).

Procedencia de las semillas (m.s.n.m)	Tiempo sin estratificación $F_{3,72}$	Termoperíodo $F_{1,72}$	Luz $F_{1,72}$
1.600	13.904*	3.423	12.125*
2.200	21.175*	3.599	25.636*
2.900	34.459*	7.349*	4.562*
3.400	7.92*	8.221*	6.381*

Los asteriscos (*) indican $p < 0,01$

Tabla 7. Valores de F calculados con un ANOVA trifactorial para determinar los efectos del tiempo de estratificación, termoperíodo y la presencia de luz en los porcentajes finales de germinación de semillas de *Phacelia secunda* colectadas a diferentes niveles altitudinales en los Andes de Chile central (33°S).

Procedencia de las semillas (m.s.n.m)	Tiempo de estratificación $F_{3,72}$	Termoperíodo $F_{1,72}$	Luz $F_{1,72}$
1.600	192,480*	13,340*	18,181*
2.200	924.111*	1.985	12,031*
2.900	761,596*	62,681*	21,972*
3.400	576,916*	35,960*	7,940*

Los asteriscos (*) indican $p < 0,01$

germinación por sobre el 85% en ambos termoperíodos, decayendo a menos de un 80% después de 6 meses de estratificación. Las semillas provenientes de 2.200 m aumentan su germinación desde un 50% después de 2 meses de estratificación a > 70% después de 6 meses de estratificación (Fig. 21). Por su parte, las semillas de la parte más alta del gradiente (2.900 y 3.400 m) aumentan desde < 20% después de 2 meses de estratificación a cerca de un 50% después de 6 meses de estratificación, lo que representa un porcentaje de germinación significativamente menor en comparación a lo obtenido con semillas procedentes de altitudes más bajas (Fig. 21). De acuerdo a estos resultados existiría una tendencia a requerir períodos de estratificación más largos para germinar a medida que las semillas provienen de mayor altitud.

Cuando comparamos los porcentajes finales de germinación con y sin estratificación, incorporando el tiempo transcurrido (los meses con o sin estratificación) como factor en un ANOVA multifactorial, el tiempo transcurrido tiene efecto significativo sobre la germinación (Tabla 5). Al calcular la proporción de la variación total que explica cada uno de estos factores resalta que para todos los niveles altitudinales, el tratamiento (con o sin estratificación) explica más del 50% de la variación total mientras que el tiempo transcurrido sólo explica entre un 5 a un 35% dependiendo la altitud de procedencia de las semillas. La contribución del tiempo transcurrido a la variación total explicada aumenta con la elevación de la fuente de semilla.

4.3 Efecto del termoperíodo

El termoperíodo tiene efectos significativos en la germinación de semillas (Tabla 5). En semillas que no han sido estratificadas, el termoperíodo sólo tiene efectos significativos en semillas provenientes de los niveles altitudinales más altos (2.900 y 3.400 m, Tabla 6), siendo mayor la

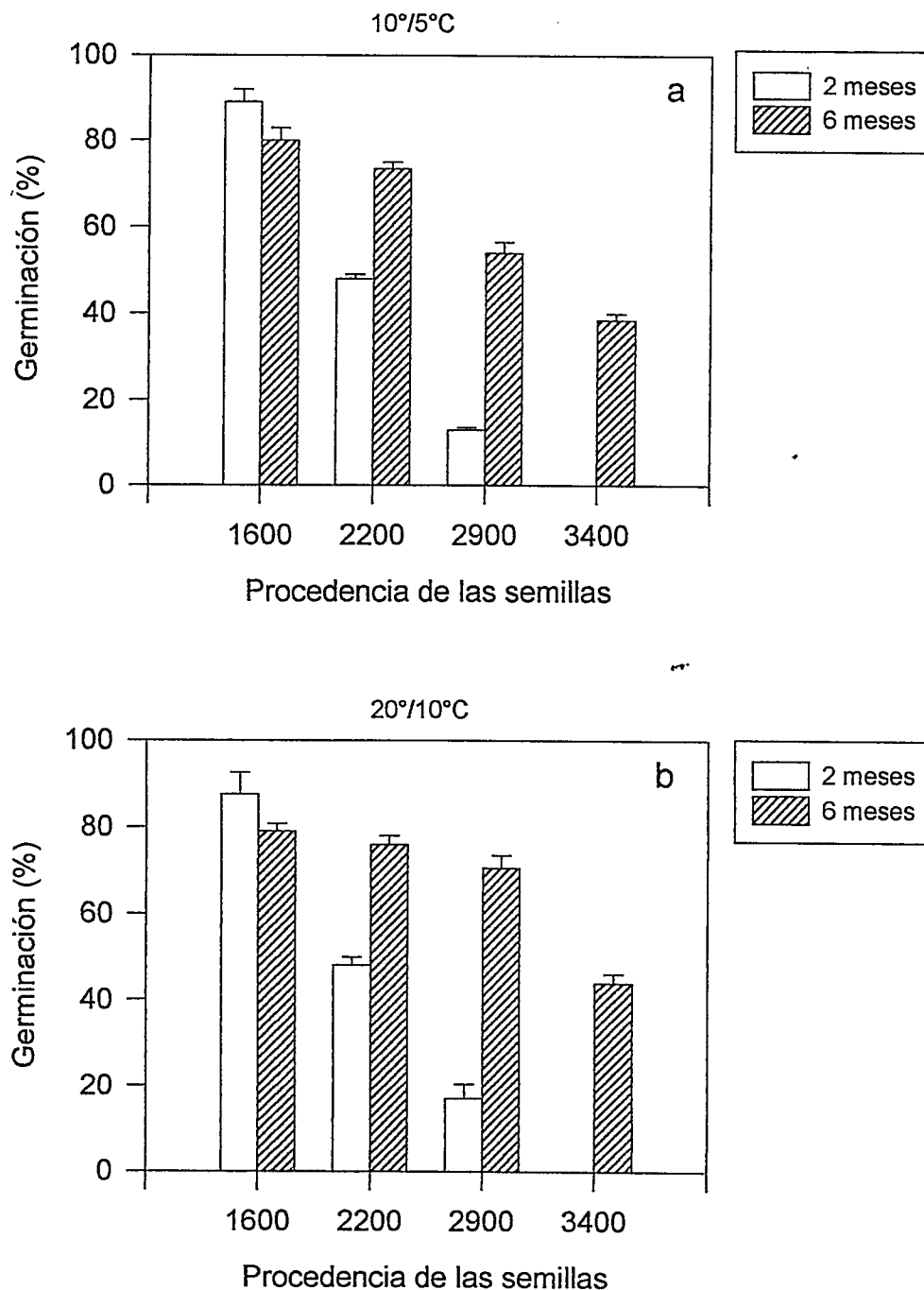


Figura 21. Efecto del tiempo de estratificación en el porcentaje de germinación en dos regímenes térmicos (10°/5° y 20°/10°) de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. La estratificación se realizó por 2 y 6 meses en condiciones húmedas a 4°C y oscuridad. La germinación es en presencia de luz. En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación.

germinación alcanzada bajo el régimen 20°/10°C (Fig. 19). En semillas sometidas a estratificación en frío, en forma independiente del tiempo de estratificación a que han sido sometidas, con la excepción de las semillas de altitudes menores (1.600 y 2.200 m) el termoperíodo tiene un efecto significativo en los porcentajes finales de germinación (Tabla 7).

En semillas de 1.600 m hay una leve tendencia a que las semillas germinen en un mayor porcentaje en el termoperíodo de 10°/5°C que en el termoperíodo de 20°/10°C (Fig. 22). En las semillas provenientes de mayores altitudes, en cambio, ya sea de 2.900 o 3.400 m, consistentemente se obtienen mayores porcentajes de germinación con el termoperíodo de 20°/10°C (Fig. 22).

4.4 Efecto de la luz

En relación al factor luz en todos los experimentos este tiene un efecto significativo (Tabla 5). En ambos termoperíodos, y para cada período con o sin estratificación, se encuentra que los porcentajes finales de germinación son mayores sin la presencia de luz (Fig. 23). Estos resultados proveen una primera noción de que un requerimiento de luz para germinar no es un factor crítico en la germinación de semilla de *Phacelia secunda*. Por el contrario, la luz parece tener un efecto inhibitorio de la germinación.

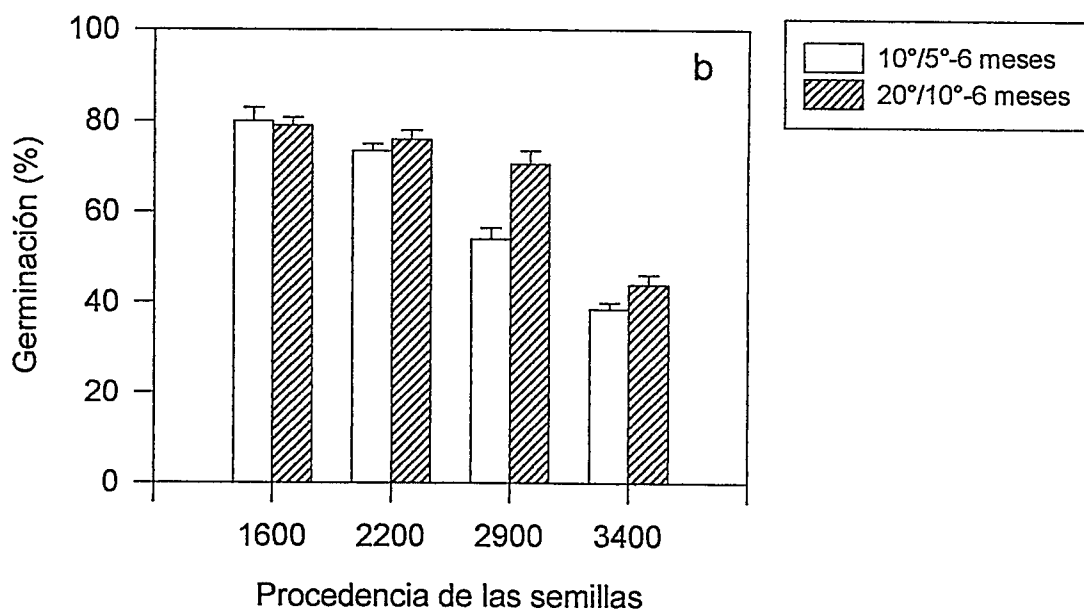
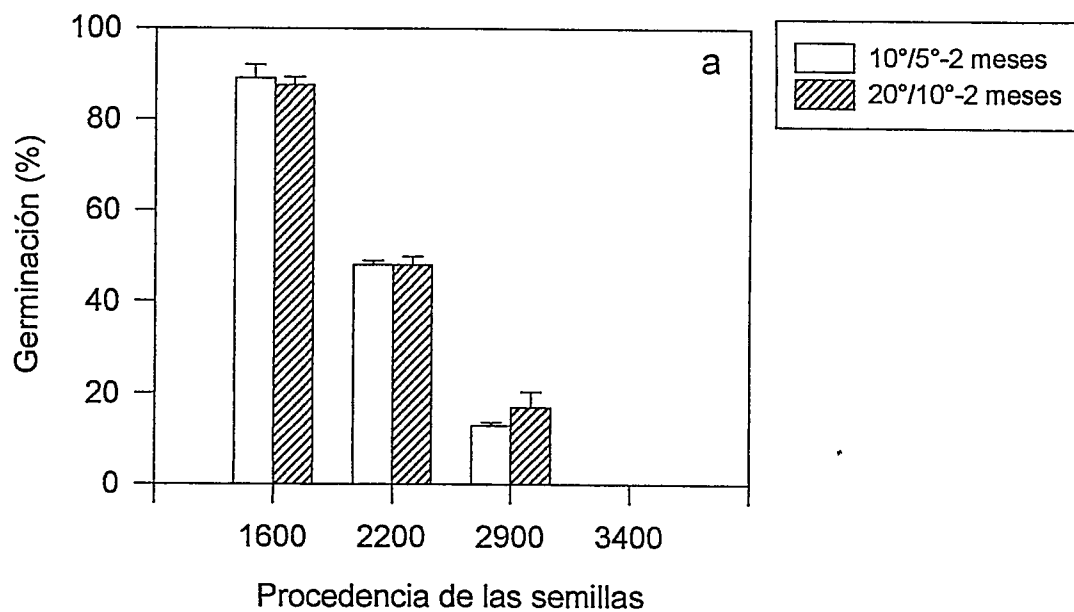


Figura 22. Efecto del régimen térmico (10°/5°C y 20°/10°C) en el porcentaje de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. a) semillas mantenidas por 2 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C-oscuridad). b) semillas mantenidas por 6 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C-oscuridad). La germinación es en presencia de luz. En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación.

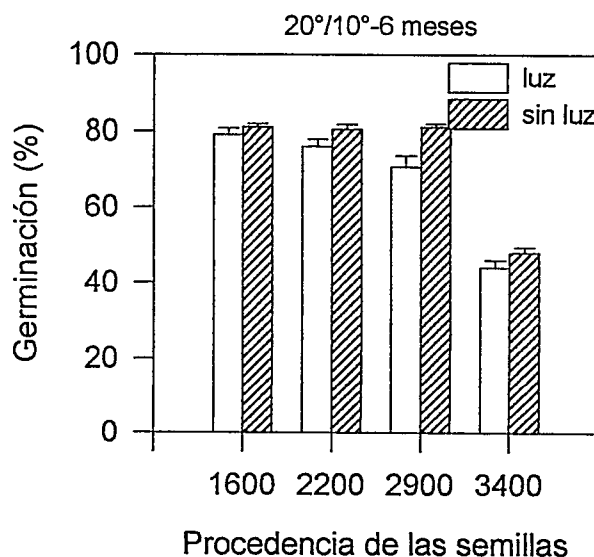
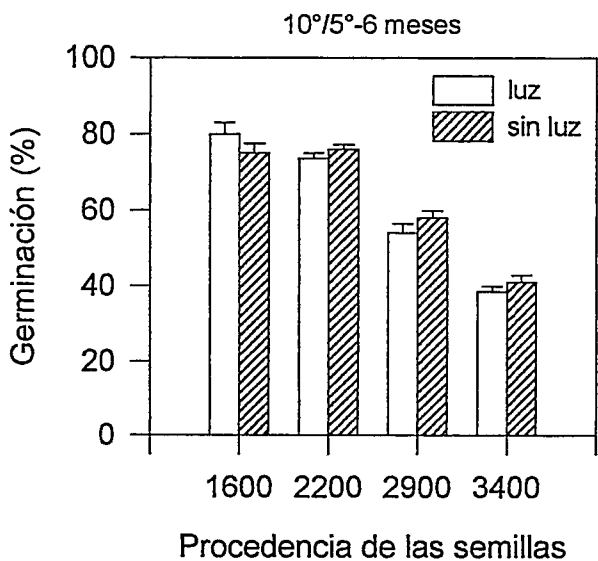
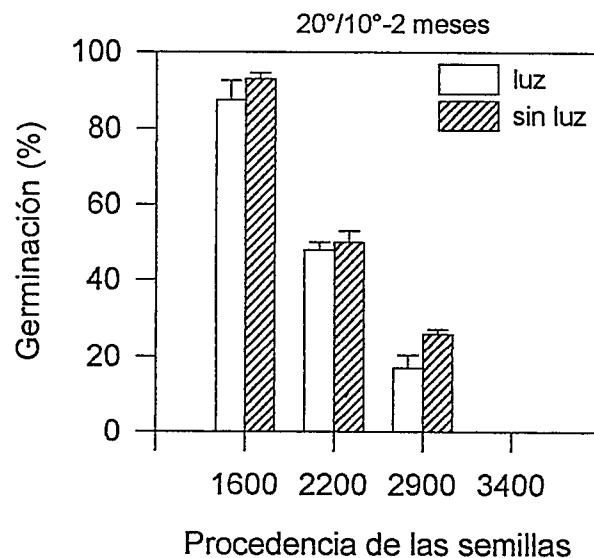
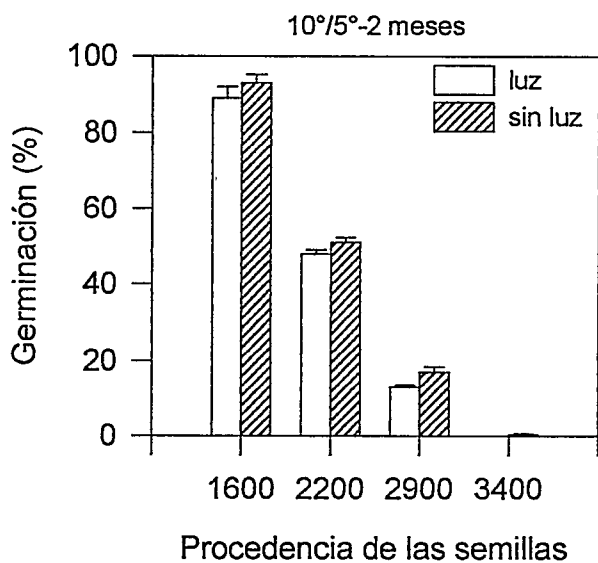


Figura 23. Efecto de la luz en el porcentaje de germinación de semillas de *Phacelia secunda* (\pm 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes. Las semillas fueron mantenidas por 2 y 6 meses en condiciones de estratificación húmeda (4°C-oscuridad). La germinación se realizó en dos régimen térmico (10°/5°C y 20°/10°C) En los meses donde no hay barras significa que esas semillas no germinaron con ese período de estratificación.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis serán discutidos en dos niveles de análisis. En un primer nivel (ecológico-evolutivo) se discute si la latencia en las semillas cambia como una respuesta adaptativa frente a la variación ambiental, y si esta respuesta adaptativa es originada por una respuesta plástica de la especie en las diferentes altitudes estudiadas o es producto de una diferenciación genética entre las diferentes poblaciones. Por otro lado (nivel ecofisiológico), se explora el tipo de latencia que expresan las semillas de *Phacelia secunda* en las diferentes altitudes estudiadas y los factores que desencadenan dicha latencia y su variación altitudinal.

1. Bancos de semillas naturales

Una de los supuestos de esta tesis, era mostrar que *Phacelia secunda*, forma BS en los distintos ambientes analizados. El tamaño del BS que forma a diferentes altitudes fluctúa entre $19,6 \pm 26,7$ semillas/m² a 1.600 m hasta $255,4 \pm 155,9$ semillas/m² a 2.900 m. Dado que las muestras de suelo fueron tomadas posterior al período de germinación natural de la especie, pero antes del nuevo período de dispersión de semillas, el BS correspondería a un BSP. Si bien el método de las muestras de suelo es apropiado para dimensionar el tamaño del BS que forma una especie, aún tomando las muestras de suelo en el período apropiado, no es posible determinar cuan persistente es el BS. Además, la presencia de semillas en el suelo es una condición necesaria, pero no suficiente, para sugerir la formación de BSP. Para esto es necesario evaluar la presencia de latencia en las semillas con independencia a la presencia de agentes bióticos que podrían afectar la presencia de semillas en el suelo (e.g., depredadores de semillas).

2. Variación altitudinal en la latencia y formación de BSP

En esta tesis se ha encontrado que en *Phacelia secunda*, que la gran mayoría de las semillas de baja altitud (1.600 m) germina dentro del primer año que permanecen enterradas. Además, de las pocas semillas que no germinan el primer año, un muy bajo porcentaje permanece viable. En las semillas de mayor altitud en cambio (3.400 m), sólo algunas germinan en el transcurso de un año, y de aquellas que no lo hacen un alto porcentaje (> 90%) permanece viable. Estos resultados sugieren un aumento en el grado de latencia de las semillas con la altitud. Esta variación altitudinal en la latencia de las semillas también se expresa en los experimentos de germinación en laboratorio, donde las semillas de baja altitud requieren sólo 2 meses de estratificación para germinar por sobre el 80%. Las semillas de mayor altitud en cambio, aún con 6 meses de estratificación sólo germinan en un 50%.

Considerando que los patrones de germinación en terreno se obtienen incluso con semillas producidas y enterradas en diferentes temporadas, los resultados sugieren un gradiente altitudinal en la capacidad de formar BSP, donde semillas colectadas a mayor altitud tienen una mayor capacidad de formar BSP que semillas de altitudes menores. Esta variación altitudinal es un patrón consistente, independiente de las condiciones ambientales del año en que son producidas y/o enterradas las semillas. Considerando además que los resultados de las muestras de suelo indican la presencia de BS de *Phacelia secunda* en todas las altitudes estudiadas, se concluye que esta especie presenta un gradiente altitudinal en la formación de banco de semillas persistentes.

Con anterioridad a esta tesis, el único trabajo que documenta una variación altitudinal en la persistencia del BS en una misma especie es el de Miller & Cummins (1987) en *Calluna vulgaris*. Estos autores documentan que el BS de *Calluna vulgaris* pasa de un BS transiente en la zona sub-

alpina a un BS muy persistente en la zona alpina. Estos autores sugirieron que la mayor persistencia del BS hacia mayores altitudes se debería a las bajas temperaturas del ambiente que determinan una menor diversidad de fitopatógenos y depredadores de semillas, junto a una menor tasa de consumo de las reservas nutricionales de las semillas, facilitando la mantención de semillas viables en el suelo por prolongados períodos de tiempo. En el caso de *Phacelia secunda*, sus semillas no son depredadas por ratones, aves o insectos (Figueroa *et al.*, datos no publicados), no obstante, un mejoramiento de las condiciones del suelo que facilitan la mantención de la viabilidad en las semillas hacia mayores altitudes puede observarse en semillas de 1.600 m. Tanto en el experimento de 1995 como en 1996, la magnitud de la germinación después de un año de estar enterradas era muy similar en todas las altitudes de entierro. Sin embargo, la viabilidad de las semillas que quedaron sin germinar aumentaba significativamente con altitud del sitio de entierro.

De acuerdo a nuestra hipótesis, la latencia en las semillas es un atributo de historia de vida seleccionado en un gradiente altitudinal hacia las zonas alpinas en respuesta a las mayores fluctuaciones del ambiente en altitudes mayores, determinadas principalmente por la impredecibilidad de la duración de la estación de crecimiento y la impredecibilidad de las perturbaciones del suelo que determinen mejores condiciones para el establecimiento de las plántulas. Los BSP que han sido documentados en zonas alpinas (Roach 1983, Ebersole 1989, Ingersoll & Wilson 1993, Arroyo *et al.* 1999) no solo serían sólo el reflejo de la dispersión de semillas inmaduras y de las condiciones del suelo que facilitan la longevidad, sino que podrían ser resultado de un proceso de selección mediado por el ambiente.

3. Adaptación local

Numerosos estudios han documentando diferencias morfológicas y fisiológicas entre poblaciones de una misma especie (ver citas en Bradshaw 1989), donde el supuesto central es que las diferencias entre las poblaciones representan *adaptaciones* al ambiente en que se encuentran (adaptación local). Adaptación es cualquier carácter morfológico, fisiológico, de desarrollo o comportamiento que amplía el éxito reproductivo y de sobrevivencia de un organismo (Lincoln et al. 1995). Como se mencionó en la introducción, la adaptación local puede estar determinada por dos tipos de mecanismos: diferenciación genética y plasticidad fenotípica, existiendo dos aproximaciones experimentales para discriminar entre ambos: experimentos en ambientes comunes y experimentos de trasplantes.

La gran mayoría de los estudios que han documentado adaptaciones locales entre poblaciones se han referido a rasgos morfológicos o fisiológicos (Bradshaw 1989), especialmente cuando los estudios se han realizado a lo largo de gradientes altitudinales (e.g., fotosíntesis y respiración: Chapin & Chapin 1981, Chapin & Oechel 1983, tasa de crecimiento: McGraw & Antonovic 1983, Prock & Körner 1996).

Con relación a aspectos de desarrollo como la germinación de semillas varios estudios han documentado variaciones en los patrones de germinación dentro de una misma especie que se correlacionan con cambios en el ambiente (Probert *et al.* 1985, Inoue & Washitani 1989, Meyer *et al.*, 1989, 1990, 1997, Meyer & Monsen 1991, Meyer & Kitchen 1994, Schütz & Milberg 1997). Sin embargo pocos han estudiado la relación entre variación en la respuesta de germinación con el ambiente en gradiente altitudinal (e.g., van der Vegte 1978, Barclay & Crawford 1984, Borghetti *et al.* 1989). Por otra parte, estos estudios se han realizado germinando semillas de diferentes procedencias en ambientes comunes simulados en laboratorio. Esta aproximación, si bien permite

discernir si una respuesta de germinación es plástica o fija para una procedencia, tiene la desventaja de que las posibles diferencias no necesariamente representan una adaptación. Esto se debe a que la respuesta de germinación en laboratorio puede ser diferente a la de terreno, ya que esta última está determinada por una multitud de factores que es imposible reproducir en laboratorio.

En *Phacelia secunda*, de los experimentos de germinación en un ambiente común en el laboratorio se aprecia que las semillas colectadas a diferentes altitudes no presentan respuestas de germinación similares, sino que dependiendo de la altitud de origen presentan un período de latencia característico para esa altitud. En *Phacelia secunda* a medida que las semillas provienen de mayor altitud, los períodos de estratificación requeridos son más prolongados. Meyer & Mosen (1992) y Meyer *et al.* (1997) han sugerido que en una misma especie, semillas de poblaciones que crecen en zonas con inviernos largos y prolongada duración de la cubierta de nieve deberían requerir períodos de estratificación más largos que poblaciones que crecen en zonas con inviernos menos estresantes. Al requerimiento de mayor tiempo de estratificación permitiría a la semilla “medir” el tiempo que permanece bajo la cubierta de nieve, posponiendo la germinación hasta una época más favorable. El requerimiento de estratificación para germinar también impide la germinación precoz en otoño. En consecuencia, podría postularse que la necesidad de períodos de estratificación más largos en las semillas de mayores altitudes sería una adaptación para no germinar precozmente, evitando los riesgos que ello significa (Billings & Mooney 1968), y posponer la germinación hasta que se halla derretido la cubierta de nieve.

En los experimentos de germinación en laboratorio, también se aprecian diferentes respuestas al termoperíodo. Las semillas provenientes de los niveles altitudinales de mayor altitud (2.900 y 3.400 m) mostraron porcentajes de germinación significativamente mayores bajo el régimen

térmico 20°/10°C que 10°/5°C. En contraste, las semillas de las altitudes más inferiores (1.600 y 2.200 m) no muestran diferencias en la germinación entre los regímenes térmicos usados, incluso después de 2 meses de estratificación las semillas de 1.600 m germinan mejor en el régimen de menor temperatura. Varios estudios documentan que en muchas especies de la tundra ártica o alpinas, las temperaturas óptimas para la germinación son sorprendentemente altas (20°-30°C), sugiriéndose que esto sería una estrategia para evitar una germinación precoz en primavera cuando las temperaturas no son muy altas y las heladas nocturnas son aun muy frecuentes, retrasando la germinación hacia mediados o fines de primavera cuando la temperatura ambiente es más elevada y las probabilidades de que las plántulas sean afectadas por las heladas son menores (Billings & Mooney 1968, Sayers & Ward 1966, Chabot & Billings 1971, Marchand & Roach 1980, Kibe & Mazusawa 1993). La capacidad de germinación a bajas temperaturas en semillas de 1.600 m podría ser ventajosa en ambientes de menor altitud como es el Bosque esclerófilo montano, donde el riesgo de muerte de las plántulas aumenta rápidamente con el progreso de la época estival (Peñaloza 1996). Las plántulas que emergen más temprano tienen más tiempo para desarrollar un sistema radicular adecuado para obtener agua de las capas más profundas del suelo con lo cual tendrían mayores posibilidades de superar exitosamente las estresantes condiciones de verano.

Considerando que semillas de diferentes procedencias responden en forma distinta a un mismo factor en laboratorio, se sugiere que dichas respuestas de germinación representan una adaptación local en las poblaciones, y que esta adaptación es producto de una diferenciación genética y no de una plasticidad fenotípica.

Gracias al sistema de entierros recíprocos utilizados en esta tesis, se ha demostrado que

estos patrones de germinación y formación de BSP, se mantienen en forma independiente del sitio donde se entierran las semillas. Además, este patrón se mantiene aun con semillas producidas en temporadas diferentes, lo cual confirma que dichas respuestas de germinación tanto en laboratorio como en terreno representan un alto grado de *adaptación local* en las poblaciones. Esta adaptación local sería producto de una diferenciación genética y no de una plasticidad fenotípica.

El origen de esta diferenciación genética en un gradiente tan corto (1.800 m de diferencia en altitud) se debería a la baja probabilidad de intercambio genético entre las poblaciones ubicadas a diferentes altitudes. En *Phacelia secunda*, existe un fuerte desfase en la fenología de floración de esta especie a lo largo del gradiente de altitudinal (Arroyo et al. 1981), de modo que la época en que podría ocurrir intercambio de genes vía polen no coincide entre las poblaciones ubicadas en los extremos del gradiente. Por otra parte, *Phacelia secunda* es una especie polinizada por insectos, donde el ensamble de polinizadores presentes en cada altitud son muy diferentes (Arroyo et al. 1982, Cavieres et al. 1998b). Por último, las semillas de *Phacelia secunda* no presentan adaptaciones morfológicas que permitan suponer una dispersión de semillas a gran distancia. En consecuencia, considerando los desfases fenológicos, las diferencias en los ensambles de polinizadores y la baja dispersabilidad de las semillas, parece probable la formación de poblaciones con un alto grado de diferenciación genética a lo largo del gradiente altitudinal.

La ocurrencia de diferenciaciones locales en gradientes cortos en ambientes alpinos ha sido documentada con anterioridad. Galen *et al.* (1991) en un estudio realizado en poblaciones de *Polemonium viscosum* separadas por 1,5 km en un gradiente de altitud en Pennsylvania Mountain, Colorado, demuestran grandes diferencias en la constitución genética de las poblaciones. Los autores además documentan desfases en la fenología de floración entre las poblaciones y diferencias en los

ensambles de polinizadores que visitan las flores en ambas poblaciones. Estas diferencias sugieren que las posibilidades de flujo génico entre las poblaciones son muy bajas, lo que explicaría el alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones.

La capacidad de amplitud ambiental en la distribución de una especie está muy ligada a su capacidad de evolucionar poblaciones adaptadas a diferentes ambientes (Bradshaw 1989).

La amplia distribución tanto latitudinal como altitudinal que presenta *Phacelia secunda*, y su capacidad de habitar en ambientes muy contrastantes no se debería a una alta plasticidad fenotípica intrínseca de la especie (e.g., Deginani 1982), sino a la capacidad de formar poblaciones diferenciadas genéticamente y localmente adaptadas a su medio ambiente, al menos en las respuestas de germinación y capacidad de formar BS.

4. Factores que determinan la latencia en *Phacelia secunda*

Para que una especie forme un BSP, las semillas deben presentar latencia, ya sea esta innata o forzada de modo que la longevidad de sus semillas enterradas en el suelo pueda exceder un año (Baker 1989).

Se definió la latencia forzada como la incapacidad de germinar producto de la falta de un factor ambiental importante (e.g., falta de agua, luz, temperatura). En los experimentos de germinación en laboratorio, las semillas de *Phacelia secunda*, fueron regadas en forma sistemática y mantenidas entre dos capas de toalla absorbente de modo que los resultados no dependieran de la carencia del factor agua. A pesar de diferencias en las magnitudes, en forma independiente de la altitud de origen, las semillas de *Phacelia* germinan en diferentes regímenes térmicos. Estos regímenes de temperatura ocurren en forma natural en terreno. Por otro lado, las semillas,

independiente de la altitud en que fueron colectadas, no dependen de luz para germinar. Considerando este serie de antecedentes, se descarta la presencia de latencia forzada por el ambiente en semillas de *Phacelia secunda*, en forma independiente de la altitud en que son colectadas. Por el contrario, considerando el incremento en la germinación con la presencia de estratificación, el tipo de latencia que expresan las semillas de *Phacelia secunda* sería innata.

Uno de los aspectos importantes de la latencia innata en la germinación de semillas es, sincronizar la germinación hacia la estación favorable para el establecimiento de las plántulas emergentes (Leopold 1996).

En ambientes alpinos, si las semillas germinan inmediatamente después de ser dispersadas, las plántulas emergentes podrían ser dañadas por las temperaturas congelantes que muchas veces ocurren entre mediados de otoño y comienzos del invierno (Billings & Mooney 1968). Se podría esperar entonces encontrar latencia en las semillas de especies alpinas como un mecanismo protector contra la germinación prematura. Amen (1966), en una pionera revisión de los requerimientos de germinación en especies alpinas, estableció que sólo un 40% de las 60 especies estudiadas en ese entonces, presentaban latencia. De estas especies, muy pocas requerían de estratificación para romper la latencia y comenzar la germinación. Resultados similares han sido documentados por Marchand & Roach (1980) en 3 especies alpinas (*Arenaria groenlandica*, *Juncus trifidus* y *Potentilla tridentata*) donde no se requiere de estratificación para germinar. Otros estudios en cambio, han demostrado que la estratificación en frío permite y mejora la germinación en muchas especies de plantas alpinas (Chabot & Bliss 1972, Bell & Bliss 1980, Reynolds 1984). Por ejemplo, Bell & Bliss (1980) señalan que estratificación a 2°C mejora los rendimientos de germinación en 10 especies de plantas de la zona alpina de Alaska. Reynolds

(1984) demuestra que estratificación a 4°C incrementa la germinación en 3 especies anuales de las Rocky Mountains.

Amen (1966) encontró que el mecanismo principal de latencia de semillas para especies alpinas era por inhibición de la testa. La testa de las semillas puede inhibir la germinación por restricción mecánica o por inhibición química. En la restricción mecánica, el embrión es incapaz por si sólo de romper la testa para emerger, razón por la cual se requiere de agentes externos que fracturen o debiliten la testa de modo que el embrión pueda emerger. En la restricción química, la testa contiene compuestos químicos que inhiben la germinación, los cuales deben ser liberados de la testa para que el proceso de germinación pueda ocurrir en forma normal.

Bliss & Amen (1970) documentaron la presencia de inhibidores en la testa de semillas de *Luzula spicata* y *L. parviflora*. De acuerdo a estos autores, la liberación de estos inhibidores se produciría por medio de una escarificación. Ellos postularon que la escarificación de las semillas se produciría por repetidos eventos de congelación y derretimiento del agua contenida en la testa (criofracturación). Esta criofracturación de la testa permitiría la salida del inhibidor, gatillando la germinación de las semillas.

Dorne (1981) en un estudio realizado en semillas de *Chenopodium bonus-henricus* colectadas a diferentes altitudes en un gradiente altitudinal, también encontró una relación positiva entre altitud en que son colectadas y el grado de latencia que presentan las semillas. En este caso la latencia estaba impuesta por compuestos fenólicos presentes en la testa de las semillas. Dorne (1981) encontró a su vez, un aumento en el espesor de la testa con la altitud del sitio de colecta, lo cual además de representar una restricción mecánica, va asociado a un mayor contenido de fenoles.

La familia Hydrophyllaceae, a la cual pertenece *Phacelia secunda*, pertenece a un grupo de familias donde la latencia de las semillas está determinada principalmente por la testa, ya sea por restricción física o por la presencia de compuestos químicos inhibidores de la germinación (Silvertown 1984). La presencia de latencia determinada por la testa de las semillas en *Phacelia secunda* sería muy probable. En efecto, en semillas de *Phacelia secunda*, aunque no existe una variación altitudinal significativa en el grosor de la testa de las semillas (Fig. 24), es posible apreciar una tendencia al aumento del grosor de la testa con la altitud del sitio de colecta sugiriendo la presencia de algún grado de restricción mecánica de la testa hacia mayores altitudes. En este caso la latencia se perderá por eventos de criofracturación de la testa. En consecuencia, estas semillas podrían estar en el suelo mucho tiempo en espera de las condiciones que le permitan salir de su latencia y germinar. Este tipo de latencia que permite a las semillas de una especie permanecer mucho tiempo en el suelo ha sido denominada “latencia entre años” (between-year seed dormancy, Evans & Cabin 1995).

De acuerdo a lo encontrado en esta tesis, en *Phacelia secunda* existiría por un lado una latencia que permite retrasar la germinación hasta la época favorable (requerimientos de estratificación y mayores temperaturas). Esta latencia “intra-anual” (within-year seed dormancy, *sensu* Evans & Cabin (1995)) se expresa en todas las semillas de *Phacelia*, en forma independiente de la procedencia de estas, aunque su duración aumenta con la altitud a la que es colectada la semilla. Por otro lado, existe una “latencia entre años”, que sólo se expresa en las semillas de mayores altitudes. La presencia de este tipo de latencia es la que permite la formación de BSP (cf. Thompson y Grime 1979) y explorar la variabilidad del ambiente en forma temporal (Meyer *et al.* 1998).

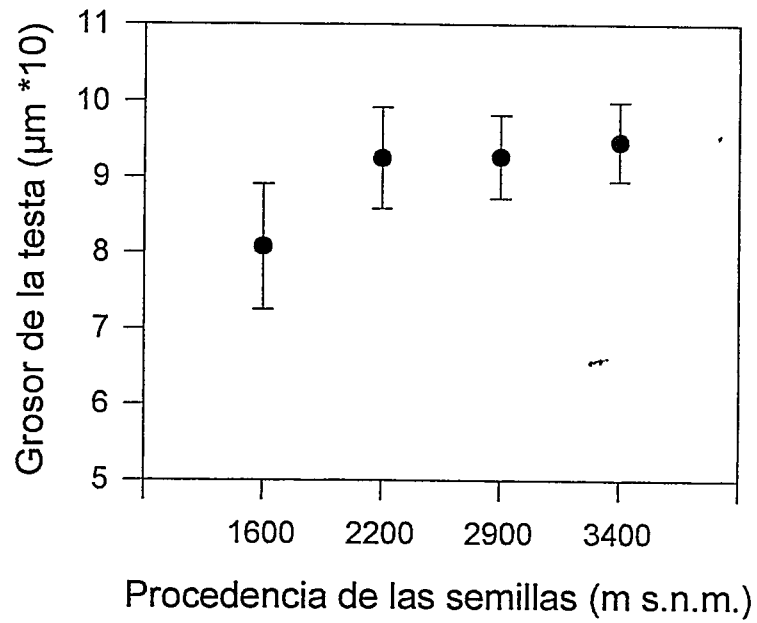


Figura 24. Variación altitudinal del grosor de la testa de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S).

En resumen, en esta tesis se ha encontrado que en *Phacelia secunda*, existe una marcada tendencia a que las semillas tengan una mayor latencia hacia mayores altitudes. Esto permite la formación de BS más persistentes hacia mayores altitudes. Esta diferenciación en la capacidad de formar BSP sería una adaptación a las mayores fluctuaciones ambientales que ocurren con la altitud, representando una adaptación local de las poblaciones a su ambiente. Esta adaptación local estaría originada por una diferenciación genética entre las poblaciones de *Phacelia secunda* que crecen a diferentes altitudes. La exploración de los factores involucrados en la variación altitudinal en la latencia de las semillas sugieren que habría un aumento en la latencia innata de las semillas determinada por restricciones físicas y químicas de la testa. La amplia distribución que presenta *Phacelia secunda*, y su capacidad de habitar en ambientes muy contrastantes, se debería a la capacidad de formar poblaciones diferenciadas genéticamente y localmente adaptadas a su medio ambiente, al menos en las respuestas de germinación y capacidad de formar BS.

REFERENCIAS

- Aceituno P (1990) Anomalías climáticas en la región sudamericana durante los extremos de la oscilación austral. *Revista Geofísica* 32:65-78.
- Amen RD (1966) The extent and role of seed dormancy in alpine plants. *Quarterly Review of Biology* 41:271-281.
- Angevine MW & BF Chabot (1979) Seed germination syndromes in higher plants. In OT Solbrig, S Jain, GB Johnson & P Raven (Eds.) *Topics in Plant Population Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 188-206.
- Archibold OW (1980) Seed input as a factor in the regeneration of strip-mine wastes in Saskatchewan. *Canadian Journal of Botany* 58:1490-1495.
- Archibold OW (1984) A comparison of seed reserves in arctic, subarctic and alpine soils. *The Canadian Field-Naturalist* 98:337-344.
- Arroyo MTK & F Squeo (1990) Relationship between plant breeding systems and pollination. En S. Kawano (ed.) *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*, Academic Press, London, pp 205-227.
- * Arroyo MTK & P Uslar (1993) Breeding systems in a temperate mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in central Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111:83-102.
- * Arroyo MTK, JJ Armesto & C Villagrán (1981) Plant phenological patterns in the high andean cordillera of central Chile. *Journal of Ecology* 69:205-223.
- Arroyo MTK, R Primack & JJ Armesto (1982) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69:82-97.
- Arroyo MTK, JJ Armesto & R Primack (1985) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics & Evolution* 149:187-203.
- Arroyo MTK, LA Cavieres, C Castor & AM Humaña (1999) Soil seeds, persistent seed bank and standing vegetation in a high alpine site in the central Chilean Andes. *Oecologia* (en prensa).
- Barclay AM & RM Crawford (1984) Seedling emergence in the Rowan (*Sorbus aucuparia*) from an altitudinal gradient. *Journal of Ecology* 72:627-636.
- Baskin CC & JM Baskin (1988) Germination ecophysiology of herbaceous plant species in

- a temperate region. *American Journal of Botany* 75:286-305.
- Baskin CC & JM Baskin (1993) Seed germination ecology of two mesic woodland winter annuals *Hemophila aphylla* and *Phacelia ranunculacea* (Hydrphyllaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 120:29-37.
- Baskin CC & JM Baskin (1998) *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, New York.
- Baskin JM & CC Baskin (1971) Germination ecology of *Phacelia dubia* in Tennessee glades. *American Journal of Botany*, 58:98-104.
- Baskin JM & CC Baskin (1973) Delayed germination in seeds of *Phacelia dubia* var. *dubia*. *Canadian Journal of Botany* 51:2481-2486.
- Baskin JM & CC Baskin (1989) Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In M Allesio Leck, VT Parker & RL Simpson (Eds.), *Ecology of Soils Seed Banks*, Academic Press, San Diego, pp, 67-90.
- Baker HG (1989) Some aspects of the natural history of seed banks. In M Allesio Leck, VT Parker & RL Simpson (Eds.), *Ecology of Soils Seed Banks*, Academic Press, San Diego, pp 9-21.
- Bauert MR (1996) Genetic diversity and ecotypic differentiation in arctic and alpine populations of *Polygonum viviparum*. *Arctic and Alpine Research* 28:190-195.
- Bazzaz F (1991) Coping with a variable environment: habitat selection and response flexibility.
- Bell K & R Amen (1970) Seed dormancy in *Luzula spicata* and *L. Parviflora*. *Ecology* 51: 492-496.
- Bell K & LC Bliss (1979) Autoecology of *Kobresia bellardii*: why winter snow accumulation limits local plant distribution. *Ecological Monographs* 49:377-402.
- Bell K & LC Bliss (1980) Plant reproduction in a high arctic environment. *Arctic and Alpine Research* 12:1-10.
- Belsky, J & R Del Moral (1982) Ecology of an alpine-subalpine meadow complex in the Olympic Mountains, Washington. *Canadian Journal of Botany* 60:779-788.
- Bennington CC, JB McGraw & MC Vavrek (1991) Ecological genetic variation in seed banks. III. Phenotypic and genetic differences between young and old seed populations of *Luzula parviflora*. *Journal of Ecology* 79:627-643.

- Bewley JD & M Black (1982) Physiology and Biochemistry of Seeds. 2. Viability, Dormancy, and Environmental Control. Springer-Verlag, Berlin.
- Billings WD (1974a) Arctic and alpine vegetation: plant adaptation to cold summer climates. In JD Ives & RD Barry (Eds.), Arctic and Alpine Environments, Methuen, London, pp 403-443
- Billings WD (1974b) Adaptations and origins of alpine plants. Arctic and Alpine Research 6:129-142.
- Billings WD & HA Mooney (1968) The ecology of arctic and alpine plants. Biological Review 43:481-529.
- Bliss LC (1958) Seed germination in arctic and alpine species. Arctic 11:180-188.
- Bliss LC (1971) Arctic and alpine plant life cycle. Annual Review of Ecology and Systematics 2:405-438.
- Bliss LC (1985) Alpine. En WD Billings & HA Mooney (eds.) Physiological Ecology of North American Plant Terrestrial Communities, Chapman & Hall, New York, pp 41-65.
- Boninsegna, JA (1990) Santiago de Chile winter rainfall since 1220 as being reconstructed by tree rings. Quaternary of South America and Antarctic Peninsula 6:67-87.
- Borghetti M, GG Vendramin, R Giannini & A Schettino (1989) Effects of stratification, temperature, and light on germination of *Pinus leucodermis*. Acta Oecologia, Oecologia Plantarum 10:45-56.
- Bradbeer JW (1988) Seed Dormancy and Germination. Chapman & Hall, London.
- Bradshaw, A (1984) Ecological significance of genetic variation between populations. In: R Dirzo & J Sarukhán (eds.) Perspectives on Plant Population Ecology. Sinauer, Sunderland, pp 213-228.
- Brown JS & DL Venable (1986) Evolutionary ecology of seed-bank annuals in temporally varying environments. American Naturalist 127:31-47.
- Briggs, & Walter (1997). Evolutionary Biology of Plants. Chapman & Hall, New York
- Bryant, JP & E Scheinberg (1970) Vegetation and frost activity in an alpine fellfield on the summit of Plateau Mountain, Alberta. Canadian Journal of Botany 48:751-771.
- Cabin, RJ (1996) Genetic comparisons of seed bank and seedling populations on a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. Evolution 50:1830-1841.

- Cabin RJ, R Mitchell & D Marshall (1998) Do surface plant and soil seed bank populations differ genetically? A multipopulation study of the desert mustard *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 85:1098-1109.
- Cavieres LA, A Peñaloza, C Pápic & M Tambutti (1998a) Efecto nodriza del cojín *Laretia acaulis* (Cav.) Gill. et Hook. (Umbelliferae) en la zona alto-andina de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 337-347.
- Cavieres LA, A Peñaloza & MTK Arroyo (1998b) Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 55:1-10.
- Cavieres LA & MTK Arroyo (1999) Lapse-rate in the Río Molina valley, province of Santiago, central Chile (33°S). *Revista Geográfica Terra Australis* (aceptado).
- Chambers JC (1989) Seed viability of alpine species: variability within and among years. *Journal of Range Managements* 42:304-308.
- Chambers JC (1993) Seed and vegetation dynamics in an alpine herb field: effects of disturbance type. *Canadian Journal of Botany* 71:471-485.
- Chambers JC, JA MacMahon & RW Brown (1990) Alpine seedling establishment: the influence of disturbance type. *Ecology* 71:1323-1341.
- Chapin FS III & A Bloom (1976) Phosphate absorption: adaptation of tundra graminoids to a low temperature, low phosphorous environment. *Oikos* 26:111-121.
- Chapin FS III & MC Chapin (1980) Revegetation of an arctic disturbed site by native tundra species. *Journal of Applied Ecology* 17:449-456.
- Chapin FS III & MC Chapin (1981) Ecotypic differentiation of growth processes in *Carex aquatilis* along latitudinal and local gradients. *Ecology* 62:1000-1009.
- Chapin FS III & WC Oechel (1983) Photosynthesis, respiration, and phosphate absorption by *Carex aquatilis* ecotypes along latitudinal and local environmental gradients. *Ecology* 64:743-751.
- Cocucci SM, S Morgutti & AM Ranieri (1989) Effect of butyric acid on the germination of the seeds of *Phacelia tanacetifolia*. *Physiologia Plantarum* 76:17-23.
- Cohen D (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *Journal of Theoretical Biology* 12:119-129.
- Cohen D (1967) Optimizing reproduction in a randomly varying environment when a

- Galen C, JS Shore & H Deyoe (1991) Ecotypic divergence in alpine *Polemonium viscosum*: genetic structure, quantitative variation and local adaptation. *Evolution* 45:1218-1228.
- Grime JP (1979) *Plant Strategies and Vegetation Processes*. Jhon Wiley & Sons, New York.
- Grime JP & M Hillier (1992) The contribution of seedling regeneration to the structure and dynamic of plant communities and larger units of landscape. En M. Fenner (ed.) *Seeds, The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, C.A.B. International, pp 349-364.
- Grime JP, G Manson, AV Curtis, J Rodman, SR Band, MAG Mowforth, AM Neal & S Shaw (1981) A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology* 69:1017-1059.
- Guariguata MR & A Azocar (1988) Seed bank dynamics and germination ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an andean giant rosette. *Biotropica* 20:54-59.
- Hendry GA & JP Grime (1993) *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman & Hall, London.
- Hendry GA, K Thompson, CJ Moss, E Edwards & PC Thorpe (1994) Seed persistence: a correlation between seed longevity in the soil and *ortho*-dihydroxyphenol concentration. *Functional Ecology* 8:658-664.
- Hickman JC (1979) Environmental unpredictability and plastic energy allocation strategies in the annual *Polygonum cascadense* (Polygonaceae).
- Ingersoli Ch & M Wilson (1993) Buried propagule bank of a high subalpine site: microsite variation and comparisons with aboveground vegetation. *Canadian Journal of Botany* 71:712-717.
- Inoue K & I Washitani (1989) Geographical variation in thermal germination responses in *Campanula punctata* Lam. *Plant Species Biology* 4:69-74.
- Johnson PL & WD Billings (1962) The alpine vegetation of the beartooth plateau in relation to cryopedogenic process and patterns. *Ecological Monographs* 32:105-135.
- Kaluz S & GM Wardle (1994) Life history variation in *Campanula americana* (Campanulaceae): Population differentiation. *American Journal of Botany* 81:521-527.
- Kibe T & T Masuzawa (1994). Seed germination and seedling growth of *Carex doenitzii* growing on alpine zone of Mt. Fuji. *Journal of Plant Research* 107:23-27.

Klinkhamer PG, T de Jong, J Metz & J Val (1987). Life history tactics of annual organisms: The joint effects of dispersal and delayed germination. *Theoretical Population Biology* 32:127-156.

Komárková, V (1993) Vegetation type hierarchies and landform disturbance in arctic Alaska and alpine Colorado with emphasis on snowpatches. *Vegetatio* 106:155-181.

Kudo G (1991). Effects of snow-free period on the phenology of alpine plants inhabiting snow patches. *Arctic and Alpine Research* 23:436-443.

Ledig FT & DR Korbobo (1983) Adaptation of sugar maple populations along altitudinal gradients: photosynthesis, respiration, and specific leaf weight. *American Journal of Botany* 70:256-265.

Leopold AC (1996) Natural history of seed dormancy. In: GA Lang (ed.) *Plant Dormancy*, CAB International, Willingford. pp:3-16.



León P (1991) Efecto del espaciamento entre plantas de *Kageneckia angustifolia* D Don (Rosaceae). Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Levin D (1990) The seed bank as a source of genetic novelty in plants. *American Naturalist* 135:563-572.

Lincoln RJ, P Boxshall & PF Clark (1995) *Diccionario de Ecología, Evolución y Taxonomía*. Fondo de Cultura Económica, México.

Lonsdale WM, KL Harley & JD Gillett (1988) Seed bank dynamics in *Mimosa pigra*: an invasive tropical shrub. *Journal of Applied Ecology* 25:963-976.

Marchand PJ & DA Roach (1980) Reproductive strategies of pioneering alpine species: seed production, dispersal and germination. *Arctic & Alpine Research* 12:137-146.

Matson PA & PM Vitousek (1981) Nitrification potentials following clearcutting in the Hoosier National Forest, Indiana, *Forest Science* 27:781-791.

McGraw JB (1980) Seed bank size distribution of seeds in cottongrass tussock tundra, Eagle Creek, Alaska. *Canadian Journal of Botany* 58:1607-1611.

McGraw JB (1986) Seedbank properties of an Appalachian sphagnum bog and a model of depth distribution of viable seeds. *Canadian Journal of Botany* 65:2028-2035.


McGraw JB (1993) Ecological genetic variation in seed banks. IV. Differentiation of extant and seed bank-derived populations of *Eriophorum vaginatum*. *Arctic & Alpine Research* 25:45-49.

- McGraw JB & GR Shaver (1982) Seedling density and seedling survival in Alaskan cotton grass tussock tundra. *Holarctic Ecology* 5:212-217.
- McGraw JB & J Antonovics (1983) Experimental ecology of *Dryas octopetala* ecotypes. I. Ecotypic differentiation and life-cycle stages of selection. *Journal of Ecology* 74:379-897.
- McGraw JB & MC Vavrek (1989) The role of buried viable seeds in arctic and alpine plant communities. In M Allesio Leck, VT Parker & RL Simpson (eds.), *Ecology of Soils Seed Banks*, Academic Press, San Diego, pp 91-105.
- Meyer S & SB Monsen (1991) Habitat-correlated variation in mountain big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *vayesana*) seed germination patterns. *Ecology* 72:739-742.
- Meyer S & SG Kitchen (1994). Life history variation in blue fax (*Linum perenne*: Linaceae): seed germination phenology. *American Journal of Botany* 81:528-535.
- Meyer S, ED McArthur & G Jorgesen (1989) Variation in germination response to temperature in rubber rabbitbrush (*Chrysothamnus nauseosus*, Asteraceae) and its ecological implications. *American Journal of Botany* 76:981-991.
- Meyer S, SB Monsen & DE McArthur (1990) Germination response of *Artemisia tridentata* (Asteraceae) to light and chill: Patterns of between-population variation. *Botanical Gazette* 151:176-183.
- Meyer S, PS Allen & J Beckstead (1997) Seed germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. *Oikos* 78:475-485.
- Meyer S, SI Carlsson & S Garvin (1998) Seed germination regulation and field seed bank carryover in shadescale (*Atriplex confertifolia*: Chenopodiaceae). *Journal of Arid Environments* 38:255-267.
- Miller GR & RP Cummins (1987) Role of buried viable seeds in the recolonization of disturbed ground by heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) in the Cairngorm Mountains, Scotland, U.K. *Arctic and Alpine Research* 19(4):396-401.
- Morin H & S Payette (1988) Buried seed populations in the montane, subalpine, and alpine belts of Mont Jacques-Cartier, Quebec. *Canadian Journal of Botany* 66:101-107.
- Moore RP (1973) Tetrazolium staining for assessing seed quality. In W Heydecker (Ed.) *Seed Ecology*, The Pennsylvania State University Press, pp
- Murdoch AJ & RH Ellis (1992) Longevity, viability and dormancy. In M Fenner (Ed.), *Seeds, The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, C.A.B. International, pp

193-229.

Onipchenko, V.G., Semenova, G. & Van Der Maarel, E. (1998) Population strategies in severe environments: alpine plants in the northwestern Caucasus. *Journal of Vegetation Science* 9:27-40.

Pavone LV & RJ Reader (1982) The dynamics of seed bank size and seed state of *Medicago lupulina*. *Journal of Ecology* 70:537-547.

 Peñaloza A (1996) Consideraciones microclimáticas en la sobrevivencia de semillas y plántulas de *Kageneckia angustifolia* Don una especie del bosque montano de Chile central. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Peterson MA (1995) Phenological isolation, gene flow and developmental differences among low-and high-elevation population of *Euphilotes enoptes* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Evolution* 49:446-455.

Philippi T (1993a) Bet-hedging germination of desert annuals: variation among populations and maternal effects in *Lepidium lasiocarpum*. *American Naturalist* 142:489-507.

Philippi T (1993b) Bet-hedging germination of desert annuals: beyond the first year. *American Naturalist* 142:474-487.

Pirovano L, S Morgutti, L Espen & S Cocucci (1996) Differences in transcription products and in translation end enzymatic activities during the early stages of imbibition of *Phacelia tanacetifolia* seeds with germination inhibited by light. *Physiologia Plantarum* 96:714-721.

Potvin (1994) ANOVA: Experiments in controlled environments. En S Scheiner & J Gurevitch (eds.) *Design and Analysis of Ecological Experiments*. Chapman & Hall Pub, New York.

Rees M (1994) Delayed germination of seeds: A look at the effects of adult longevity, the timing of reproduction, and population age/stage structure. *American Naturalist* 144:43-64.

Rees M (1996) Evolutionary ecology of seed dormancy and seed size. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 351:1299-1308.

Retzer JL (1973) Alpine soils. In; JD Ives & RD Barry (Eds.), *Arctic and Alpine Environments*, Methuen, London, pp 771-802.

Reynolds DN (1984) Alpine annual plants: phenology, germination, photosynthesis, and growth of three Rocky Mountain species. *Ecology* 65:759-766.

Rieger S (1973) Arctic soils. In JD Ives & RD Barry (Eds.), Arctic and Alpine Environments, Methuen, London, pp 749-769

Roach DA (1983) Buried seed and standing vegetation in two adjacent tundra habitats, northern Alaska. *Oecologia* 60:359-364.

Roff DA (1994) The Evolution of Life Histories, Chapman & Hill, New York

Ross JD (1996) Dormancy breakage by chilling: phytochrome, calcium and calmodulin. In: GA Lang (ed.) Plant Dormancy, CAB International, Willingford. pp:157-170.

Rozzi R, JD Molina & P Miranda (1989) Microclima y períodos de floración en laderas de exposición ecuatorial y polar en los Andes de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural*, 62:75-84.

Sanguinetti, R (1994) Anomalías térmicas: su relación con la pluviometría regional y con el efecto invernal en Chile. Tesis Magister: Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

* Santibañez F & Uribe (1990). Atlas Agroclimático de la V región y Región Metropolitana.

Sayers RL & RT Ward (1966) Germination responses in alpine species. *Botanical Gazette* 127:11-16.

Schilchting, D (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:667-693.

Schütz W & P Milberg (1997) Seed dormancy in *Carex canescens*: regional differences and ecological consequences. *Oikos* 78:420-428.

Scott D & WD Billings (1964) Effects of environmental factors on standing crop and productivity of an alpine tundra. *Ecological Monographs* 34:243-270.

Scott SJ, RA Jones & WA Williams (1984) Review of data analysis method for seed germination. *Crop Science* 24:1192-1199.

Silvertown JW (1982) Introduction to Plant Population Ecology. Longman, London.

Simpson R, M Leck & V Parker (1989) Seed banks: General concepts and methodological issues. In MA Leck, VT Parker & RL Simpson (eds.), *Ecology of Soils Seed Banks*, Academic Press, San Diego, pp 3-8.

Sork V, K Stowe & C Hochwender (1993) Evidence for local adaptation in closely adjacent subpopulations of northern red oak (*Quercus rubra* L.) expressed as resistance to leaf herbivores. *American Naturalist* 142: 928-936.

- Stanton ML & C Galen (1997) Life on the edge: adaptation versus environmentally mediated gene flow in the snow buttercup, *Ranunculus odoneus*. *The American Naturalist* 150:143-177.
- Stanton ML, M Rejmánek & C Galen (1994) Changes in vegetation and soil fertility along a predictable snowmelt gradient in the mosquito range, Colorado, USA. *Arctic and Alpine Research* 26:364-374.
- Steel R & J Torrie (1988) *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. McGraw & Hill, México.
- Templeton AR & D Levin (1979) Evolutionary consequences of seed pools. *American Naturalist* 114:232-249.
- Thompson PA, P Newman & PD Keefe (1979) Germination of species of *Alstroemeria* L. *Gartenbauwissenschaft* 44:91-102.
- Thompson K (1978) The occurrence of buried viable seeds in relation to environmental gradients. *Journal of Biogeography* 5:425-430.
- Thompson K (1992) The functional ecology of seed banks. In M Fenner (Ed.), *Seeds, The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, C.A.B. International, pp 231-258.
- Thompson K & JP Grime (1979) Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology* 67:893-921.
- Thompson K, JP Bakker, RM Bekker & JD Hodgson (1998) Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora. *Journal of Ecology* 86:163-169.
- Tonsor SJ, S Kalisz, J Fisher & TP Holtsford (1993) A life-history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution* 47:833-843.
- Vázquez-Yanes, C & A Orozco-Segovia (1996) Physiological ecology of seed dormancy and longevity. En: S Mulkey, R Chazdon & A Smith (eds.) *Tropical Forest Plant Ecology*, Thompson Publishing, New York, pp:535-558.
- Venable DL (1984) Using intraspecific variation to study the ecological significance and evolution of plant life-histories. In: R Dirzo & J Sarukhán (eds.) *Perspectives on Plant Population Ecology*. Sinauer, Sunderland, pp166-186.
- Venable DL (1989) Modeling the evolutionary ecology of seed banks. In MA Leck, VT Parker & RL Simpson (eds.), *Ecology of Soils Seed Banks*, Academic Press, San Diego, pp 67-86.

- Venable D & L Lawlor (1980) Delayed germination and dispersal in desert annuals: Escape in space and time. *Oecologia* 46:272-282.
- Van der Vegte FW (1978) Population differentiation and germination ecology in *Stellaria media* (L.) Vill. *Oecologia* 37:231-245.
- Vavrek MC, JB McGraw & CC Bennington (1991) Ecological genetic variation in seed banks. III. Phenotypic and genetic differences between young and old seed populations of *Carex bigelowii*. *Journal of Ecology* 79:645-662.
- Via S (1993) Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *American Naturalist* 142:353-365.
- Via S, R Gomulkiewicz, G. De Jong, S Scheiner, CD Schlichting, P Van Tienderen (1995). Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 212-217.
- Villalba, R (1990) Latitude of the surface high-pressure belt over western South America during the last 500 years as inferred from tree-ring analysis. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* 7:273-303.
- Villiers TA (1973) Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: W Heydecker (ed.) *Seed Ecology*. The Pennsylvania State University Press, London, pp 265-288.
- Vitousek PM (1985) Community turnover and ecosystem nutrient dynamics. In STA Pickett & PS White (eds.). *The Ecology of Natural Disturbances and Patch Dynamics*. Academic Press, New York.
- Vleeshouwers LM, HJ Bouwmeester & CM Karssen (1995) Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* 83:1031-1037.
- Walker MD, PJ Webber, EH Arnold & D Ebert-May (1994) Effects of interannual climate variation on aboveground phytomass in alpine vegetation. *Ecology* 75:393-408.
- Zhang J & MA Maun (1994) Potential for seed bank formation in seven Great Lakes sand dune species. *American Journal of Botany* 81:387-394.

Anexo: Variación altitudinal en la longevidad del banco de semillas

Tanto en 1995 como en 1996, en cada nivel altitudinal se enterraron adicionalmente 2 jaulas metálicas más con el propósito de desenterrarlas después de 2 años y 3 años de permanecer enterradas en el suelo. Con los datos de viabilidad de las semillas que permanecen intactas después de 2 y 3 años en el suelo, se estimó de la longevidad de las semillas en el suelo. Esto se realizó ajustando el número de semillas viables que contenían los sobres que fueron enterrados a tiempo 0, y después de 1, 2 y 3 años de permanecer enterradas. Sólo se utilizaron los valores del promedio aritmético obtenidos cuando las semillas eran enterradas en el mismo nivel en que fueron colectadas. Los modelos de pérdida de la viabilidad analizados fueron el modelo exponencial y el modelo hiperbólico (*sensu*, Murdoch & Ellis 1992):

$$\text{Modelo exponencial } S(t) = S_0 e^{-gt}$$

$$\text{Modelo hiperbólico } S(t) = a/t + b$$

Donde:

S_0 es la viabilidad inicial de las semillas

g es una constante de decaimiento exponencial

a y b son constantes de ajuste de los modelos

t es el tiempo (en este caso días) transcurrido en la situación experimental.

El ajuste de los datos a estos modelos se realizó con el módulo de estimaciones no-lineares del programa estadístico STATISTICA (v 4.3, 1992), donde se utilizó el método de Quasi-Newton para la

estimación de parámetros de los modelos. En cada caso se escogió aquel modelo donde se obtuviera el mayor valor de R y la mayor proporción de varianza explicada. Finalmente, se determinó en cada caso el tiempo promedio que demora en perderse la viabilidad total de las semillas originalmente enterradas, estimando de este modo la longevidad potencial del BSP.

Tanto en 1995 como en 1996, se aprecia un fuerte decaimiento del número de semillas con el tiempo que han permanecido enterradas (Fig. a1). En ambos años de entierro, las mayores pérdidas de viabilidad corresponden a semillas de 1.600 m, donde después de un año casi no quedan semillas viables (Fig.A1). Esto se debe a que la gran mayoría de las semillas germinó, quedando muy pocas semillas en el suelo, de las cuales la gran mayoría no era viable. En semillas de 2.200 m también se aprecia una rápida disminución de la viabilidad después de un año, posteriormente el número de semillas viables desciende en forma menos abrupta llegando a 0 después de 2 años (Fig. A1). Semillas de las altitudes superiores (2.900 y 3.400) presentan una disminución de la viabilidad mucho más lenta, especialmente en aquellas semillas enterradas en 1995. En estas semillas valores de viabilidad cercanos a 0 sólo se alcanzan después de 3 años (Fig. A1), lo que se debe principalmente a los altos porcentajes de germinación que han alcanzado estas semillas después de permanecer 3 años enterradas. En resumen, existe una clara tendencia a mantener un mayor número de semillas viables por unidad de tiempo en las semillas de mayor altitud.

En relación a las estimaciones de la longevidad de las semillas al ser enterradas en la misma altitud en la que fueron colectadas, el modelo exponencial de decaimiento de la viabilidad es el que se ajusta mejor a los datos, explicando en todos los casos más del 99% de la varianza (Tabla A1). El modelo hiperbólico, aunque explica más del 80% de la varianza en todos los casos, los coeficientes de correlación son siempre menores que en el modelo exponencial (Tabla A1).

En las ecuaciones obtenidas con el ajuste al modelo exponencial, en ambos años de entierro, es posible apreciar una disminución de la constante de decaimiento con la altitud de la cual provienen las semillas. Esto se traduce a que la longevidad potencial de los bancos de semillas que se forman en cada nivel altitudinal aumenta con la altitud (Fig. A2). A 1.600 m, la longevidad de las semillas es de 421 y 399 días en semillas enterradas en 1995 y 1996, respectivamente. A 2.200 m, la longevidad en semillas de enterradas en 1996 es de 687 días, es decir, casi 2 años. A 2.900 m, la longevidad de las semillas es 1.349 y 1.057 días en semillas enterradas en 1995 y 1996, respectivamente. En este caso la longevidad de las semillas varía entre 3 a 4 años. A 3.400 m, la longevidad de las semillas es de 2.059 y 1.505 días en semillas enterradas en 1995 y 1996, respectivamente. Es decir, la longevidad en este caso fluctúa entre 4 a 6 años.

Tabla A1. Ajuste de la variación temporal en el número de semillas viables a modelos de pérdida de la viabilidad en semillas de *Phacelia secunda* colectadas y enterradas en forma experimental a diferentes altitudes.

1995

Altitud (m s.n.m.)	Modelo exponencial			Modelo hiperbólico		
	ecuación	r	Var.exp	ecuación	R	Var. Exp.
1.600	$S(t)=50e^{-0,0093T}$	1,0	100	$S(t)=505,95/10,11 + t$	0,999	99,96
2.200	-	-	-	-	-	-
2.900	$S(t)=50e^{-0,0029T}$	0,999	99,87	$S(t)=7282,6/145,07 + t$	0,984	96,88
3.400	$S(t)=50e^{-0,0019T}$	0,976	95,29	$S(t)=14119,8/276,74 + t$	0,937	87,71

1996

Altitud (m s.n.m.)	Modelo exponencial			Modelo hiperbólico		
	ecuación	r	Var.exp	ecuación	r	Var. Exp.
1.600	$S(t)=50e^{-0,0098T}$	1,0	100	$S(t)=415,3/8,31 + t$	0,999	99,98
2.200	$S(t)=50e^{-0,0057T}$	0,999	99,95	$S(t)=2008,3/40,16 + t$	0,997	99,40
2.900	$S(t)=50e^{-0,0037T}$	0,999	99,99	$S(t)=5143,4/102,77 + t$	0,994	98,85
3.400	$S(t)=50e^{-0,0026T}$	0,999	99,79	$S(t)=9139,67/182,53 + t$	0,997	99,48

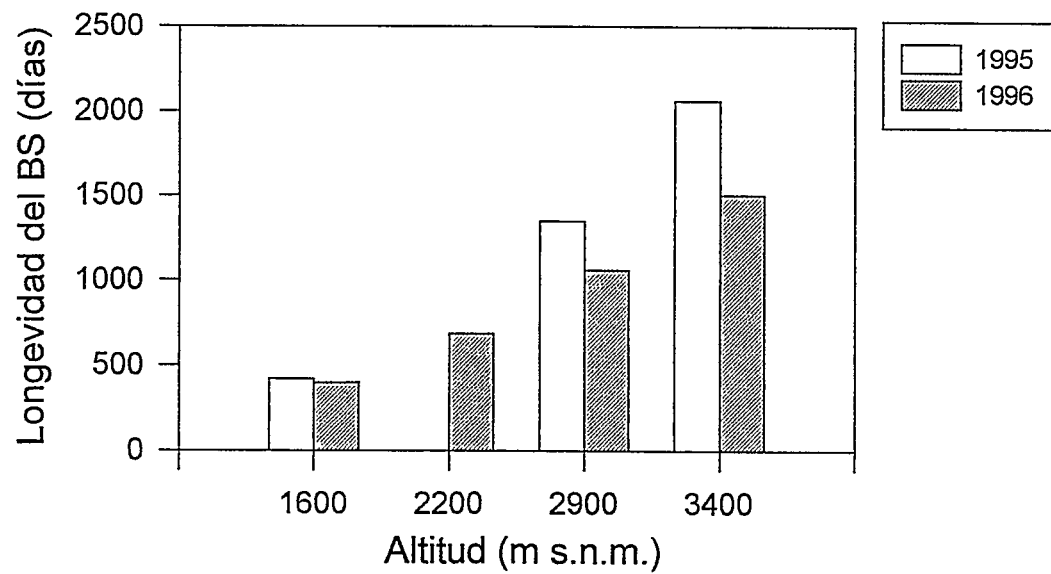


Figura A2. Variación altitudinal de la longevidad estimada del Banco de semillas de *Phacelia secunda* en los Andes de Chile central (33°S), basado en experimentos de entierro de semillas realizados en 1995 y 1996.

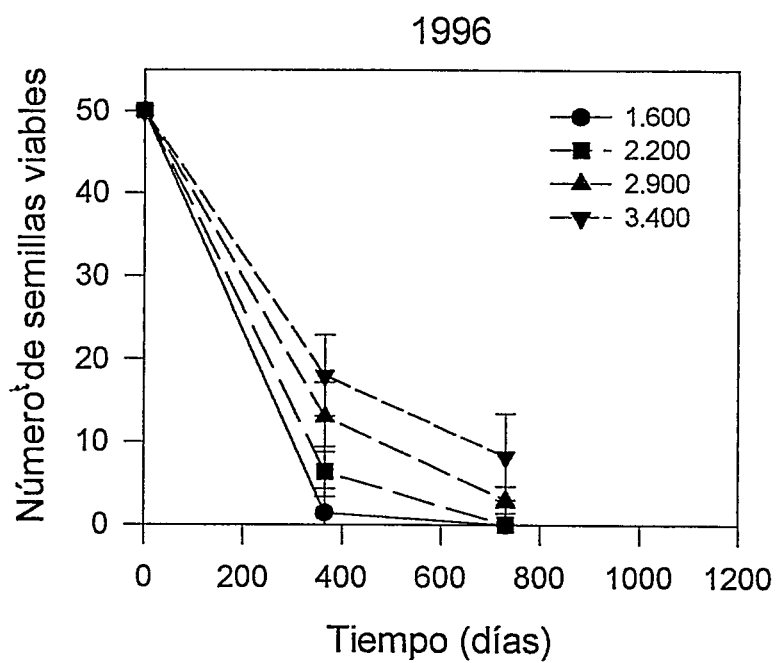
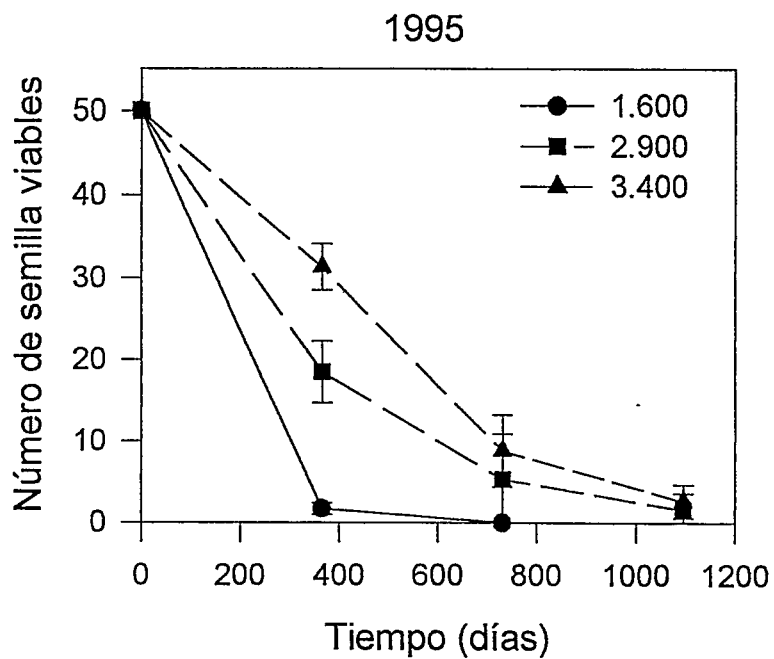


Figura A1: Variación del número de semillas viables con el tiempo, en semillas de *Phacelia secunda* (± 2 E.E.) colectadas a diferentes altitudes y enterradas experimentalmente en la misma altitud de origen.