



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Agronomía

**Efecto de la radiación ultravioleta- B sobre la capacidad
de germinación y desarrollo del tubo polínico en polen de
Gevuina avellana Mol. (Proteaceae)**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Agronomía.

Christian Mauricio Balkenhol Neumann

Valdivia Chile 2002

PROFESORES PATROCINANTES

FIRMA

Magaly Riveros G.

Prof. de Biología y Química, Dr. en Ciencias

Susan Hess, F.

Lic. en Ciencias, Mag. en Química, Ph. D. in Chemistry

PROFESOR INFORMANTE

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

.....puede el árbol
ser árbol,
sin la tierra, la luz,
el agua, el aire ??????

".....y era cierto. Siempre me había gustado el
desierto. Uno se sienta en una duna de arena. No se
ve nada. No se oye nada. Y sin embargo, hay algo
que irradia en silencio....."

Lo que hace bello al desierto -dijo el Principito-, es
que en algún lugar esconde un pozo de agua...."

Antoine de Saint-Exupéry

Mis agradecimientos son para muchos pero en especial para.....

.....mis papas Teresita y Hardy, mis hermanos Marco y Loreto, mis abuelitos Augusta y Jose, mis tíos A. del Rosario, Juanito, Jano, Andrés, Maggie, Pancho, Carmen y Rigo. A mis Profesores Sra. Magali Riveros, Sra. Susan Hess y Don Miguel Neira. A mis amigos Coté, Torombolo, Pedroca, Daniel, Rodrigo, Pedro L., Lucho, Carmen, Carolina, José, Carlitos, Marcelo, Victor, Silvia, Claudia, Paola y a todo el Inst. De Botánica.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	La radiación solar	4
2.2	Naturaleza física de la luz	4
2.2.1	Espectro electromagnético	5
2.3	Radiación fotosintéticamente activa	6
2.4	Ozono	7
2.4.1	Debilitamiento de la capa de ozono	8
2.4.2	Niveles actuales y futuros de ozono	10
2.5	Radiación ultravioleta	12
2.5.1	Radiación ultravioleta-B	15
2.5.1.1	Efectos de la radiación ultravioleta-B en las plantas	15
2.5.1.1.1	Efectos de la radiación ultravioleta-B en polen	20
2.6	Relación fotónica PAR:UV-A:UV-B	22
2.7	<i>Gevuina avellana</i> Mol.	23
2.7.1	Aspectos generales	23
2.7.1.1	Distribución y hábitat	23
2.7.1.2	Usos	25
2.7.2	Clasificación taxonómica	27
2.7.3	Descripción botánica	27
2.7.3.1	Polen	29
2.5.2.1.1	Polen de <i>G. avellana</i> Mol.	32

3	MATERIAL Y MÉTODO	34
3.1	Material	34
3.1.1	Ubicación	34
3.1.2	Material vegetal	34
3.1.3	Lugar de recolección	34
3.1.4	Material de colecta	34
3.1.5	Material de laboratorio	35
3.1.5.1	Medio de cultivo	35
3.1.5.2	Cubreobjetos	35
3.1.5.3	Radiación solar con UV-B en exceso	36
3.1.5.4	Ocular micrométrico	36
3.2	Método	37
3.2.1	Época de recolección	37
3.2.1.1	Recolección y selección del material vegetal	37
3.2.2	Cuantificación de granos de polen	38
3.2.3	Ensayos de germinación	38
3.2.4	Determinación de viabilidad	38
3.2.5	Manejo de polen	39
3.2.5.1	Cultivo del polen	39
3.2.5.2	Radiación con Ultravioleta-B (UV-B)	39
3.2.5.3	Manejo post-tratamiento	40
3.2.6	Diseño experimental	40
3.2.7	Parámetros a medir	40
3.2.7.1	Evaluación de la germinación	40
3.2.7.2	Evaluación de la longitud de tubo polínico	41
3.2.8	Análisis estadístico	41
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	42
4.1	Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la germinación (%) en polen de	

	<i>Gevuina avellana</i> Mol.	43
4.2	Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la longitud de tubo polínico (μm) en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	48
5	CONCLUSIONES	50
6	RESUMEN	52
	SUMMARY	54
7	BIBLIOGRAFÍA	56
	ANEXOS	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la germinación (%) y longitud de tubo polínico (μm) en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	42

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reacciones de Chapman	7
2	Reacciones de destrucción del ozono por los compuestos CFCs (caso del diclorofluorometano)	9
3	Reacciones de destrucción del ozono (caso de destrucción por bromo)	10
4	Estratas componentes de la pared del grano de polen	30
5	Granos de polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. cultivados en el medio de sacarosa utilizado en el ensayo	33
6	Granos de polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. germinados en el medio de sacarosa utilizado en el ensayo, con desarrollo de tubo polínico	33
7	Efecto de dos relaciones fotónicas sobre el porcentaje de germinación de polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. (Tukey 99%)	44
8	Efecto de dos tiempos de exposición sobre el porcentaje de germinación de polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. (Tukey 99%)	45
9	Efecto de la interacción relación fotónica-tiempo de exposición sobre el porcentaje de germinación en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. (Tukey 95%).	47

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Composición del reactivo para tinción diferencial de Alexander	66
2	Composición de los medios de cultivo utilizados en pruebas de germinación con polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	67
3	Espectro de transmitancia de radiación UV-B de los materiales acetato, mylar, cubreobjetos de vidrio (Corning) y transparencia para escribir (Schwan Stabilo PVC)	69
4	Distribución espectral de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre compuesta por radiación ultravioleta (UV-B, UV-A) y radiación fotosintéticamente activa (PAR), simulada por la fuente de radiación UV-B (Philips Q-Panel 313) y del filtro de acetato utilizado para filtrar las radiaciones UV-C (<280 nm) emitidas por la lámpara	70
5	Nivel de germinación (%) en los medios Brewbakwer y Kwack, Roberts y Hodgkin y Lyon. Además del elaborado según BAÉZ (1998) modificado (con 4 g de gelatina)	71
6	Análisis de Varianza para el parámetro porcentaje de germinación en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	73
7	Test de comparación de medias de Tuckey (99%) para el parámetro porcentaje de germinación en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. considerando dos relaciones fotónicas PAR:UV-A:UV-B	74
8	Test de comparación de medias de Tuckey (99%) para el	

	parámetro porcentaje de germinación en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol. considerando dos tiempos de exposición (h)	75
9	Análisis de varianza para el parámetro longitud de tubo polínico en polen de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	76

1. INTRODUCCION

Hace algunas décadas (fines de la década de 1970) se detectó por primera vez una disminución considerable de la capa de ozono sobre la Antártica, como consecuencia de la emisión a la atmósfera de compuestos clorofluorocarbonados provenientes de los aerosoles y sistemas de refrigeración. Durante los últimos años, este problema ha aumentado progresivamente, dando origen a un aumento de la radiación ultravioleta-B que alcanza la superficie terrestre.

El aumento de las radiaciones ultravioleta del tipo B (280- 320 nm) afectan a todos los seres vivos, pero especialmente a las plantas ya que estas dependen de la radiación solar para su existencia, de ahí que ante una variación de la radiación que llega a la superficie terrestre éstas se pueden ver más afectadas.

Las plantas, entre otros organismos, dependen de la existencia de la capa de ozono como barrera protectora contra la radiación ultravioleta. Este tipo de radiación puede generar alteraciones momentáneas (aclimatación) o permanentes (daño genético).

Tales alteraciones eran prácticamente desconocidas hasta el descubrimiento del grave debilitamiento de la capa de ozono alcanzado en la década de 1980. Las investigaciones en este tema se han centrado principalmente en cultivos agrícolas y en menor medida en especies nativas.

Las respuestas de las plantas a la radiación ultravioleta y específicamente a la radiación ultravioleta B incluyen cambios fisiológicos, bioquímicos, morfológicos y anatómicos. En general, la radiación UV-B afecta deletéreamente el crecimiento, reduciendo el tamaño de las hojas y limitando el área de captación de energía lumínica.

Adicionalmente, tal radiación afecta la síntesis de metabolitos secundarios que comprende una variedad de compuestos polifenólicos como la lignina, taninos e isoflavonoides que actúan como filtros naturales de la radiación UV-B. Además de alteraciones en el material foliar de la planta, diversas otras partes u órganos vegetales se ven también afectadas, entre ellas el polen, que corresponde a la estructura portadora del material genético de todo organismo y del cual no existe la certeza que presente algún mecanismo de protección a los cambios de radiación.

De ahí que sea importante conocer cómo el polen se ve afectado por la radiación UV-B, sobre todo si se trata de una especie como *Gevuina avellana* Mol., especie nativa de Chile de la cual existe poca información y que presenta un gran potencial.

Actualmente, dado los niveles de radiación UV-B que alcanzan la superficie terrestre y al breve período de vida de las estructuras florales, se ha observado que la radiación UV-B no afecta la capacidad germinativa ni el desarrollo del tubo polínico del polen de *G. avellana* Mol.

No obstante, el permanente deterioro de la capa de ozono y los mayores niveles de radiación UV-B que irán alcanzando la superficie terrestre, con el consiguiente mayor efecto nocivo sobre los organismos vivos, permite formular la hipótesis de que un aumento de la radiación UV-B puede afectar directamente, tanto la capacidad germinativa, como el desarrollo del tubo polínico del polen de *G. avellana* Mol. pese al breve tiempo de vida de su estructura floral.

Para probar tal hipótesis se plantea como objetivo general, evaluar el efecto de la radiación UV-B en polen de *G. avellana* Mol.

Como objetivo específico de esta investigación se considera irradiar el polen de *G. avellana* Mol. y evaluar el efecto que un exceso de radiación UV-B tiene a diferentes tiempos de exposición a dicha radiación sobre los siguientes parámetros:

- Porcentaje de germinación de polen con exceso de radiación UV-B (%)
- Porcentaje de germinación de polen sin exceso de radiación UV-B (%)
- Longitud del tubo polínico de polen con exceso de radiación UV-B (μm)
- Longitud del tubo polínico de polen sin exceso de radiación UV-B (μm)

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 La radiación solar.

La radiación solar satisface dos importantes necesidades de los organismos biológicos: energía e información, haciendo que virtualmente casi toda la vida dependa de ella (MOORE *et al.*, 1998 y HOPKINS, 1999). Por un lado, la energía radiante proveniente del sol mantiene la temperatura en la superficie terrestre en un nivel adecuado para la vida y por medio del proceso de fotosíntesis, es la fuente elemental de energía que sostiene la vida. La radiación, en su forma de luz provee, además de información crítica para el medio ambiente, información usada por las plantas para regular movimientos, iniciar procesos de desarrollo y notar el paso del tiempo. La importancia de la luz en la vida de las plantas, se refleja en el estudio de la fotobiología, que se relaciona con fenómenos tales como la fotomorfogénesis, fotoperiodismo y fotosíntesis (HOPKINS, 1999).

2.2 Naturaleza física de la luz.

Luz, corresponde a una forma de energía radiante, a una estrecha banda de energía dentro del continuo espectro electromagnético de radiación emitido por el sol. El término “luz” describe la fracción del espectro electromagnético que causa la sensación fisiológica de visión en humanos (HOPKINS, 1999). En otras palabras, se define como el rango de longitud de onda (?) entre los 400 y 760 nm, capaces de estimular los receptores localizados en la retina del ojo humano (MOORE *et al.*, 1998; HOPKINS, 1999 y NOBEL, 1999).

La luz se propaga a través del espacio por medio de ondas, que se caracterizan por presentar oscilaciones regulares y repetitivas (crestas) con propiedades eléctricas y magnéticas. Estas ondas o crestas magnéticas y eléctricas, perpendiculares entre sí,

tienen tanto una “longitud de onda”, como una “frecuencia”. La longitud de onda (?), corresponde a la distancia en el espacio entre 2 crestas de la onda y la unidad métrica con que se dimensiona tal distancia es el nanómetro (nm). La frecuencia (?), es el número de crestas o ciclos que pasan por un punto en el espacio, en un segundo (HOPKINS, 1999).

2.2.1 Espectro electromagnético. Considerando todas las radiaciones que alcanzan la atmósfera la distribución conocida de la energía electromagnética se puede ordenar según su longitud de onda, frecuencia o energía fotónica que están asociadas con ciertas regiones del espectro electromagnético. Según longitud de onda creciente encontramos los rayos cósmicos (rayos γ y rayos X), la radiación ultravioleta, la región visible del espectro, la radiación infraroja, las microondas y las ondas de radio (SALISBURY y ROOS, 1992).

Las radiaciones no son una corriente continua de energía, sino que son un conjunto de pequeñas partículas energéticas llamadas fotones. Un fotón es la unidad divisible más pequeña de la luz con una energía proporcional a h frecuencia de la radiación. La intensidad de la luz depende de el número de fotones absorbidos, por unidad de tiempo. Cada fotón lleva una cantidad determinada de energía la cual está dada por cuánto vibre el fotón, lo que implica que a menor vibración, menor energía (MOORE *et al.*, 1998). Además, la energía fotónica de la radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda (HOPKINS, 1999), como se aprecia en la fórmulas 2,2 y 2,3.

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hu \quad (2,1)$$

$$I = \frac{c}{\lambda} \quad (2,2)$$

(Energía (E), Const. De Planck (h), Vel. de la luz (c), Long. de onda (?), Frecuencia (?))

Las diferentes longitudes de onda de la luz, son percibidas por los humanos, como diferentes colores cada uno con diferentes niveles de energía, siendo el violeta aquel con mayor energía y el rojo el de menor energía, dentro del espectro de la luz visible (MOORE *et al.*, 1998).

Estrictamente hablando, las regiones del espectro que los humanos percibimos como rojo, verde o azul se denominan como luz, mientras que las regiones ultravioleta e infrarroja del espectro, que no son detectadas por la visión humana (aunque pueden tener efectos biológicos significativos), se denominan como radiación (HOPKINS, 1999).

2.3 Radiación fotosintéticamente activa.

El nivel de irradiación solar es un importante factor ecológico, del cual todas las plantas fotoautótrofas dependen. Pero sólo la región del espectro entre los 400 y 700 nm accionan directamente la fotosíntesis (LAMBERS *et al.*, 1998). A esta región del espectro se le conoce también como PAR, que viene de la sigla de su expresión en inglés “Photosynthetically Active Radiation” (HOPKINS, 1999).

Esta radiación, especialmente entre la luz azul y roja, es fuertemente absorbida por la clorofila. El porcentaje de absorción varía por diferentes causas tales como: edad de la hoja, presencia de estructuras epidérmicas que reflejan parte de la radiación que alcanza a la planta. Por ejemplo, una hoja pubescente (con pilosidades) puede absorber hasta un 40 % menos de luz que una hoja glabra (sin pilosidades) (TAIZ y ZEIGER, 1991 y SALISBURY y ROSS, 1992).

Un factor limitante de este grupo de longitudes de onda denominado PAR, es que excluye aquella luz que se encuentra entre los 700 y 750 nm, que si bien es fotosintéticamente inactiva en las plantas superiores, pertenece a la fracción visible del espectro y juega un rol significativo en la regulación del desarrollo vegetal, como por ejemplo actuando en la reversibilidad de la activación del proceso germinativo en especies con semillas fotosensibles (HOPKINS, 1999).

2.4 Ozono.

El ozono es un gas que está presente en la estratósfera terrestre. Este gas se forma por la acción de la radiación ultravioleta, que actúa como agente disociador de las moléculas de oxígeno (y también del ozono) en átomos de oxígeno, que rápidamente se combinan con moléculas de oxígeno formando el ozono (O_3) de acuerdo a las ecuaciones presentes en la Figura 1, también conocidas como “Reacciones de Chapman” (McQUARRIE y ROCK, 1984). La concentración del ozono se encuentra determinado por un equilibrio entre las reacciones antes descritas (CARVER, 1998).

Existe evidencia de que los niveles de radiación ultravioleta-B (UV-B) en la tierra, millones de años atrás, eran mucho mayores a los actuales. Ello por la ausencia de plantas terrestres, lo que como consecuencia impedía que se formara la capa de ozono y por lo tanto las radiaciones ultravioletas alcanzara la superficie terrestre. Debido a esto los primeros organismos que poblaron la tierra, vivieron bajo el agua, pues la columna de agua, atenuaba la radiación UV-B a niveles adecuados para que los organismos procariotas fotosintetizaran y crecieran. Con el tiempo, al liberarse oxígeno por efecto de la fotosíntesis, aumentó el O_2 atmosférico y a la vez disminuyó la concentración de CO_2 (ROZEMA *et al.*, 1999).

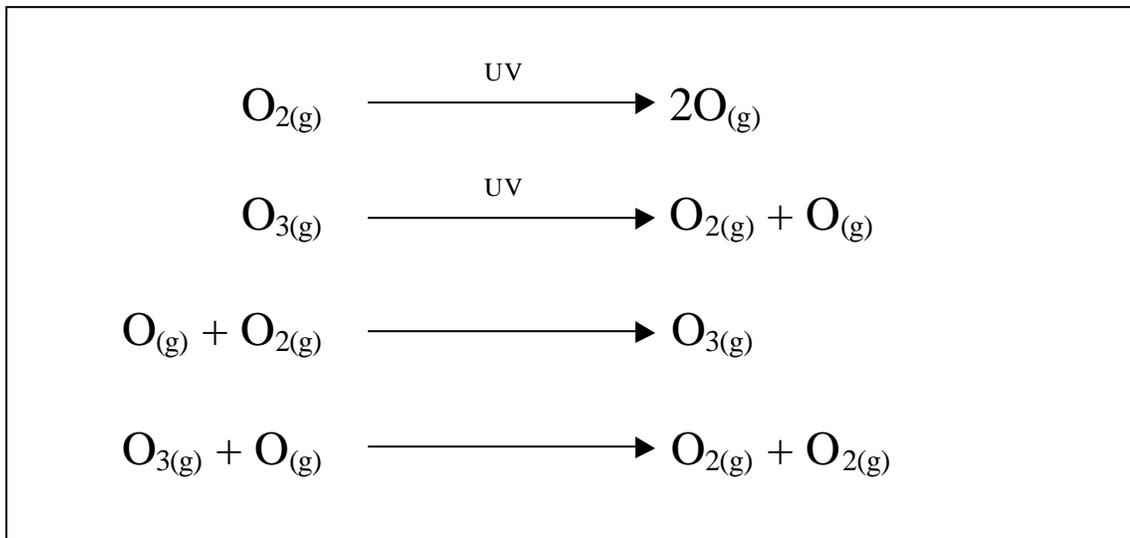


FIGURA 1 Reacciones de Chapman.

FUENTE: CARVER (1998).

La evolución de las plantas, en parte, fue posible por el desarrollo de la capa de ozono, la cual absorbe toda la radiación UV-C y parte de la UV-B, lo que permitió la evolución de un ambiente acuático a uno terrestre (Graham, 1993 y Stafford, 1991 citados por ROZEMA *et al.*, 1999). Además, el desarrollo del metabolismo de compuestos fenólicos (en parte inducido por la radiación UV-B) con productos como flavonoides y lignina, presentes en gimnospermas y angiospermas y que actúan como filtros de la radiación ultravioleta, han permitido la adaptación a un ambiente con mayor flujo de este tipo de radiación, respecto a un ambiente acuático (ROZEMA *et al.*, 1999).

2.4.1 Debilitamiento de la capa de ozono. La posibilidad de que el ozono estratosférico pudiese ser afectado por gases provenientes de fuentes humanas fue reconocido a comienzos de la década de 1970. Pero no fue hasta mediados de tal década que se identificó al principal responsable de ello, los compuestos clorofluorocarbonos o CFCs (McQUARRIE y ROCK, 1984). Los átomos de cloro de estos compuestos son fotoquímicamente disociados por la radiación ultravioleta, los cuales son responsables finales de la destrucción del ozono. Por ejemplo, el diclorofluorometano por acción de la radiación UV libera un radical cloro, el cual descompone una molécula de ozono por 2 vías: la primera en que forma un ClO destruyendo el ozono, y luego este ClO producido reacciona con un radical O para formar una molécula de O₂ y regenerar otro radical Cl que puede a su vez destruir otra molécula de ozono (McQUARRIE y ROCK, 1984 y CARVER, 1998). Lo que se comprende de mejor forma en la Figura 2.

Los CFCs tienen la notable característica de poseer un tiempo de vida activa (en la atmósfera terrestre) del orden de los 100 años. Moviéndose en corrientes de aire a alturas entre los 25 y 40 km, generando el deterioro del ozono. Cada molécula activa de CFCs actúa catalíticamente destruyendo aproximadamente 100.000 moléculas de ozono. A su vez, el tiempo de vida activa de un átomo de cloro es aproximadamente de 1 a 2 años (McQUARRIE y ROCK, 1984 y KOHEN *et al.*, 1995).

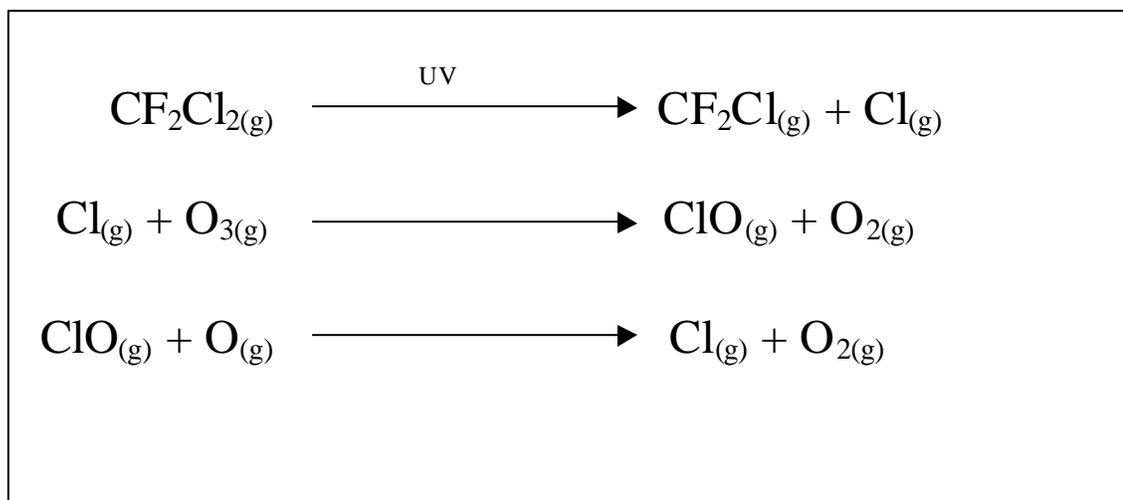


FIGURA 2 Reacciones de destrucción del ozono por los compuestos CFCs (caso del diclorodifluorometano).

FUENTE: McQUARRIE y ROCK (1984).

Otra sustancia química responsable del deterioro de la capa de ozono (en parte de origen humano) es el bromuro de metilo (CH_3Br). Esta sustancia al quedar expuesta a la radiación solar se descompone liberando bromo, el cual es 30 a 60 veces más destructivo para el ozono que el cloro. El bromo liberado reacciona con el O_3 estratosférico formando BrO y liberando O_2 . A su vez el BrO producido reacciona con el ClO formando un radical Br y un radical Cl , posteriormente el radical Br que reacciona con otra molécula de O_3 para formar BrO que continúa con la reacción en cadena (ORGANIZACIÓN METEOROLÓGICA MUNDIAL (OMM) y PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE (PNUMA), 2001), actuando como lo muestra la Figura 3.

Debido al grave problema que significa el deterioro de la capa de ozono, atribuido principalmente a los CFC, es que se suscribió el Protocolo de Montreal en 1987, con sus enmiendas en Londres (1990) y Copenhague (1992), a fin de limitar la producción y emisión de CFC y otras fuentes de halógenos, a la vez de buscar compuestos sustitutos no dañinos para el ozono (CARVER, 1998 y OMM y PNUMA, 2001).

Una posible solución serían los CFCs hidrogenados, como el CH_3CCl_3 y CHClF_2 que presentan una vida media en la atmósfera de alrededor de 6 a 7 años, tiempo que no es suficiente para alcanzar la estratósfera. La vida media más corta de estos compuestos es el resultado de su capacidad de reaccionar con radicales OH atmosféricos de CFCs. Sin embargo, el problema existente permanecerá por largo tiempo, por lo cual se debe comprender la forma de reacción de los organismos vivos a las consecuencias que dicho problema conlleva (McQUARRIE y ROCK, 1984).

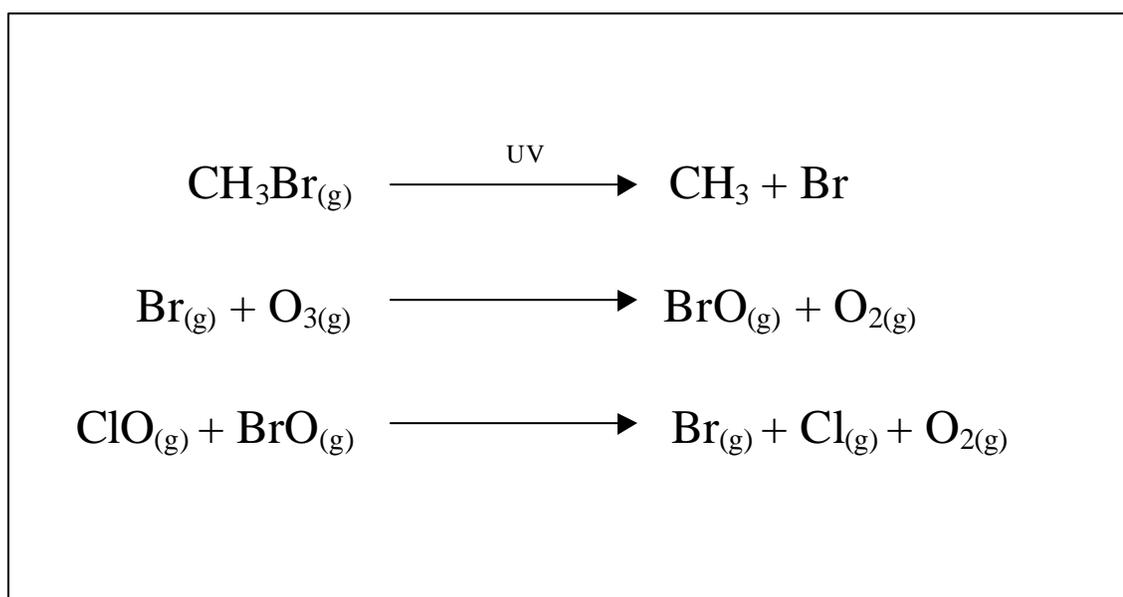


FIGURA 3 Reacciones de destrucción del ozono (caso de destrucción por bromo).

FUENTE: PNUMA (2001).

2.4.2 Niveles actuales y futuros de ozono. Los niveles de ozono (de la capa de ozono) son expresados como “columna de ozono” (monto de ozono sobre un punto determinado en la superficie terrestre) y su unidad métrica es la Unidad Dobson (DU), en que 1 DU, equivale a 0,001 mm de espesor a temperatura y presión normales (0°C y 1 atm). La concentración de ozono atmosférico es relativamente baja, alcanzando valores no mayores de 10 ppm a aproximadamente 30 km de altitud. Los porcentajes de pérdida del ozono estratosférico estimados, respecto a aquellos valores medios determinados en la década de 1970, son los siguientes:

- Antártica, primavera	50 %
- Ártico, primavera	15 %
- Hemisferio Norte (latitudes medias), invierno/primavera	6 %
- Hemisferio Norte (latitudes medias), verano	3 %
- Hemisferio Sur, durante el año	5 %

Sin embargo, no se ha observado una tendencia significativa de disminución del ozono en las regiones ecuatoriales (MADRONICH *et al.*, 1998). Según lo descrito anteriormente, la disminución más pronunciada del O₃ estratosférico se da en el continente antártico, donde se han determinado disminuciones de hasta un 70 % durante fines de invierno-comienzos de primavera (ROUSSEAU *et al.*, 1999). Esta diferencia significativa entre las diferentes áreas del planeta, respecto de los niveles de deterioro de la capa de ozono, se explican por el hecho que naturalmente el espesor de esta capa es mucho menor en la Antártica (CARVER, 1998).

La disminución de la capa de ozono, como se ha señalado anteriormente, no se circunscribe solamente a la región antártica, sino que durante la época primaveral (a fines de ella) una masa de aire pobre en ozono se mueve hacia latitudes más bajas (respecto de la Antártica) alcanzando regiones australes de América del Sur, como por ejemplo Ushuaia, Tierra del Fuego (CABRERA *et al.*, 1995 y ROUSSEAU *et al.*, 1999). Valdivia se encuentra fuera del dominio de acción del agujero de ozono. Sin embargo, ocasionalmente esta masa de aire, pobre en ozono, alcanza el área o región en que se encuentra Valdivia, particularmente hacia fines de la primavera, cuando se genera la mayor penetración de radiación ultravioleta hasta la superficie terrestre (LOVENGREEN *et al.*, 2000).

Las proyecciones futuras son difíciles de realizar, pues existen fluctuaciones naturales del ozono (ciclos estacionales), perturbaciones naturales como erupciones volcánicas que son impredecibles. Además, que las estimaciones, en términos de tiempo y cantidad, sobre el reestablecimiento a niveles normales del ozono, sobre la base de un

deterioro causado por fuentes antropogénicas dependen del cumplimiento estricto del Protocolo de Montreal. Todo lo cual, confluye en una incierta capacidad de predecir (MADRONICH *et al.*, 1998 y OMM y PNUMA, 2001).

2.5 Radiación ultravioleta.

Esta radiación se extiende dentro del espectro electromagnético, entre los 100 y 400 nm (BJÖRN, 1999 y MADRONICH *et al.*, 1998). Se caracteriza por su alta frecuencia y alto nivel energético, siendo particularmente efectiva en inducir reacciones fotoquímicas (CALDWELL, 1978 y HOPKINS, 1999).

La absorción de radiación ultravioleta (UV), produce moléculas altamente reactivas, que generalmente ocasionan la liberación de un electrón o la ionización molecular, razón por la que se le conoce como radiación ionizante (MOORE *et al.*, 1998 y HOPKINS, 1999).

La radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre se ve afectada por factores temporales, geográficos y meteorológicos. Entre las 9 am y las 3 pm se recibe cerca del 75 % de la radiación ultravioleta diaria, con un 20 a 30 % cerca del mediodía. Latitudes bajas tienen menor variación en cuanto a la capacidad de daño por la radiación, que latitudes altas a través del año (DIFFEY, 1991). Las nubes, generalmente reducen la radiación que alcanza la tierra, aunque este efecto es altamente variable dependiendo del tamaño y cobertura de las nubes, tamaño y fase de las partículas que las componen (gotas de agua, cristales de hielo). Es usual que la irradiación UV sea mayor en condiciones de radiación solar directa más radiación difusa (por las nubes) que en condiciones de ausencia de nubosidad (MADRONICH *et al.*, 1998).

Debido a diferencias en la densidad óptica de la atmósfera, la radiación UV que alcanza la tierra es menor a nivel del mar en la región ártica (ej. Alaska) y mucho mayor a altas altitudes y bajas latitudes (respecto a la región ártica) como por ej. Los Andes.

Sin embargo, el “efecto” altitudinal es mucho menor que el latitudinal (LAMBERS *et al.*, 1998).

Respecto a los niveles de aumento que ha tenido la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre, en relación a la disminución que ha sufrido la capa de ozono, estimándose sobre la base de aquellos valores medidos en la década de 1970 (cuando se comenzó con el monitoreo de la capa de ozono), “regionalmente” el incremento ha sido el siguiente:

- Antártica, primavera	130 %
- Ártico, primavera	22 %
- Hemisferio Norte (latitudes medias), invierno/primavera	7 %
- Hemisferio Norte (latitudes medias), verano	4 %
- Hemisferio Sur, durante el año	6%

Esperándose que bajo las condiciones suscritas en el Protocolo de Montreal, (con sus posteriores ajustes), el año 2050 se tengan los niveles normales existentes previo a 1980 (MADRONICH *et al.*, 1998).

La radiación UV se subdivide en 3 bandas: UV-A, UV-B y UV-C. La subdivisión es arbitraria y difiere según la disciplina en que se trabaje. En la fotobiología, normalmente las bandas se definen como a continuación se indica: UV-A, 400-320 nm; UV-B, 320-280 nm y UV-C, 280-100 nm (DIFFEY, 1991 y ORMROD y HALE, 1995). Sin embargo, longitudes de onda menores que 290 nm es poco probable que alcancen la superficie terrestre, excepto en las altas altitudes (DIFFEY, 1991). Longitudes de onda menores que 320 nm, en general son más activas fotobiológicamente que longitudes mayores, dentro de la radiación UV (DIFFEY, 1991).

La radiación UV-A no es atenuada por la capa de ozono, alcanzando la superficie terrestre fácilmente (ORMROD y HALE. 1995). No obstante lo señalado por

MADRONICH *et al.* (1998), en orden a que en ciertas ocasiones sí lo es. Este tipo de radiación causa en las plantas diversas reacciones fotoquímicas y por ende manifestaciones fisiológicas de impacto biológico similar al producido por la luz visible (CALDWELL, 1978 y BJÖRN, 1999). En general las plantas son menos sensibles a ésta radiación que a la radiación UV-B (ORMROD y HALE, 1995). Sin embargo, HOPKINS (1999), indica que son especies, tales como hongos, musgos o helechos los que presentan mayor sensibilidad a esta radiación. De ahí que tanto fisiólogos vegetales como ecólogos tengan un menor interés en las reacciones fotobiológicas producidas por la radiación UV-A, respecto a la radiación UV-B (CALDWELL, 1978).

Dentro de la radiación ultravioleta la radiación del tipo UV-C es la que presenta el mayor nivel de energía motivo por el cual es muy efectiva en la eliminación de microorganismos con una exposición relativamente corta, siendo utilizada por tal propiedad como medio de esterilización (CALDWELL, 1978). Sin embargo, debido a su alto nivel energético, este tipo de radiaciones también afecta proteínas y ácidos nucleicos induciendo alteraciones tales como mutaciones o simplemente afectando el normal funcionamiento o capacidad de tales compuestos (STRASBURGER *et al.*, 1994 y HOPKINS, 1999).

Afortunadamente toda la radiación UV-C junto con parte de la radiación UV-B (radiación con $\lambda < 290$ nm no penetran a la superficie de la tierra STARSBURGER *et al.* (1994)) son completamente absorbidas por el ozono estratosférico, el oxígeno molecular atmosférico y aerosoles (partículas dispersas de sólidos y líquidos) (MADRONICH *et al.*, 1998 y HOPKINS, 1999). Esta condición, es decir su no presencia en la superficie terrestre, se espera no variará aún con un deterioro extensivo de la capa de ozono (ORMROD y HALE, 1995).

La radiación UV-B, que es la que concierne a este trabajo, está estrechamente relacionada al contenido de ozono atmosférico, teniendo principalmente efectos dañinos

sobre diversos sistemas biológicos. De ahí que se describa más extensamente a continuación.

2.5.1 Radiación ultravioleta B. No obstante la cantidad de radiación UV-B que alcanza la superficie terrestre es de sólo un 0,3% de la radiación UV-B emitida por el sol. Esta radiación es la que recibe mayor motivo de estudio, debido a que su paso hasta la superficie terrestre es fuertemente dependiente del contenido de ozono de la atmósfera terrestre. Por lo tanto, en la medida que el ozono estratosférico disminuya, los niveles de radiación UV-B se incrementarán (KOHEN *et al.*, 1995; ORMROD yHALE, 1995 y BJÖRN, 1999).

Si bien la radiación UV-B presenta niveles de energía menores que la radiación UV-C, algunas respuestas de las plantas a esta última también se dan con el incremento de UV-B (ej. mutaciones). Por lo tanto la fracción más dañina del espectro solar que alcanza la superficie terrestre es la radiación UV-B (CALDWELL, 1978).

Como se mencionó anteriormente el determinar o predecir los futuros niveles de radiación UV-B es difícil e incierto. Si bien, se piensa que los niveles actuales de UV-B están cercanos a su nivel máximo, dado que se estima que ocurre lo mismo con el nivel de deterioro de la capa de ozono, no se puede asegurar tal cosa. Esto, porque la interacción de ozono-UV-B con otros factores, tales como cambios climáticos en el largo plazo, como por ejemplo un aumento en la concentración de los gases invernaderos, el no cumplimiento del Protocolo de Montreal o futuras erupciones volcánicas, no son del todo manejables o estimables (MADRONICH *et al.*, 1998).

2.5.1.1 Efectos de la radiación UV-B en las plantas. Las plantas, definidas como fotoautótrofas, obtienen su energía a partir de la radiación solar por medio del proceso de la fotosíntesis. Las plantas, especialmente terrestres, están fuertemente influenciadas por la naturaleza e intensidad de la energía radiante durante toda su vida y son, por lo tanto, especialmente vulnerables a los cambios en los niveles de radiación UV-B que

alcanzan la superficie terrestre (SALISBURY y ROSS, 1992; GREENBERG *et al.*, 1997 y MOORE *et al.*, 1998).

Algunas plantas al ser sometidas a condiciones de estrés o presión ambiental, pueden verse afectadas desarrollando una o más alteraciones metabólicas (HOPKINS, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior y considerando que la radiación solar se compone de varios tipos de radiaciones, cada cual con un nivel particular de energía, se han encontrado diversos efectos biológicos en plantas sometidas a diferentes niveles de radiación (PÉREZ y MARTÍNEZ-LABORDE, 1994 y MOORE *et al.*, 1998). Existiendo una amplia variación entre especies y procesos afectados por la radiación UV-B (ORMROD y HALE, 1995).

Importante es tener en cuenta que dentro de las respuestas que se pueden presentar en un organismo expuesto a una determinada presión o estrés ambiental (ej. exceso de UV-B) están: la *adaptación* y la *aclimatación*. La adaptación corresponde a una respuesta evolutiva, como resultado de modificaciones genéticas heredables, que significan cambios morfológicos o fisiológicos, que aumentan la capacidad o aptitud del organismo frente a la presión ambiental que la genera. Siendo común que transcurran una o más generaciones para que se manifiesten. La aclimatación, por otra parte, al igual que la adaptación implica cambios morfológicos y/o fisiológicos a causa de una exposición gradual a cierta alteración ambiental. Sin embargo, tales cambios no son heredables, pese a que la capacidad de aclimatarse seguramente responde a una característica genética. Además, los cambios por aclimatación siempre suceden durante la vida de un individuo, comunmente en algunos días o semanas (LAMBERS *et al.*, 1998 y HOPKINS, 1999).

Los efectos que genera la radiación UV-B y que resultan en cambios morfológicos y/o fisiológicos, suceden primeramente a nivel celular (DIFFEY, 1991). Dentro de los efectos se incluyen alteración de membranas (ej. disipación del potencial eléctrico, cambios en el pH celular, inhibición de la enzima ATPasa, entre otras) y

denaturalización de proteínas, por ejemplo cualquier proteína que tenga triptófano, tirosina o fenilalanina (aminoácidos aromáticos) tienen un máximo de absorción de radiación a los 280 nm. Los cuales resultan en el deterioro de la función enzimática, translocación, fotosíntesis y otros procesos esenciales (ORMROD y HALE, 1995 y GREENBERG *et al.*, 1997).

La absorción de fotones de radiación UV-B por parte del DNA resulta en un daño del código genético. El daño también es producto de la absorción de esta radiación por parte de fotoproductos derivados de la pirimidina (siendo esta la principal fuente de daño del DNA en plantas), que corresponden a dímeros del tipo ciclobutano, comúnmente llamados “dímeros de pirimidina” (DIFFEY, 1991; ARTLIP y FUNKHOUSER, 1995; ORMROD y HALE, 1995 y GREENBERG *et al.*, 1997).

Los dímeros y por ende los daños generados en el DNA, pueden ser reparados por tres mecanismos: fotoreactivación (fotoliasa), excisión y recombinación. La recombinación no ha sido reportada en plantas, mientras que la excisión sólo se ha demostrado en algunas investigaciones, consistiendo en el corte del área dañada del DNA más las bases cercanas a ella, resintetizando lo eliminado por medio de la DNA polimerasa. La fotoreactivación se ha determinado en muchas especies vegetales, implicando la reversibilidad de la formación de dímeros de pirimidina (por causa de la radiación UV-B), requiriendo de radiación UV-A y luz azul como catalizadores de la enzima responsable de la reparación, la fotoliasa (ARTLIP y FUNKHOUSER, 1995 y GREENBERG *et al.*, 1997).

Adicionalmente, como respuesta al incremento de radiación UV-B se ha determinado una disminución de la fotosíntesis producto de una alteración del fotosistema II (que es sensible a esta radiación). Mientras que como causales indirectas que explican la disminución de la fotosíntesis están la reducción del crecimiento de hojas y de la superficie fotosintetizadora; además del cierre de estomas producto de niveles elevados de UV-B (ORMROD y HALE, 1995 y GREENBERG *et al.*, 1997).

Niveles elevados de UV-B pueden afectar la conductancia estomática, mediante la alteración de la tasa de pérdida de agua (por transpiración) y la tasa de captación de CO₂, afectando a la fotosíntesis. Esto, por generar un retardo en el cierre de estomas (ORMROD y HALE, 1995).

Otro efecto de la radiación UV-B se da sobre pigmentos vegetales. Por una parte, se da una disminución del contenido de clorofila y carotenoides en la planta (ORMROD y HALE, 1995). Una alta irradiación UV-B combinada con una bajo nivel de PAR generan una reducción significativa en la concentración de la clorofila. Ello posiblemente debido a la fotooxidación de la clorofila por acción de la UV-B o a la inhibición de su biosíntesis. Se ha reportado además, un aumento en la relación clorofila a/b, por el hecho de que la radiación UV-B afecta preferentemente a la clorofila b. Los carotenoides, respecto a la clorofila, son menos afectados por la radiación UV-B, lo que se explicaría por su rol fotoprotector en el aparato fotosintético (KULANDAIVELU *et al.*, 1996).

Por otra parte, existen pigmentos que actúan como una barrera protectora natural contra la radiación UV-B, los que usualmente son fenilpropanoides (ej. flavonoides) que se caracterizan por su carácter antioxidante y por absorber fuertemente la radiación entre los 280 y 340 nm, siendo su síntesis estimulada por la radiación UV-B (ORMROD y HALE, 1995; GREENBERG *et al.*, 1997 y CALDWELL *et al.*, 1998). Tales compuestos también tienen un rol como defensa contra antagonistas de las plantas, al ser tóxicos para otros organismos, incluyendo insectos, de tal forma que el cambio en la concentración de ellos, inciden en la resistencia de las plantas a plagas o en los hábitos de poblaciones de insectos herbívoros (ARTLIP y FUNKHOUSER, 1995 y ORMROD y HALE, 1995).

El incremento de la concentración de flavonoides se debe a una mayor actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL), la cual cataliza la primera reacción en la biosíntesis de compuestos aromáticos secundarios derivados de la fenilalanina y/o a una

mayor velocidad de la biosíntesis de dicha enzima. Esta respuesta involucraría al fitocromo, un receptor de la luz azul y la radiación UV-B, que gatillarían tal respuesta (KOHEN *et al.*, 1995 y ORMROD y HALE, 1995).

Reducciones de crecimiento inducidas por la radiación UV-B pueden asociarse con cambios en la división celular y/o con la elongación celular. Por ejemplo, la elongación de células epidermales del hipocotilo se ha visto inhibida por la acción de radiación UV-B, como resultado de la fotooxidación del ácido indolacético (IAA) (ORMROD y HALE, 1995). La oxidación, dada por enzimas oxidativas, tal como las peroxidasas, es promovida por esta radiación, incluso pudiendo verse involucrada con un aumento en el nivel de hormonas reguladoras del crecimiento, como el etileno. Finalmente, cambios en los niveles hormonales podrían deberse a una expresión genética inducida por la radiación UV-B (CALDWELL *et al.*, 1998).

Otro “campo de acción” de la radiación UV-B (a niveles elevados) corresponde a la deformación epidermal y a la depositación y erosión de ceras cuticulares en hojas expuestas a ella, ello por una alteración de la biosíntesis de tales ceras. También se han demostrado reducciones en el área foliar en ciertas plantas asociado a un incremento del peso específico de las hojas (ORMROD y HALE, 1995).

El patrón de desarrollo de las plantas también es blanco de la radiación UV-B. En diferentes estudios se ha observado una disminución en el calibre de semillas, longitud de hipocotilo y de tallos, como también en el tamaño de las plantas y la longitud de los folíolos. No obstante, tales alteraciones no se relacionaron a una disminución de la fotosíntesis. En otros estudios, en brotes, se determinó una disminución del tamaño de las hojas y de los internudos a la vez de un aumento en la producción de hojas y brotes axilares, lo cual no se asoció con reducciones en la producción de materia seca total (ORMROD y HALE, 1995).

En algunos cultivares de ciertas especies se ha determinado una reducción de la biomasa o de la producción de materia seca total y en su rendimiento comercial, producto del incremento de los niveles de radiación UV-B a que se encuentran expuestos. Siendo éste un fenómeno común, mas no necesariamente generalizado (ORMROD y HALE, 1995).

La floración en ciertas especies se ve inhibida por niveles elevados de UV-B, mientras que en otras es estimulada, ello porque la inducción del fotoperíodo para la floraciones dependiente del nivel de radiación UV-B. Pudiendo suceder que por tal fenómeno, no existan la suficiente disponibilidad de polinizadores, la que constituiría un problema importante, sobre todo en sistemas agrícolas, no obstante, con un manejo adecuado de este fenómeno se podría disminuir el impacto. En general, en plantas de día largo se ha observado que la floración se ve inhibida (ORMROD y HALE, 1995 y CALDWELL *et al.*, 1998).

La capacidad de competencia también es influenciada por niveles excesivos o elevados de UV-B, pues especies más tolerantes o menos sensibles a ella, tendrán una menor reducción en su productividad. Por ejemplo, ante un cambio en la forma de la planta inducido por UV-B, tal planta puede competir más eficientemente por la luz (CALDWELL *et al.*, 1998).

La susceptibilidad a patógenos e insectos podría verse disminuida a causa de cambios (aparte de los antes mencionados) en el metabolismo secundario de las plantas o por alteraciones en el contenido de nitrógeno y azúcar en la planta, más específicamente un aumento y disminución de cada uno respectivamente (Hatcher y Paul 1994 citados por CALDWELL *et al.*, 1998).

2.5.1.1.1 Efectos de la radiación UV-B en polen. Muchos de los estudios relacionados con radiación UV-B en biología reproductiva, se han focalizado en el

polen, observándose reducciones en su germinación y en la longitud del tubo polínico (TORABINAJED *et al.*, 1998).

El grado de afección está dado por características de la especie, como también por el tiempo de exposición a la radiación (TORABINAJED *et al.*, 1998). Flint y Caldwell (1986), citados por TORABINAJED *et al.* (1998) especulan que granos de polen binucleado, son fisiológicamente menos evolucionados y más lentos en germinar que aquellos trinucleados, por lo que serían más sensibles a la radiación UV- B.

KOHEN *et al.* (1995) señala que las paredes de las anteras filtran sobre el 98 % de la radiación UV-B incidente, protegiendo al polen de ella. Además, las paredes del polen contienen compuestos que absorben UV-B (flavonoides en el caso de granos de polen amarillos) permitiendo la transmisión de tan solo un 20 % de la radiación UV-B (KOHEN *et al.*, 1995; CALDWELL *et al.*, 1998 y WALBOT, 2001). Sin embargo, CALDWELL *et al.* (1998), determinaron que tales pigmentos proveen sólo una pequeña protección contra esta radiación, lo que se explicaría por una distribución localizada o desuniforme de los pigmentos con el consiguiente mayor paso de UV-B hasta el DNA. Por otra parte Krupko (1959), citado por STANLEY y LINSKENS (1974), determinó la presencia de altas concentraciones de flavonoides en la célula generativa, lo que significa una buena protección para el DNA contra la mencionada radiación.

Además, durante el tiempo que el polen germinado se encuentra en el estigma, el tubo polínico (como también el grano mismo) queda expuesto a la radiación UV-B y a los efectos que ella genera (KOHEN *et al.*, 1995 y CALDWELL *et al.*, 1998).

Una vez en el estigma la exposición del tubo polínico a dicha radiación es casi nula, pues la transmitancia de UV-B a través de la epidermis estigmática es solamente de un 2 % (DEMCHIK y DAY, 1996).

No obstante lo anterior, investigaciones previas han demostrado que plantas tratadas con UV-B en exceso, previo a la antesis, pueden por algún mecanismo desconocido tener importantes efectos en la viabilidad del polen (TORABINAJED *et al.*, 1998).

En resultados obtenidos por TORABINAJED *et al.* (1998), se determinó que la reducción del desarrollo del tubo polínico, por efecto del aumento de la radiación UV-B, es más significativa en especies de polen trinucleado que binucleado. Adicionalmente se ha determinado que especies monocotiledóneas se ven más afectadas que las dicotiledóneas.

2.6 Relación fotónica PAR:UV-A:UV-B.

Al nivel de la superficie terrestre, la razón molar entre la luz fotosintéticamente activa (PAR), radiación UV-A y la radiación UV- B es aproximadamente 100: 10: 1. El nivel de radiación UV-A se mantiene relativamente constante, no siendo afectada mayormente por factores latitudinales, altitudinales o estacionales (GREENBERG *et al.*, 1997). Los niveles de PAR y radiación UV-B varían según altitud, latitud y período del día. CALDWELL *et al.* (1998), plantea que los niveles de radiación PAR:UV-A pueden tener un fuerte efecto atenuador en respuesta a los efectos causados por la radiación UV-B en las plantas. Pero en condiciones de un desbalance entre PAR:UV-A y UV-B, con niveles bajos y altos respectivamente, los efectos de la radiación UV-B pueden ser mucho más severos.

Si los niveles de UV-B son menores a 1% de la radiación PAR, se pueden esperar respuestas de adaptación a la radiación UV-B (GREENBERG *et al.*, 1997). Contrariamente cuando los niveles de UV-B han sido mayores al 1% de la radiación PAR se ha observado que los efectos dañinos por causa de la radiación UV-B se ven incrementados (HUISKES *et al.*, 1999).

2.7 *Gevuina avellana* Mol.

A continuación se describen los aspectos más relevantes de esta especie:

2.7.1 Aspectos generales. La especie *G. avellana* Mol. perteneciente a la familia Proteaceae, debe su nombre a que los mapuches lo denominaban “guevin” y al parecido que los colonizadores españoles le encontraron a su fruto (por sabor y gusto) con la nuez del avellano europeo (*Corylus avellana* L.) (URBAN, 1934; MUÑOZ, 1980 y NUESTRA TIERRA, 1990). También se le conoce como “Gevuin”, “Guevín”, “Ñefu”, “Avellano Chileno”, “Chilean Hazelnut”, “Chile Hazel” y “Chile Nut” (HALLOY *et al.*, 1996; MEDEL y MEDEL, 2000 y MONTENEGRO, 2000).

Desde fines de 1970 esta especie ha formado parte de un programa de investigación y desarrollo frutícola, adecuado a la realidad del sur de Chile, especialmente al territorio comprendido por la IX y X Regiones, cuya línea más relevante ha sido el mejoramiento genético y cultural de especies, cultivares y clones con adaptabilidad productiva y comercial, en función de las condiciones particulares de clima y suelo de este vasto territorio (MEDEL, 1978; MEDEL, 1987 y MEDEL, 1990).

Sin embargo, siendo el avellano chileno una especie nativa de amplia distribución geográfica y que forma parte especialmente de bosques siempreverdes del sur de Chile, no ha alcanzado mayor importancia económica aún cuando sus frutos tienen excelentes características comestibles y los árboles se destacan por la notoria belleza de sus hojas, flores y frutos (HEYWOOD, 1993 y MEDEL y MEDEL, 2000). Ello porque hasta ahora su manejo se remite a uno de tipo extensivo (artesanal), desaprovechando las potencialidades que tiene esta especie (árbol y fruto).

2.7.1.1 Distribución y hábitat. Crece principalmente de la VII hasta la XI Regiones, desde el norte del río Teno por la Cordillera de los Andes y desde el sur del río Mataquito por la Cordillera de la Costa, hasta las islas Guaitecas (DONOSO, 1978 y RODRÍGUEZ *et al.*, 1983). También se señala su presencia en la VI Región e incluso

desde Valparaíso (Juan Fernández inclusive, pero naturalizada) (MUÑOZ, 1980; HOFFMANN, 1982 y MONTENEGRO, 2000).

El desarrollo con mayor variabilidad, vigor y frecuencia de la especie se encuentra en los bosques del tipo forestal siempreverdes (bosques subantárticos). Altitudinalmente este tipo forestal no sobrepasa los 1000 m.s.n.m. Más arriba dominan bosques puros de coigüe común, lenga y coigüe de Magallanes. Hacia áreas más bajas, llegando a la depresión intermedia central, los bosques siempreverdes se topan con comunidades que forman parte del tipo forestal roble-raulí-coigüe (DONOSO *et al.*, 1999 y MEDEL y MEDEL, 2000). LOBOS (1987), señala que *G. avellana* Mol. no crece a altitudes superiores a los 600 m.s.n.m.

Las Proteáceas chilenas, entre ellas *G. avellana* Mol., no forma comunidades puras, sino que se introduce en bosques de otras especies, particularmente en las áreas que se recuperan después de haber sido afectadas por la explotación, roce o incendio del bosque o bien en áreas marginales (RODRÍGUEZ *et al.*, 1983 y MONTENEGRO, 2000). En aquellas áreas en que el bosque ha sido explotado, el avellano surge rápidamente desde los tocones, invadiendo el área (DONOSO, 1978).

Cuando la corta de los *Nothofagus* (roble y raulí) es reiterada, o cuando los animales los ramonean impidiendo su crecimiento, es posible que el avellano se constituya como la especie dominante de una comunidad disclímax, en cuyo caso los árboles se desarrollan con copas amplias y frondosas. Como especie de sotobosque, en cambio, se desarrollan con tallos etiolados y largas ramas (DONOSO, 1978).

Los climas mediterráneos y templado-húmedo con alta pluviometría anual, pero con una distribución irregular que condiciona meses estivales (diciembre a febrero) expuestos a condición de sequía, caracterizan el territorio donde esta especie se desarrolla preferentemente. Sin embargo, su adaptabilidad es mucho más amplia, abarcando situaciones más continentales (MEDEL y MEDEL, 2000).

Según Steubing *et al.* (1983), citados por DONOSO (1993), existe una clara adaptación genética de la resistencia al frío de las especies Proteaceas chilenas, entre ellas *G. avellana* Mol., cuestión comprobable al no observarse una sintomatología visual característica de heladas en hojas y yemas. Además, estas características se mantienen a través de los estados de plántula, juvenil y adulto (DONOSO, 1993 y MEDEL y MEDEL, 2000).

Debido a la plasticidad ecológica de la especie, es capaz de crecer en suelos profundos, con densidades bajas, buena porosidad y buen nivel de nutrientes, y en contraposición, también en suelos volcánicos (lavas y escorias) y en suelos ñadis de la depresión intermedia (DONOSO *et al.*, 1992 y RAMÍREZ *et al.*, 1990).

Por su adaptabilidad a diferentes condiciones de luminosidad, se comporta como especie intolerante tanto como semitolerante (DONOSO *et al.*, 1992).

2.7.1.2 Usos. La masiva y prolongada floración que presenta el avellano chileno, junto con la abundancia de su néctar, la convierten en una especie altamente visitada por una entomofauna diversa, destacándose entre ellas: *Corynura chloris* Spin. y *Apis mellifera* L., dando como producto una miel de excelentes características (MEDEL y MEDEL 2000 y TAPIA, 2000).

Del fruto, excluyendo el pericarpio (cáscara), se señala los siguientes usos: avellana tostada para consumo directo o en productos de confitería y de pastelería, avellana tostada salada o “snack”, aceite de avellana para consumo humano o cosmetológico y harina de avellana entera o desgrasada para uso en pastelería, confitería, alimentos infantiles y alimentación animal (CACERES *et al.*, 1982 y NUESTRA TIERRA, 1990).

En el aceite que se obtiene (49,3g/100g de fruto comestible), se presentan principalmente ácidos grasos no saturados (de 1, 2 o 3 dobles enlaces) con un 93% del

total de ác. grasos (MEDEL, 1987 y NUESTRA TIERRA, 1990). Algunos de ellos han sido identificados por su alto valor para propósitos fármaco-cosméticos. En particular, el ác. palmitoléico (sobre 27,6% del total de ác. Grasos) que es bien absorbido por la piel y conforma un buen filtro natural contra radiaciones bajas del espectro ultravioleta (MEDEL, 1987 y Karmelic (1982), citado por HALLOY *et al.*, 1996).

La harina desgrasada resultante de la extracción del aceite, presenta un alto contenido proteico (24,3%). Además, los contenidos de fibra y carbohidratos son de 8,6% y 55,1% respectivamente lo que la presenta como apta para alimento (NUESTRA TIERRA, 1990).

G. avellana Mol. es una especie muy hermosa por lo que a menudo se la reconoce formando parte de parques y jardines públicos (MONTENEGRO, 2000). Además, de uso como planta, el follaje, por su larga durabilidad, es vendido en florerías, siendo usado en arreglos florales (coronas funerarias) y como aderezo de alimentos y mesas en restaurantes (HALLOY *et al.*, 1996).

La madera, por su hermoso veteado, es especialmente interesante para chapas y, a nivel local, para ebanistería, confección de algunos instrumentos musicales, remos para botes y artesanía popular (DONOSO, 1978; HOFFMANN, 1982 y RODRIGUEZ *et al.*, 1983) . Sin embargo, nunca ha cobrado mayor importancia debido al escaso volúmen que representa (DONOSO, 1978).

La corteza del fruto (pericarpio) presenta un alto contenido de taninos, que pueden usarse en curtiduría o como combustible con un gran poder calórico, similar al de la leña (HOFFMAN, 1982 y MEDEL y MEDEL, 2000).

Sin embargo, todas estas posibilidades sólo han sido utilizadas en forma fragmentaria y carecen de un significado de peso para la conservación y mejoramiento

de un recurso natural y su participación en la actividad económica (MEDEL y MEDEL, 2000).

2.7.2 Clasificación taxonómica. Según STRASBURGER *et al* (1994) y HALLOY *et al.* (1996) *G. avellana* Mol. se clasifica de la siguiente manera:

- Especie: *Gevuina. avellana* Mol.
- Nombre común: Avellano chileno, gevuín, etc.
- Género: *Gevuina*
- Subfamilia: *Grevilleoideae*
- Familia: *Proteaceae*
- Subtribu: *Gevuinineae*
- Tribu: *Macadamieae*
- Orden: *Proteales*
- Subclase: *Rosiidae*
- Clase: *Dicotiledónea*
- Subdivisión: *Angiosperma*

2.7.3 Descripción botánica. *G. avellana* Mol. es un árbol siempreverde, de hasta 20 m de altura, con el tronco recto y cilíndrico de 50 a 60 cm de diámetro. Cuando crece asociado a otras especies crece de forma más erecta o más globosa cuando se encuentra aislado bajo mayor condición de luz (HOFFMANN, 1982; RODRIGUEZ *et al.*, 1983 y MEDEL y MEDEL, 2000).

La corteza es delgada, de color gris cenicienta con manchas oscuras, mientras que los brotes nuevos están cubiertos de un tomento ferrugíneo (cubierta pilosa rojiza) (RODRIGUEZ *et al.*, 1983 y MONTENEGRO, 2000).

De follaje perenne, las primeras hojas son simples, siendo en general compuestas, ubicadas en posición alterna en la rama, permanecen adheridas hasta 4 años

en el árbol. Poseen los bordes aserrados, son duras fibrosas, con la superficie superior muy brillante y pecíolos pubescentes (HOFFMANN, 1982; MEDEL y MEDEL, 2000 y MONTENEGRO, 2000).

Las especies pertenecientes a la familia de las Proteaceas, se caracterizan por presentar raíces proteiformes, que son un tipo anormal de ramificación que origina conglomerados de raicillas, con abundantes pelos radicales, dispuestos en torno a un eje (Purnell 1960, citado por RAMIREZ *et al.*, 1990). Este tipo de raíces significa un aumento considerable de la biomasa total, una mayor absorción de agua y mayor porcentaje de hidratos de carbono (RAMIREZ *et al.*, 1990).

Las flores, generalmente son de color blanco o amarillo-cremoso, reunidas en un racimo floral correspondiente a una inflorescencia axilar, de unos 10 a 14 cm dispuesta en los extremos de las ramas, con 45 a 70 flores (RODRIGUEZ *et al.*, 1983; RIVEROS *et al.*, 1999 y MONTENEGRO, 2000). Cada una de las flores es hermafrodita, se caracterizan por su asimetría, de 1-1,2 cm de largo, pedunculadas, geminadas, dispuestas helicoidalmente alrededor del raquis. Presentan 4 tépalos libres, reflexos, pubescentes de 9-10 mm de largo, con el extremo superior cóncavo. Con 4 estambres sésiles, insertos en la cavidad de cada uno de los tépalos. Además, de 2 glándulas hipóginas. Ovario súpero, pubescente, unilocular y con 2 óvulos (URBAN, 1934; HOFFMANN, 1982; RODRIGUEZ *et al.*, 1983 y MONTENEGRO, 2000).

En ensayos de autopolinización manual, se determinó que *G. avellana* Mol. corresponde a una especie autoincompatible, ello pese a que esta especie, durante la apertura floral (antesis), la antera deja adherido a la superficie del estigma la totalidad del polen, el cual no logra germinar ni fecundar y que cae finalmente ayudado por la acción de los polinizadores (VERA *et al.*, 2000a). Esta autoincompatibilidad seguramente es generada por la madurez retardada del estigma (URBAN, 1934). En efecto, como lo señala VERA *et al.* (1999) en especies de la familia de las Proteaceas, la madurez de las anteras se produce en la pre-antesis.

La longevidad floral, en *G. avellana* Mol., es de 6 días, iniciándose al tercer o cuarto día la madurez del estigma (VERA *et al.*, 1999).

En resultados obtenidos por VERA *et al.* (1999) y VERA *et al.* (2000b) en *G. avellana* Mol., se obtuvo un 21,3% de formación de frutos en ensayos de polinización cruzada manual, sólo un 10,57% de fructificación con polinización natural mientras que en ensayos de autopolinización manual, no hubo formación de frutos.

La floración de esta especie, tiene lugar en verano, en que las flores comienzan a abrirse entre enero y febrero, hasta mayo (RODRIGUEZ *et al.*, 1983 y MEDEL y MEDEL, 2000). Sin embargo, MUÑOZ (1980), indica que la floración comienza desde octubre. Esta condición de tan largo período de floración y de combinación de estados fenológicos de la flor, está influida fundamentalmente por la segregación genética de plantas, producto de su reproducción por semillas (LOBOS, 1987).

El fruto corresponde botánicamente a una nuez, de forma redondeada, indehisciente de 1,5-2 cm de diámetro, un peso promedio de 2 g de los cuales el 59,8% corresponde a la cáscara, 34,7% a la semilla y 5,6% a la cutícula (MUÑOZ, 1980 y LOBOS, 1987). Entre floración y fruto maduro transcurren de 12 a 14 meses. De cada inflorescencia sólo se desarrollan cinco a siete frutos, de una inflorescencia con 50 flores en promedio, durante la maduración la cáscara inicialmente tiene un color verde, luego toma un color rojo intenso, terminando en la madurez con un color violáceo a negro (a mediados de febrero a fines de marzo) (MEDEL y MEDEL, 2000 y MONTENEGRO, 2000).

2.7.3.1 Polen. El grano polen corresponde a las micrósporas que en su interior lleva a las células fértiles masculinas. Se desarrolla en el interior de sacos polínicos, donde adquiere las características físicas y fisiológicas propias de la especie. Es una célula de forma y tamaño variable según la especie, pudiendo variar de tamaño desde los 2,5 μm hasta los 250 μm (FONT QUER, 1953).

Están protegidos por dos capas: la interna, llamada intina, y la externa, llamada exina (Figura 4). La intina se compone de pectina, y suele ser delicada y químicamente poco resistente, formándose luego de la formación de la exina. Al germinar el grano de polen sólo la intina se desarrolla para dar origen al tubo polínico. La exina a su vez, se caracteriza por su ornamentación y composición química al estar formada esencialmente por esporopoleninas, químicamente muy resistentes y degradables sólo por oxidación; se trata de terpenos, acerca de los que se supone, podrían originarse por polimerización oxidativa de carotenoides o de ésteres de los mismos. Los cuales se depositan durante la formación del grano de polen (FONT QUER, 1953; STANLEY y LINSKENS, 1974 y STRASBURGER *et al.*, 1994).

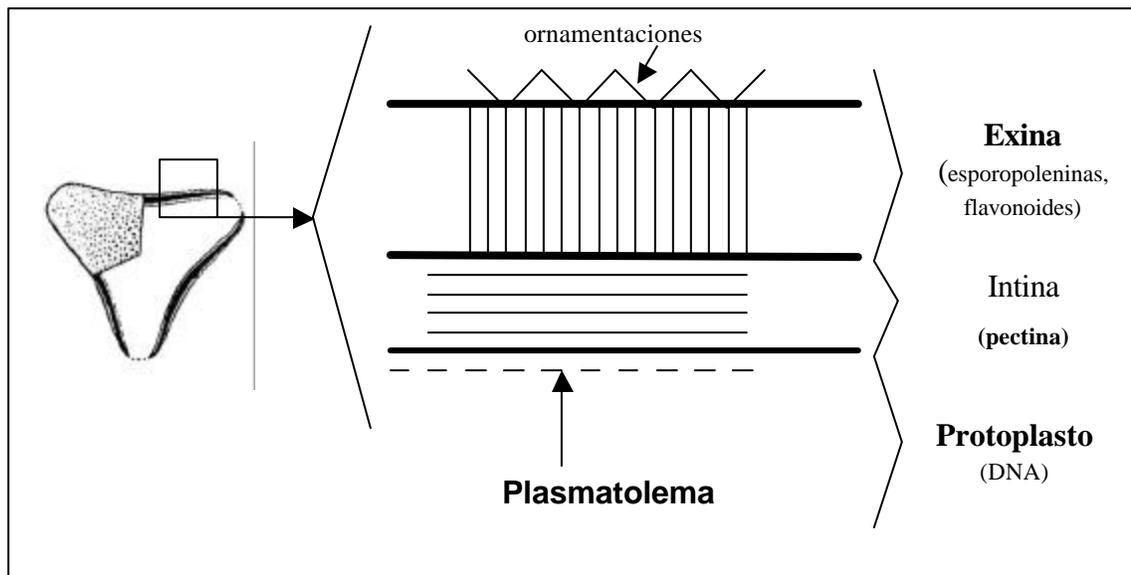


FIGURA 4 Estratas componentes de la pared del grano de polen.

FUENTE: Adaptado de STANLEY y LINSKENS (1974).

Al final de la formación de la pared polínica se da una acumulación en la parte exterior de la exina, de lípidos y pigmentos que otorgan olor y/o color al polen. La síntesis de tales productos se produce en el tapetum (tejido o pared interna de la antera) (STANLEY y LINSKENS, 1974).

Los mismos autores mencionan que el color amarillo en granos de polen es un indicador de la presencia de flavonoides específicamente del tipo: flavones, flavonolinas y antocianinas.

El polen previo a su liberación (desde la antera) sufre una deshidratación, como mecanismo de protección durante el tiempo en que se encuentre expuesto al medio ambiente, pero una vez que alcanza el estigma, donde existe una mayor disponibilidad hídrica, se inicia el proceso de rehidratación. El cual, en primer lugar implica un intercambio polen-estigma (para reconocimiento), y luego hidratación, generándose una protuberancia de la intina formándose un apéndice que se contacta con la papila estigmática. Tal estructura actúa como puente por el cual se establece el flujo de agua (también de nutrientes, proteínas, etc) hacia el grano de polen (TAYLOR y HEPLER, 1997).

Durante la hidratación del grano de polen, en el grano mismo comienza a producirse un flujo de Ca^{2+} , el cual promueve la reorganización citoplasmática que activa la germinación. Mientras que en la zona de emergencia del tubo polínico se produce una pérdida de material proteínico y pectínico, una vez hidratado totalmente el grano de polen, en la misma zona ocurre una depositación de calosa. El tubo polínico emerge a través del apéndice polínico y por medio de la acción de cutinasas (liberadas desde el ápice del tubo polínico) penetra la célula papilar, correspondiente a la superficie del estigma, para continuar su desarrollo, quimotácticamente, a través del estilo hasta el ovario (TAYLOR y HEPLER, 1997 y McCORMICK, 2001).

En el extremo del tubo se encuentra el llamado núcleo vegetativo, quien dirige el desarrollo de dicho tubo, a cierta distancia del mismo, se encuentra el núcleo generativo, el que posteriormente se divide, dando origen a dos núcleos espermáticos. Al llegar el tubo al ovario, pasa al locus o espacio interno y si la ovocélula está madura, el tubo polínico se dirige al primordio seminal, pasa a través del micrópilo, llega hasta el saco

embrional donde el primer núcleo espermático fecunda a la ovocélula y el segundo núcleo a los núcleos centrales, produciendo la doble fecundación (FONT QUER, 1953).

La pared del tubo polínico corresponde a una extensión de la intina, a la cual se adiciona calosa, siendo la primera la pared externa y la calosa la pared interna. Sin embargo dicha cubierta de calosa no se encuentra presente en el ápice del tubo polínico (TAYLOR y HEPLER, 1997).

Un aspecto importante, dentro del proceso de germinación, es el rol que tienen un tipo específico de flavonoides, las flavonolinas. Se ha demostrado que actúan induciendo la germinación y en ocasiones también promoviendo el desarrollo del tubo polínico (STANLEY y LINSKENS, 1974; VOGT y TAYLOR, 1995; TAYLOR y HEPLER, 1997 y Dakora (1995), y Shirley (1996), citados por MEIJKAMP *et al.*, 1999). Además, los mismos TAYLOR y HEPLER (1997), señalan que en base a la evidencia bioquímica e histológica el rol de las flavonolinas se remitiría solamente al período de germinación. Pero aún queda por conocer el mecanismo de acción de estos flavonoides, pues hasta ahora se desconoce como actúan en este proceso, aunque algunos estudios ya han descartado que tengan un rol estructural en la pared celular.

2.7.3.1.1 Polen de *G. avellana* Mol. Se caracteriza por ser isopolar, radiosimétrico, triporados, de poros circulares, de forma triangular más o menos isóceles, con dimensiones aproximadas de 31-36 x 41-58 μm (HEUSSER, 1971 y HEBEL, 1997). Además, BREWBAKER (1967), indica que especies de la familia Proteaceae, se caracterizan por tener granos de polen binucleados.

En las Figuras 5 y 6 se presentan imágenes de granos de polen y granos de polen germinados, de *G. avellana* Mol.

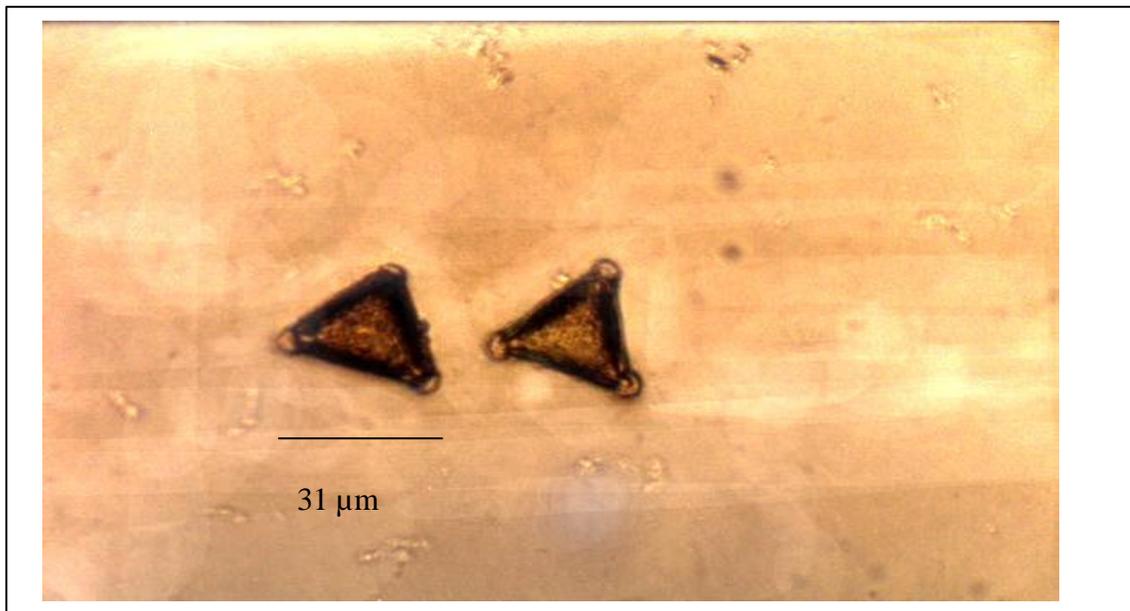


FIGURA 5 Granos de polen de *Gevuina avellana* Mol. cultivados en el medio de sacarosa utilizado en el ensayo.



FIGURA 6 Granos de polen de *Gevuina avellana* Mol., germinados en el medio de sacarosa utilizado en el ensayo, con desarrollo de tubo polínico.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Material.

A continuación se describen los materiales e instalaciones necesarias para el desarrollo de ésta investigación:

3.1.1 Ubicación. Los ensayos se realizaron en los Institutos de Botánica e Instituto de Química de la Facultad de Ciencias, ubicados en el campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

3.1.2 Material Vegetal. Se utilizó polen de *Gevuina avellana* Mol., obtenido de flores frescas colectadas en estado de pre-antesis, o sea, el momento previo a la apertura floral, debido a que estas flores efectúan la apertura de la antera cuando la flor aún se encuentra cerrada, característica de especies protándricas.

3.1.3 Lugar de recolección. El polen que se utilizó, se obtuvo de once árboles de *G. avellana* Mol., los que se encuentran establecidos hace 13 años, provenientes de semilla y que han sido obtenidos por selección y recolectados en la Décima Región.

Los árboles se encuentran ubicados en la Estación Experimental “Santa Rosa”, propiedad de la Universidad Austral de Chile, ubicada entre los paralelos 39° 45’ 36” y 39° 47’ 30” latitud sur y los meridianos 73° 14’ 55” y 73° 13’ 15” longitud oeste, entre 4 y 45 m.s.n.m. y a 5 km de la ciudad de Valdivia, provincia de Valdivia, X Región.

3.1.4 Material de colecta. Los materiales empleados para esta actividad fueron: una tijera, bolsas de papel y una caja aislante (Coleman).

3.1.5 Material de laboratorio. Los implementos usados en laboratorio se indican a continuación:

- Instrumentos ópticos: microscopio óptico Leica Galen III, espectrómetro de luz UV-visible UNICAM INSTRUMENTS (modelo UV-530)
- Instrumentos de precisión: balanza de precisión, micropipeta (Sealvette).
- Instrumentos de vidrio: frascos de vidrio, pipetas, portaobjetos excavados (Superior, 76x26 mm).
- Reactivo: Alexander (ver composición en Anexo 1).
- Otros: pinzas, papel de aluminio, cubreobjetos PVC, agujas enmangadas, pincel, cuaderno, marcador permanente, agua destilada, etanol 70°, contador manual (Hand Taly Counter N°1), Super Mixer (homogeneizador), cámara de flujo laminar, bandejas plásticas, incubadora Lab-Line Imperial II Incubator (Lab-Line instruments) y un refrigerador.

3.1.5.1 Medio de cultivo. A causa de la falta de información respecto a qué medio de cultivo es el más efectivo en la promoción de la germinación *in vitro* del polen de la especie en estudio, se llevaron a cabo ensayos de germinación utilizando los medios descritos por SHIVANNA y RANGASWAMY (1992): Brewbaker y Kwack, Roberts y Hodgkin y Lyon. Además, del elaborado según el método de BAÉZ (1998), modificado (con 4 g de gelatina), este último utilizado en ensayos preliminares con polen de *G. avellana* Mol. (Ver composición de cada uno de los medios en el Anexo 2).

3.1.5.2 Cubreobjetos. Debido a que el cubreobjetos de vidrio (usualmente utilizado en trabajos de laboratorio) tiene la capacidad de absorber la radiación UV-B, fue necesario seleccionar un material transparente que permitiera el paso de la luz y la radiación UV-B, necesarias para la realización del trabajo de tesis. Con tal objeto, se determinó la capacidad de transmisión de radiación ultravioleta, utilizando el espectrómetro de luz UV-Visible (UV-530) el cual registra un espectro entre los 200 hasta los 750 nm, de los siguientes materiales: acetato, mylar, cubreobjetos de vidrio (Corning) y transparencia para escribir (Schwan Stabilo PVC).

Basándose en los resultados obtenidos en las mediciones con el espectrofotómetro, el material que permite el paso de un mayor espectro de la radiación UV-B (además de UV-A y PAR) fue la transparencia para escribir (Schwan Stabilo PVC) (Ver espectro de transmitancia de radiación UV-B de los materiales probados en Anexo 3).

3.1.5.3 Radiación solar con UV-B en exceso. Para simular la radiación solar con un incremento de la radiación UV-B, correspondiente a un 15% de disminución de la capa de ozono según el modelo empírico de Green *et al.* (1980), medido a 25° N citados por SINGH (1996), se utilizaron tubos fluorescentes luz-día (OSRAM, similar a los usados comunmente, con una emisión de 400 a 800 nm) en combinación con lámparas (Philips Q-Panel 313) de radiación ultravioleta del tipo B con un espectro de emisión entre los 260 y 360 nm aproximadamente y con un punto máximo de emisión de 313 nm. La intensidad de radiación es regulada con filtros de vidrio y las longitudes de onda bajo los 280 nm son eliminadas con un filtro de acetato. La combinación de ambas fuentes de radiación suministra una relación fotónica PAR: UV-A: UV-B igual a 100:10:1,15 (espectro de emisión, Anexo 4).

3.1.5.4 Ocular micrométrico. También llamado micrómetro ocular. Este es un disco de vidrio que es portado por un ocular y que lleva grabadas divisiones iguales sin medida conocida, que se superponen sobre el campo microscópico. Este elemento debe calibrarse antes de efectuar cualquier medición. Para ello se utiliza el llamado portaobjetos micrométrico o micrómetro objetivo, en el cual están grabadas líneas paralelas separadas por 0,01 mm= 10 micrómetro (10 μm).

Determinando cuántas unidades del ocular micrométrico se superponen sobre una distancia conocida del micrómetro objetivo, se puede calcular la distancia que mide cada división del ocular en el campo del microscopio. De las calibraciones efectuadas se determinó que 2,7 rayas del ocular equivalían a 400 μm , con lo que se procedió a

transformar los valores medidos, de longitud de tubo polínico, con el ocular utilizando la siguiente fórmula:

$$Longitud = \frac{(Ax400)}{2,7} \quad (\mu\text{m}) \quad (3,1)$$

(donde A corresponde al valor medido con el ocular micrométrico)

Tanto el ocular como el portaobjetos micrométrico utilizados son de la marca Carl Zeiss.

3.2 Método.

La metodología que se utilizó para ver el efecto de el exceso de radiación UV-B en el polen de *G. avellana* Mol. es la siguiente:

3.2.1 Época de recolección. Se realizó la colección de flores desde mediados de marzo hasta fines de abril. El trabajo de laboratorio se realizó desde el momento de contar con polen suficiente para la ejecución de los diferentes ensayos.

3.2.1.1 Recolección y selección del material vegetal. Se seleccionaron al azar aquellas flores que se encontraban en el estado de pre-antesis. Se colectaron en terreno, utilizando una tijera y bolsas de papel en las cuales las flores fueron transportadas dentro de la caja aislante (Coleman), para alterar lo menos posible las flores y de ahí llevadas hasta el laboratorio en el Instituto de Botánica, donde se procedió a extraer el polen, el cual se juntó sin diferenciar el polen de las distintas flores, ni de los diferentes árboles. Para uniformar la cantidad de polen, que se diluye en 5 mL de agua destilada (previo a la siembra) se pesó todo el polen recién colectado y se guardó en papel aluminio, para evitar las variaciones en la relación (número de granos/peso) producto de la

deshidratación. El polen se distribuyó en cantidades de 0,005 g, guardándolo en papel de aluminio para su almacenamiento y conservación refrigerado a 4° C de temperatura.

3.2.2 Cuantificación de granos de polen. Se determinó la cantidad de granos de polen por unidad volumétrica a aplicar por excavación de cada portaobjeto. Esto para lograr obtener un número aproximadamente uniforme de granos de polen por excavación de cada portaobjeto. Para ello se realizaron numerosos conteos, con una relación 0,005 g de polen: 5 mL de agua destilada, utilizando para ello el contador manual, colocando una gota de 10 μ L del polen diluido en un portaobjetos corriente, procediéndose a su conteo, obteniéndose en promedio 322 ± 81.4 granos/10 μ L del polen diluido.

3.2.3 Ensayos de germinación. El polen se cultivó en los cuatro medios señalados anteriormente, para determinar aquel en que el polen logró la mayor germinación (%). El medio que resultó con el mayor porcentaje de germinación fue el medio elaborado según el método de BAÉZ (1998), modificado con 4 g de gelatina, con un porcentaje de germinación de 64,8 %. El cual fue considerado como referencia para los ensayos de irradiación con radiación UV-B, tanto para los tratamientos testigo como para los tratamientos con exceso de UV-B (nivel de germinación (%) de los cuatro medios, Anexo 5). Este resultado se explica según DUFNEY (2002), debido a que granos de polen binucleado no requieren de un medio de germinación especial, como sucede con granos de polen trinucleado, si no que basta con que contenga algún azúcar.

3.2.4 Determinación de viabilidad. Para determinar la viabilidad del polen de *G. avellana* Mol. se tiñeron los granos de polen con el reactivo de Alexander, según el protocolo de SHIVANNA y RANGASWAMY (1992), esto con el objetivo de tener este antecedente, hasta ahora inexistente en esta especie. A fin de descartar que por una baja viabilidad los resultados pudiesen verse aumentados o indujesen a conclusiones erradas.

Para teñir los granos, estos se colocaron sobre un portaobjetos, luego se aplicó el reactivo de Alexander para la tinción de los granos, a continuación se flameó hasta la

emisión de vapores, se cubrió con un cubreobjetos para finalmente contabilizar en el microscopio aquellos granos viables, según método de Alexander, donde el verde de malaquita tiñe de un color verde-calipso la pared y el citoplasma de color fucsia-rosado de aquellos no viables (teñidos de verde).

Se determinó un 99,36% de viabilidad de los granos de polen de *Gevuina avellana* Mol.

3.2.5 Manejo del polen. Para lograr dar las condiciones apropiadas para la realización del ensayo, se ejecutaron las siguientes etapas:

3.2.5.1 Cultivo del polen. Primero se calentó el medio de cultivo seleccionado (medio sacarosa) a baño maría a 50°C. Luego, en la cámara de flujo laminar se distribuyeron 0,1 mL del medio en las excavaciones de los portaobjetos. Enseguida, 10 mL de polen previamente diluido y homogenizado fueron colocados con micropipeta en la excavación de cada portaobjeto, a continuación se cubrió con el cubreobjetos confeccionado con transparencia de PVC. Posteriormente, 50% de los portaobjetos se sometieron a irradiación con exceso de radiación UV-B y el otro 50% (los testigos) se expusieron a una relación fotónica normal (en el Instituto de Química).

3.2.5.2 Radiación con ultravioleta-B (UV-B). Los portaobjetos a irradiar con exceso de UV-B quedarán a 40 cm de distancia de las lámparas y fueron sometidos a una radiación PAR: UV-A: UV-B en relación 100: 10: 1,15 durante 2 tiempos de exposición, 2 y 4 h respectivamente. Se seleccionaron estos tiempos ya que corresponden al lapso de tiempo en que ocurre la germinación de la especie en estudio.

Por otra parte, los tratamientos testigo, se mantuvieron bajo una condición de radiación normal, esto es, una relación PAR: UV-A: UV-B de 100: 10: 1, manteniéndose ambos tiempos de exposición (2 y 4 h).

Las condiciones de temperatura del laboratorio en que se llevó a cabo el ensayo, tanto para los tratamientos con exceso de radiación UV-B como los tratamientos testigo correspondió a la temperatura ambiente del momento, la cual fue de 19 ± 2 °C.

3.2.5.3 Manejo post- tratamiento. Una vez transcurridos los tiempos de exposición respectivos, los portaobjetos (control y exceso) fueron llevados a una incubadora, a 25°C por 24 h con el fin de favorecer la germinación y permitir el libre desarrollo de los tubos polínicos. Luego de esto, fueron almacenados en un refrigerador, a 4°C, para inhibir toda actividad de desarrollo en los granos, para finalmente y a lo menos una hora más tarde realizar las mediciones.

3.2.6 Diseño experimental. El ensayo se enmarca en un diseño con ordenamiento factorial 2 x 2, con dos niveles del factor intensidad de radiación UV- B (100:10:1 y 100:10:1,15) y dos niveles del factor tiempo de exposición (2 y 4 h).

3.2.7 Parámetros a medir. Luego de transcurrido el período de tiempo entre la irradiación y almacenamiento a 4°C, se evaluarán los siguientes parámetros:

- Porcentaje de germinación (%)
- Longitud del tubo polínico (: m)

3.2.7.1 Evaluación de la germinación. Se seleccionaron al azar tres áreas dentro de cada excavación por cada portaobjeto, utilizando el objetivo de 10x del microscopio óptico Leica Galen III, procediéndose a la cuantificación de los granos de polen germinados y no germinados presentes en cada una de estas excavaciones y descartando aquellos granos localizados en el límite de cada área del objetivo 10x del microscopio. Cada área fue seleccionada, con el objeto de evitar confusiones con granos que pudiesen estar sólo en el área límite.

Según la metodología de SHIVANNA y RANGASWAMY (1992), se consideró germinado a aquel grano de polen que presentó un tubo polínico de longitud igual o superior al diámetro del grano de polen, en este caso 31 μm .

3.2.7.2 Evaluación de la longitud del tubo polínico. Se utilizó un ocular graduado Carl Zeiss C 8x y el objetivo 10x.

3.2.8 Análisis estadístico. Los parámetros fueron sometidos a un Análisis de Varianza de Fisher con un nivel de confianza de 95%, para determinar si el experimento cumple con los supuestos de normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los errores.

Para aquellas variables en que se presenten diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los tratamientos, se aplicará el test de Tukey (STEEL y TORRIE, 1988).

El Análisis de Varianza de Fisher y el test de Tukey se realizarán con el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 2.0.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados en esta investigación (Cuadro 1): Porcentaje de Germinación (%) y Longitud de Tubo Polínico (: m) producto de la exposición de polen de *Gevuina avellana* Mol. a dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de irradiación (2 y 4 h).

CUADRO 1 Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la germinación (%) y longitud de tubo polínico (: m) en polen de *Gevuina avellana* Mol.

Factor	Parámetros	
	Germinación (%)	Longitud Tubo Pol. (: m),
Relación Fotónica		
100:10:1	60.52 a*	113.06 a
100.10:1,15	50.71 b*	112.20 a
DHS	6.81	n.s.
Tiempo Exposición (h)		
2	60.58 a*	112.32 a
4	50.64 b*	112.94 a
DHS	6.81	n.s.

Letras distintas representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$ y * $P \leq 0.01$)

De los resultados obtenidos en este ensayo, (Cuadro 1) se puede apreciar que existen diferencias estadísticas altamente significativas para el parámetro porcentaje de

germinación, mientras que en el parámetro longitud de tubo polínico no existieron tales diferencias.

Las posibles causas que expliquen los resultados obtenidos se describen a continuación, analizando cada parámetro separadamente.

4.1 Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la germinación (%) en polen de *Gevuina avellana* Mol.

Al realizar el análisis estadístico del parámetro (Anexo 6) se determinó que ambos factores: Relación Fotónica y Tiempo de Exposición, tuvieron un efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) en el porcentaje de germinación del polen.

Tales resultados concuerdan con lo señalado por CALDWELL *et al.* (1998), y HUISKES *et al.* (1999), quienes plantean que al generarse un desequilibrio en la relación fotónica, entendiéndose por tal un aumento de la radiación UV-B respecto de la relación PAR:UV-A, los efectos ocasionados por la radiación UV-B se hacen más severos en los organismos expuestos, entre ellos el polen. A su vez, en la medida que la exposición a dicha radiación se prolonga, la posibilidad que se produzcan alteraciones en procesos como la germinación polínica, aumentan (TORABINEJAD *et al.*, 1998).

Al comparar las dos relaciones fotónicas utilizadas se observó que existían diferencias estadísticas significativas (Anexo 7). La relación fotónica utilizada para el tratamiento testigo 100:10:1; léase “Control” en adelante, tuvo un 60,52% de germinación, mientras que la relación fotónica con exceso de radiación UV-B 100:10:1.15, léase “Exceso” en adelante, generó un porcentaje de germinación inferior igual a 50,71% (Figura 7).

Ensayos anteriores de germinación de polen *in vitro*, en los cuales fueron utilizados niveles de radiación UV-B aumentados en un 15% (respecto de los actuales, 100:10:1) mostraron una disminución de los porcentajes de germinación (MORGAN,

1994 y ORMROD y HALE, 1995). Lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente ensayo.

En el trabajo realizado por TORABINEJAD *et al.* (1998) donde se estudió el polen binucleado de 26 especies, se comprobó que los granos expuestos a exceso de radiación UV-B, si bien tendieron en su mayoría a reducir su germinación, dicha reducción fue estadísticamente significativa sólo en cinco de ellas. Como conclusión se propuso que el bajo número de respuestas significativas se debería al menor tiempo de germinación del polen, en condiciones *in vitro*, respecto de condiciones *in vivo*.

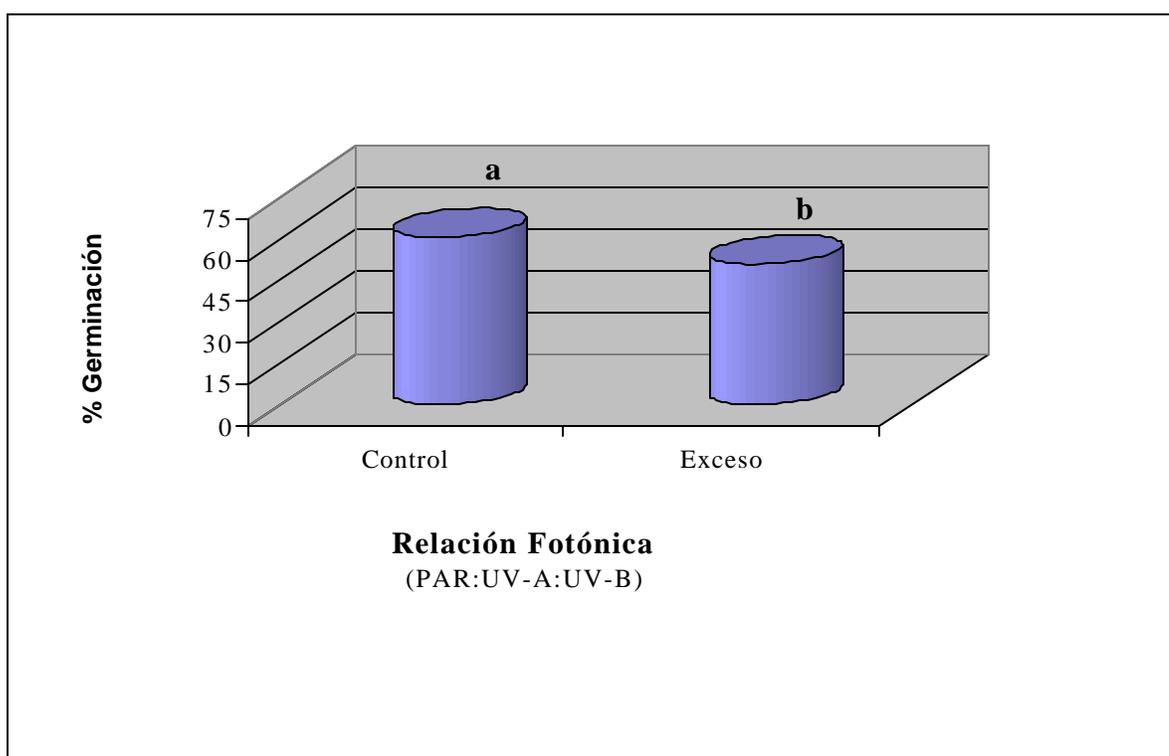


FIGURA 7 Efecto de dos relaciones fotónicas sobre el porcentaje de germinación de polen de *Gevuina avellana* Mol (Tukey 99%).

Sin embargo, es importante destacar que si bien la metodología utilizada en los ensayos antes mencionados es diferente a la utilizada en el presente trabajo, los

resultados sí constituyen un referente de cómo el proceso germinativo del grano polen se ve afectado al ser expuesto a niveles de radiación UV-B mayores a los existentes en la actualidad.

Por otra parte comparando el porcentaje de germinación en función de los tiempos de irradiación se observó: los tiempos de exposición de 2 y 4 h presentaron un 60,58 % y 50,64 % de germinación respectivamente (Anexo 8 y Figura 8). Esto concuerda con lo señalado por TORABINEJAD *et al.* (1998), quienes proponen que el grado de efecto está dado, entre otros factores, por el tiempo de exposición a la radiación UV-B y en la medida que ese lapso sea mayor, estos se incrementan y se hacen más patentes.

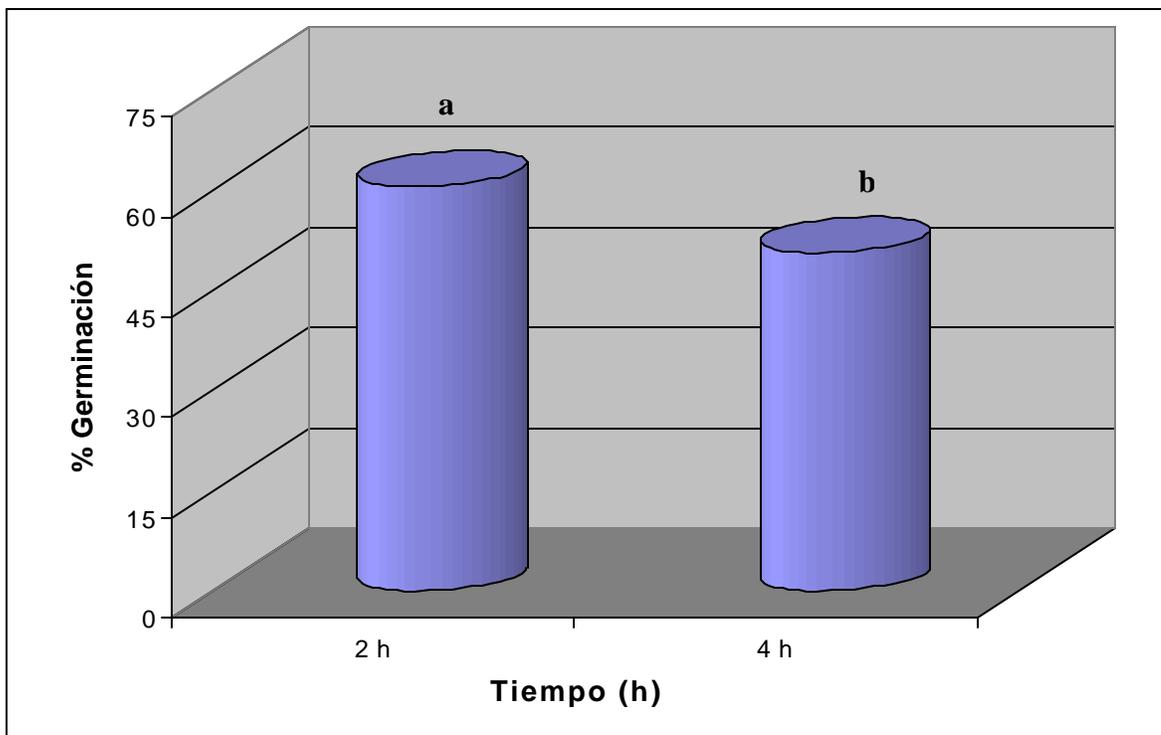


FIGURA 8 Efecto de dos tiempos de exposición sobre el porcentaje de germinación de polen de *Gevuina avellana* Mol. (Tukey 99%).

En relación a lo anterior Flint y Caldwell (1986) citados por TORABINEJAD *et al.* (1998) especulan que granos de polen binucleados, como es el caso de *Gevuina*

avellana Mol., germinan más lentamente que especies con granos trinucleados, aumentando con ello el riesgo de sufrir daño por causa de la radiación UV-B. Sin embargo, TORABINEJAD *et al.* (1998), destaca que aún así, no se puede generalizar que este tipo de respuestas sea característico de este tipo de polen.

El análisis de la interacción de los factores Relación fotónica: Tiempo de exposición (Anexo 6) determinó un efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) sobre el porcentaje de germinación. Como se aprecia en la Figura 9, los tratamientos Control-2 h, Control-4 h y Exceso-2 h no presentan diferencias estadísticas significativas (62,81%, 58,23% y 58,36% respectivamente). Sin embargo, fue el tratamiento Control-2 h el que presentó el mayor porcentaje de germinación, con un 62,81 %, lo que coincide con los valores obtenidos en las pruebas realizadas previo al ensayo mismo, para determinar el medio de germinación a utilizar y que sirven como referente para comparar con los resultados obtenidos en dicho ensayo (Anexo 4).

Una marcada diferencia se observa en el tratamiento Exceso-4 h, en el cual se observan diferencias estadísticamente significativas con los 3 tratamientos antes descritos, logrando sólo un 43,1 % de germinación (Figura 9).

Estos resultados concuerdan en cierta forma con lo indicado por FENG *et al.* (2000), quienes proponen que en la medida que la exposición a la radiación UV-B es mayor, los efectos dañinos aumentan, más aún si el nivel de radiación UV-B excede los niveles actuales (100:10:1), sugiriendo además que el efecto de esta radiación es acumulativo .

Al determinarse el rol inductor de la germinación en polen por parte de las flavonolinas (tipo de flavonoide presente en el polen), como lo señalan STANLEY y LINSKENS (1974); VOGT y TAYLOR (1995); TAYLOR y HEPLER (1997) y Shirley (1996), y Dakora (1995), citados por MEIJKAMP *et al.* (1999), pudiese suceder que sobre cierto límite de exposición a la radiación UV-B la función de este tipo de

flavonoides se viese afectada de alguna manera, con las consiguientes consecuencias en el proceso germinativo. No obstante, tal afirmación sólo constituye una suposición que necesita ser comprobada.

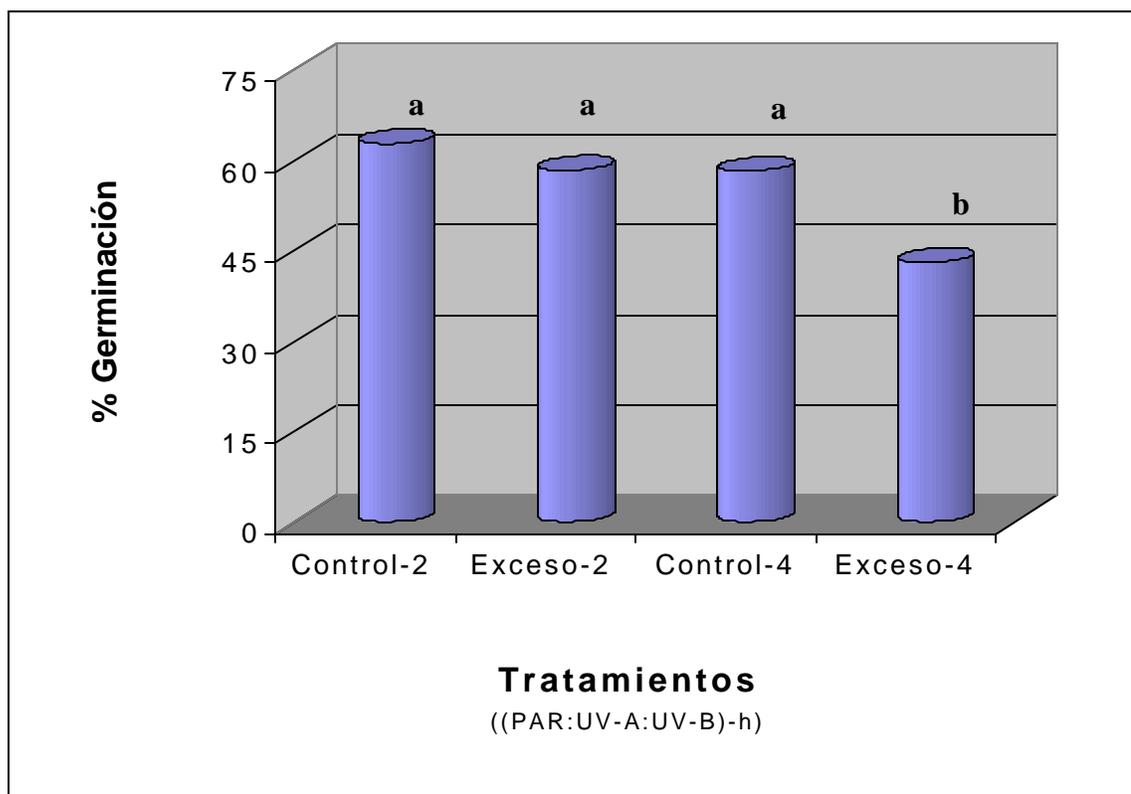


FIGURA 9 Efecto de la interacción relación fotónica: tiempo de exposición sobre el porcentaje de germinación en polen de *Gevuina avellana* Mol. (Tukey 95%).

Sin embargo, a pesar de existir antecedentes sobre disminuciones de germinación por efecto del aumento de la radiación UV-B, lo que como consecuencia afecta el potencial reproductivo de las especies ensayadas, el impacto total de la radiación UV-B en dicho potencial aún es poco claro ORMROD y HALE (1995), y por lo tanto un tema futuro a investigar.

4.2 Efecto de dos relaciones fotónicas (PAR:UV-A:UV-B) y dos tiempos de exposición, sobre la longitud de tubo polínico (μm) en polen de *Gevuina avellana* Mol.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguno de los factores considerados para el análisis del ensayo, tanto relación fotónica como tiempo de exposición, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el parámetro longitud del tubo polínico (Anexo 9 y Cuadro 1). Sin embargo, comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo, con la literatura y al no existir antecedentes sobre un rango de longitud de tubo polínico característico de *Gevuina avellana* Mol., tal aseveración no cuenta con una certeza plena.

Considerando los resultados obtenidos, y comparando con estudios anteriores es interesante tener en cuenta que en el ensayo realizado por TORABINEJAD *et al.* (1998) se utilizaron polen binucleado y trinucleado de diversas especies, en ambos tipos polen observaron una disminución del desarrollo de tubo polínico, siendo las especies con polen trinucleado las más afectadas.

Una posible explicación para los resultados obtenidos, podría tener relación con el origen del tubo polínico. Estudios anteriores han demostrado que el desarrollo del tubo polínico está determinado por el núcleo vegetativo, el cual tiene un origen común con el núcleo generativo. En este último Krupko (1959), citado por STANLEY y LINSKENS (1974), determinó altas concentraciones de flavonoides, lo cual significa una posible protección contra la radiación UV-B, pudiéndose suponer que por el origen común de ambos núcleos, el núcleo vegetativo también pudiese tener estos pigmentos, con el consiguiente rol protector y que explicaría de alguna manera los resultados obtenidos en este ensayo, hecho que aún debe determinarse.

Todos los resultados obtenidos en el presente ensayo sólo constituyen antecedentes del comportamiento de el polen al exponerse a un nivel excesivo de UV-B, pues como señala MORGAN (1994), el mecanismo exacto por el cual la radiación UV-

B daña al polen aún es desconocido. Tal daño pudiese deberse a cuestiones fisiológicas, genéticas o resultar de la alteración de la estructura del polen. Además, los resultados logrados en polen binucleado si bien marcan una tendencia, no garantizan que tal comportamiento sea generalizado en especies con el tipo de polen estudiado anteriormente (TORABINEJAD *et al.*, 1998).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

Se confirma la hipótesis de esta investigación en el sentido que bajo la actual relación fotónica no se producen efectos significativos sobre la germinación ni sobre el desarrollo del tubo polínico en polen de *Gevuina avellana* Mol.

Al aumentar la radiación UV-B y con ello producirse una alteración de la relación fotónica, sí existieron efectos significativos sobre la germinación, pero no sobre el desarrollo del tubo polínico.

La radiación UV-B aumentada en la relación fotónica y en la medida que el tiempo de exposición se prolonga se logra disminuir porcentaje de germinación, sin embargo, este efecto es significativo con el tratamiento Exceso-4 h, pero las causas de ello, hasta ahora son inciertas.

Se comprobó el efecto del aumento de la radiación UV-B en la disminución de la germinación del polen de avellano chileno, lo que confirma el rol de esta radiación como agente alterador del normal funcionamiento del polen.

No se observaron efectos significativos de la radiación UV-B, sobre el crecimiento del tubo polínico, pudiendose considerar que el daño potencial de tal radiación en la especie de polen estudiado es menor respecto de otras especies, en que se ha determinado una inhibición, tanto de la germinación como del crecimiento del tubo polínico, en forma simultánea.

Los resultados obtenidos muestran un efecto inhibitor de la germinación del polen de *G avellana* Mol., dado por una relación fotónica esperable en un futuro próximo, no obstante el impacto de tal efecto sobre el potencial reproductivo de la especie en estudio, es desconocido.

6. RESUMEN

Se determinó el efecto de la radiación UV-B sobre la capacidad de germinación y desarrollo del tubo polínico en polen de *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). Estudio planteado en base al incremento de la radiación UV-B, debido a la disminución de la capa de ozono. El trabajo experimental se efectuó entre marzo y abril de 2001 en el Instituto de Botánica e Instituto de Química de la Facultad de Ciencias, ubicados en el campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

En el polen de la mencionada especie, se midió el efecto de cuatro tratamientos, considerando dos relaciones fotónicas PAR:UV-A:UV-B (100:10:1 y 100:10:1,15) y dos tiempos de exposición (2 y 4 h) sobre los parámetros: porcentaje de germinación (%) y longitud de tubo polínico (μm).

El cultivo *in vitro* del polen se realizó en un medio de germinación de sacarosa y gelatina (10 y 4 g respectivamente) dispuesto en portaobjetos excavados y cubiertos con cubreobjetos de transparencia de PVC para permitir el paso de la radiación UV-B, luego de la irradiación por el tiempo estipulado para cada tratamiento el polen fue puesto en una cámara de germinación a 25°C por 24 h.

Previo a la evaluación de los parámetros del ensayo, los portaobjetos fueron expuestos a 4°C, con objeto de detener al máximo toda actividad biológica en el polen y así tener las condiciones más homogéneas posibles entre cada uno de los portaobjetos del ensayo.

Con respecto al parámetro porcentaje de germinación, los factores relación fotónica y tiempo de exposición tuvieron efectos altamente significativos. Además, la

interacción de ambos factores mostró un efecto inhibitor con el tratamiento 100:10:1,15- 4 h que presentó un 43,1% de germinación, el cual difirió con los demás tratamientos que no tuvieron diferencias significativas entre sí.

Respecto a la longitud de tubo polínico, este parámetro no se vió afectado bajo ninguno de los tratamientos realizados.

SUMMARY

In order to determine the effect of UV-B radiation on pollen germination and pollen tube growth, pollen of *Gevuina avellana* Mol. was exposed to enhanced UV-B radiation. This due to the decrease of the layer of ozone. The experimental work was made between march and april of 2001 in the Institute of Botany and Institute of Chemistry of Sciences Faculty, located in the Isla Teja campus of the Universidad Austral of Chile, in Valdivia.

To this purpose, two factors were considered, the photonic relate PAR:UV-A:UV-B (100:10:1 and 100:10:1,15) and two exposition times (2 and 4 h). The effect of four treatments was measured considering the paramenters: germination percentage (%) and tube growth (μm).

The *in vitro* sowing of the pollen was made in a germination mean of sucrose and jello (10 and 4 g respectively), prepared in microscope slides and covered with coverglass of transparency of PVC to allow the pass of the UV-B radiation, after the irradiation for the time specified for each treatment, the pollen was put in a germination camera at 25°C for 24 h.

Previous to the evaluation, in order to stop the biological activity at the maximum, the microscope slides were exposed at 4°C. In this way, homogeneous conditions were given on each microscope slides of the experiment.

In the case of the germination percentage parameter, photonic relate and time of exhibition factors induce together and inhibit effect. By analysing the treatment with enhanced UV irradiation (100:10:1,15) and longer time of irradiation (4 h) present a

43,1% of germination, that differs regarding the other treatments, which didn't present significant differences within.

Regarding to the tube growth, this parameter wasn't affected under none of the carried out treatments.

7. BIBLIOGRAFIA

- ARTLIP, T. y FUNKHOUSER, E. 1995. Protein Synthetic Responses to Environmental Stress. **In:** Pessaraki, M. (Ed.). Handbook of Plant and Crop Physiology. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp. 627- 644.
- BAÉZ, P. 1998. Análisis Fisiológico y Morfológico de los Granos de Polen en Cuatro Especies del Género *Nothophagus*. Tesis Lic. en Cs. Biológ. Valdivia Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 172p.
- BJÖRN, L. 1999. Ultraviolet-B Radiation, the Ozone Layer and Ozone Depletion. **In:** Rozema, J. (Ed.). Stratospheric Ozone Depletion. The effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. Brackhuys Publishers. Holanda. pp. 21- 37.
- BREWBAKER, J. 1967. The Distribution and Phylogenetic Significance of Binucleate and Trinucleate Pollen Grains in the Angiosperms. American Journal of Botany. 54(9): 1069- 11083.
- CABRERA, S.; BOZZO, S. y FUENZALIDA, H. 1995. Variations in UV Radiation in Chile. Journal of Photochemistry and Phothobiology B: Biology. 28: 137-142.
- CACERES, O.; ANRIQUE, R.; VOULLIEME, S. y MENDEZ, C. 1982. Utilización del Fruto del Avellano (*Gevuina avellana* Mol.) en Alimentación de Pollas Cornish de 0 a 30 días de Edad. Simiente 52(3): 161

- CALDWELL, M. 1978. Ultraviolet Radiation and Plants. **In:** Plant Physiology. 2^a ed. Wadsworth Publishing Company Inc. U.S.A. pp. 397- 399.
- CALDWELL, M.; BJÖRN. L.; BORNMAN, J.; FLINT, S.; KULANDAIVELU, G.; TERAMURA, A. y TEVINI, M. 1998. **In:** The U.S. Global Change Research Information Office. Capítulo 3. <<http://www.gcric.org/UNEP1998/UNEPtoc.html>>. (20 diciembre 2001).
- CARVER, G. 1998. Part I: The History Behind the Ozone Hole. **In:** The Ozone Hole Tour. Centre for atmospheric science. University of Cambridge.<<http://www.atm.ch.cam.ac.uk/tour/part1.html>> (23 mayo 2001).
- DIFFEY, B. 1991. Solar Ultraviolet Radiation Effects on Biological Systems. **In:** Center for International Earth Science Information Network (CIESIN). Columbia University. U.S.A. <<http://www.ciesin.columbia.edu/does/001-503/001-503.html>>. (05 diciembre 2001).
- DEMCHIK, S. y DAY, T. 1996. Effect of Enhanced UV-B Radiation on Pollen Quantity, Quality, and Seed Yield in *Brassica rapa* (Brassicaceae). American Journal of Botany 83(5): 573-579.
- DONOSO, C. 1978. Avance de Investigación: Antecedentes Sobre Producción de Avellanas. Bosque (Chile) 2(2):105-109.
- DONOSO, C.; CORTEZ, M y ESCOBAR, B. 1992. Técnicas de Vivero y Plantaciones para Avellano (*Gevuina avellana*). Documento Técnico N°63. Publicado con Chile Forestal N°196. Corporación Nacional Forestal. 7 p.
- DONOSO, C. 1993. Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica. Ecología Forestal. Universitaria. Santiago. Chile. 483p.

- DONOSO, C.; DONOSO, P.; GONZALEZ, M y SANDOVAL, V. 1999. Los Bosques Siempreverdes. **In:** Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile. ed. Donoso, C. y Lara, A. Santiago. ed. Universitaria. pp. 297- 339.
- DUFNEY, A. 30 de enero de 2002. Pollen and Stigma Biology. Correo personal.<adufney@research.haifa.ac.ie>(02 febrero de 2002).
- FENG, H.; AN, L.; TAN, L.; HOU, Z. y WANG, X. 2000. Effect of Enhanced Ultraviolet-B Radiation on Pollen Germination and Tube Growth of 19 Taxa *In Vitro*. Environmental and Experimental Botany. 43(1): 45-53 (original no consultado) Compendiado en CAB Abstracts 2000: 20000309502.
- FONT QUER, P. 1953. Diccionario de Botánica. ed. Labor S. A. España, 1244 p.
- GREENBERG, B.; WILSON, M.; HUANG, X.; DUXBURY, C.; GERHARDT, K. y GENSEMER, R. 1997. The Effects of Ultraviolet-B Radiation on Higher Plants. **In:** Wang, J.; Gorsuch, J. (Ed.). Plants for Environmental Studies. Lewis Publishers. U. S. A. pp. 1- 26.
- HALLOY, S.; GRAU, A. y McKENZIE, B. 1996. Gevuina Nut (*Gevuina avellana* Proteaceae), a Cool Climate Alternative to Macadamia. Economic Botany 50(2): 224-235.
- HEBEL, I. 1997. Análisis Comparativo del Polen de Proteaceae Actual y Fósil de Isla Rey Jorge, Antártica y Chile Continental. Tesis de Lic. Ag. Universidad de Chile. Santiago. 140p.
- HEUSSER, C. 1971. Pollen and Spores of Chile. Modern Types of the Pteridophyta, Gymnospermae, and Angiospermae. The University of Arizona Press. U. S. A. 167p.

- HEYWOOD, V. 1993. Flowering Plants of the World. ed. B.T. Batsford Ltda. London. 335p.
- HOFFMANN, A. 1982. Flora Silvestre de Chile Zona Araucana: Árboles, Arbustos y Enredaderas Leñosas. 2^a ed. Ediciones Claudio Gay. Santiago, Chile. 257p.
- HOPKINS, W. 1999. Introduction to Plant Physiology. 2^a ed. Wiley, U. S. A. 512p.
- HUISKES, A.; LUD, D.; MOERDIJK-POORTVLIET, T. y ROZEMA, J. 1999. Impact of UV-B Radiation on Antarctic Terrestrial Vegetation. **In:** Stratospheric Ozone Depletion. The Effects of Enhanced UV-B radiation on Terrestrial Ecosystems. ed. Rozema, J. Backhuys Publishers. Holanda. pp. 313-337.
- KOHEN, E.; SANTUS, R. Y HIRSCHBERG, J. 1995. Photobiology. Academic Press. U. S. A. 506p.
- KULANDAIVELU, G; LINGAKUMAR, K. y PREMKUMAR, A. 1996. UV-B Radiation. **In:** Plant Ecophysiology. Ed. Prasad, M. John Wiley And Sons, Inc. India. pp. 41-60.
- LAMBERS, H.; STUART, F. y PONS, T. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag New York Inc. U. S. A. 540p.
- LOBOS, W. 1987. Avellano Chileno. Investigación y Progreso Agropecuario (IPA) Carillanca (Chile). 6(2): 12- 14.
- LOVENGREEN.C.; FUENZALIDA, H. y VILLANUEVA, L. 2000. Ultraviolet Solar Radiation at Valdivia (39.8°S). Atmospheric Environment 34(2000): 4051-4061.

- McCORMICK LAB, 2001. Pollen Tube Growth. **In:** Plant Gene Expression Center (PGEC). U.S. Department of Agriculture- California University. <<http://www.pgec.usda.gov/McCormick/Smpollenmuts.html>> (03 enero 2002).
- McQUARRIE, D. y ROCK, P. 1984. General Chemistry. 3^a ed. Freeman and Company. U.S.A. 1083p.
- MADRONICH, S.; MCKENZIE, R.; BJÖRN, L. y CALDWELL, M. 1998. Chapter 1: Changes in Biologically Active Ultraviolet Radiation Reaching the Earth's Surface. **In:** The U.S. Global Change Research Information Office. Capítulo 1 <<http://www.gcric.org/UNEP1998/UNEPtoc.html>>. (20 diciembre 2001).
- MEIJKAMP, B.; AERTS, R.; VAN DE STAAIJ, J.; TOSSERAMS, M.; ERNST, W. y ROZEMA, J. 1999. Effects of UV-B on Secondary Metabolites in Plants. **In:** Stratospheric Ozone Depletion. The Effects of Enhanced UV-B radiation on Terrestrial Ecosystems. ed. Rozema, J. Backhuys Publishers. Holanda. Pp. 71-99.
- MEDEL, F. 1978. Situación y Perspectivas de la Fruticultura en el Sur de Chile. *Agro Sur (Chile)*. 6(1): 35- 41.
- MEDEL, F. 1987. Arboles Frutales: Situación y Potencial en el Sur de Chile. Corporación de Fomento de la Producción- Universidad Austral de Chile. 59p.
- MEDEL, F. 1990. Veinte Años de Investigación y Desarrollo Frutícola en el Sur de Chile (1970-1990). *Agro Sur* 18(2):119-131.
- MEDEL, F. y MEDEL, R. 2000. *Gevuina avellana* Mol.: Características y Mejoramiento Genético de un Frutal de Nuez Nativo para el Mercado Internacional. *Revista Frutícola (Chile)*. 21(2): 37-46.

- MONTENEGRO, G. 2000. Chile Nuestra Flora Útil. Guía de Uso Apícola Medicinal Folclórica, Artesanal y Ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. 267p.
- MOORE, R.; CLARK y VODOPICH, D. 1998. Botany. 2^a ed. WCB/ McGraw- Hill. U.S.A. 919p.
- MORGAN, M. 1994. Rising UV Radiation Damages Forest Tree Pollen. **In:** Technical Highlights. Oak ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy. <<http://www.ornl.gov/ORNL.Review/rev26-1/net1026.html>> (01 enero 2002).
- MUÑOZ, M. 1980. Flora del Parque Nacional Puyehue. Universitaria S.A. Santiago, Chile. 557p.
- NOBEL, P. 1999. Plant Physiology. Physicochemical and Environmental. 2^a ed.. Academic Press. U.S.A. 474p.
- NUESTRA TIERRA. 1990. Avellanas: Alternativas de Industrialización. Nuestra Tierra (27): 11-14 (Chile).
- ORGANIZACIÓN METEOROLÓGICA MUNDIAL (O.M.M.) y PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE (PNUMA). 2001. Ciencia del Agotamiento de la Capa de Ozono. El Futuro. <<http://www.ine.gob.mx/dgra/ucci/upo/doc07.htm>> (15 enero 2002)
- ORMROD, D. y HALE, B. 1995. Physiological Responses and Crops to Ultraviolet-B Radiation Stress. **In:** Pessarakli, M. (Ed.). Handbook of Plant and Crop Physiology. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp. 761- 770.

- PEREZ, F. y MARTINEZ- LABORDE, J. 1994. Introducción a la Fisiología Vegetal. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid. España. 218p.
- RAMIREZ, C.; GRINBERGS, J.; VALENZUELA, E. y SAN MARTIN, M.C. 1990. Influencia de las Raíces Proteiformes en el Desarrollo de Plántulas de *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). Bosque (Chile) 11(1). 11-20.
- RIVEROS, M.; VERA, M. y NEIRA, M. 1999. Longevidad Floral y Protandria en *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). Resumen P-71. **In:** XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Biological Research 32(2-3): 221.
- RODRIGUEZ, R.; MATTHEI, O. y QUEZADA, M. 1983. Flora Arbórea de Chile. Universidad de Concepción. Chile. 408 p.
- ROUSSEAUAX, M.; BALLARÉ, C.; GIORDANO, C.; SCOPEL, A.; ZIMA, A.; SZWARCBERG-BRACCHITTA, M.; SEARLES, P.; CALDWELL, M. y DÍAZ, S. 1999. Ozone Depletion and UVB Radiation: Impact on Plant DNA Damage in Southern South America. **In:** PNAS Online. 96(26): 15310-15315. <<http://www.pnas.org/cgi/content/full/96/26/15310>>. (10 noviembre 2001).
- ROZEMA, J.; VAN DE STAAIJ, J.; BJÖRN, L. y DE BAKKER, N. 1999. Depletion of Stratospheric Ozone and Solar UV-B Radiation: Evolution of Land Plants, UV-Screens and Functions of Polyphenolics. **In:** Stratospheric Ozone Depletion. The Effects of Enhanced UV-B radiation on Terrestrial Ecosystems. ed. Rozema, J. Backhuys Publishers. Holanda. Pp. 1-20.
- SALISBURY, F. y ROSS, C. 1992. Plant Physiology. 4^a ed. Wadsworth, Inc. U.S.A. 682p.

- SINGH, A. 1996. Growth, Physiological, and Biochemical Responses of Three Tropical Legumes to Enhanced UV-B Radiation. *Canadian Journal of Botany*. 74: 135-139.
- SHIVANNA, K. y RANGASWAMY, N. 1992. *Pollen Biology. A Laboratory Manual*. Ed. Springer- Verlag. Alemania. 119p.
- STANLEY, R. y LINSKENS, H. 1974. *Pollen Biology Biochemistry Management*. Springer-Verlag. Berlin. 317p.
- STEEL, R. y TORRIE, J. 1988. *Bioestadística : Principios y Procedimientos*. 2^a ed. McGraw- Hill. México. 621p.
- STRASSBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. y SCHIMPER, A. 1994. *Tratado de Botánica*. 8^a ed. Castellana. Omega. Barcelona. España. 1068p.
- TAIZ, L. y ZEIGGER, E. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings, U.S.A. 559p.
- TAPIA, C. 2000. *Caracterización de la Entomofauna Asociada a Flores de Avellano Chileno (*Gevuina avellana* Mol.) y Algunos Aspectos de su Biología Reproductiva*. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile., Facultad de Ciencias Agrarias. 115p.
- TAYLOR, L. y HEPLER, P. 1997. Pollen Germination and Tube Growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 461-491
- TORABINEJAD, J.; CALDWELL, M.; FLINT, S. y DURHAM, S. 1998. Susceptibility of Pollen to UV-B Radiation: An Assay of 34 Taxa. *American Journal of Botany*. 85(3): 360- 369.

- URBAN, O. 1934. Botánica de las Plantas Endémicas de Chile. Sociedad Imprenta y Litográfica. Concepción. Chile. 291 p.
- VERA, M.; RIVEROS, M. y NEIRA, M. 1999. Floración y Protandria en *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). **In:** V Exposición Científica Universidad Austral de Chile, 29-30 Nov., 01 Dic. 1999. Valdivia. Chile. R-31. 48p.
- VERA, M.; RIVEROS, M. y NEIRA, M. 2000a. Fenología y Reproducción en *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). **In:** XII Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile- XXVII Jornadas Argentinas de Botánica. Gayana Botánica (suplemento) 57: 91- 92.
- VERA, M.; TAPIA, C.; RIVEROS, M. y NEIRA, M. 2000b. Actividad de *Apis mellifera* L. en Avellano Chileno (*Gevuina avellana* Mol.) y su Incidencia en la Formación de Frutos. **In:** VI Encuentro Nacional de Ciencia y Tecnología Apícola, 12 al 14 de agosto del 2000. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.
- VOGT, T. y TAYLOR, L. 1995. Flavonol 3-O-Glycosyltransferases Associated with Petunia Pollen Produce Gametophyte-Specific Flavonol Diglycosides. Plant Physiology. 108: 903-911.
- WALBOT, V. 2001. Final Report: Impact of Ultraviolet Light on Maize. **In:** National Center for Environmental Research. Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Science to Achieve Results (STAR) Program. <<http://es.epa.gov/ncer/final/grants/96/envbio/walbot.html>>. (06 diciembre 2001).

ANEXOS

ANEXO 1 Composición del reactivo para tinción diferencial de Alexander

- Para obtener el reactivo utilizado en la tinción se mezclaron los siguientes elementos:

- 20 mL de solución al 1% de verde de malaquita en etanol

- 50 mL agua destilada

- 40 mL glicerol

- 10 mL de solución acuosa de fucsina ácida (1%) con 1g de fenol

- 5g de fenol

- Luego se adiciona ácido láctico, en cantidad de 2-4 mL, cantidad utilizada para granos de pared gruesa

La mezcla se deja en un frasco oscuro por 8-10 días antes de usarse.

ANEXO 2 Composición de los medios de cultivo utilizados en pruebas de germinación con polen de *Gevuina avellana* Mol.

Medio Brewbaker y Kwack:

- Sacarosa	10%
- Ác. bórico	100 mg/L
- Nitrato de Calcio	300 mg/L
- Sulfato de magnesio	200 mg/L
- Nitrato de potasio	100 mg/L

Medio Robert:

- Sacarosa	20%
- Ác. bórico	10 mg/L
- Cloruro de calcio	362 mg/L
- Nitrato de potasio	100 mg/L

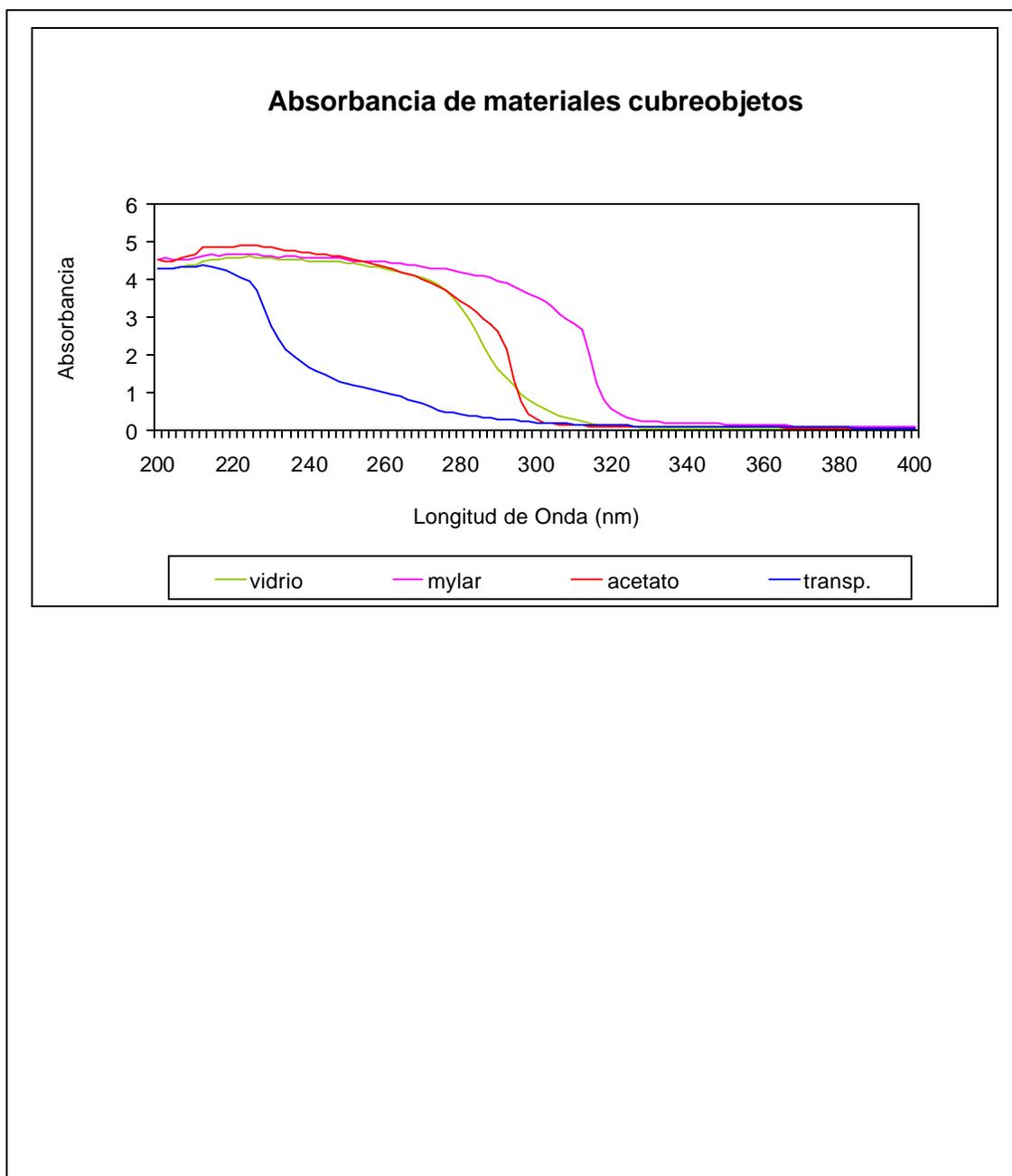
Medio Hodgkin y Lyon:

- Sacarosa	20%
- Ác. bórico	100 mg/L
- Nitrato de Calcio	400 mg/L
- Nitrato de potasio	100 mg/L
- Sulfato de magnesio	200 mg/L

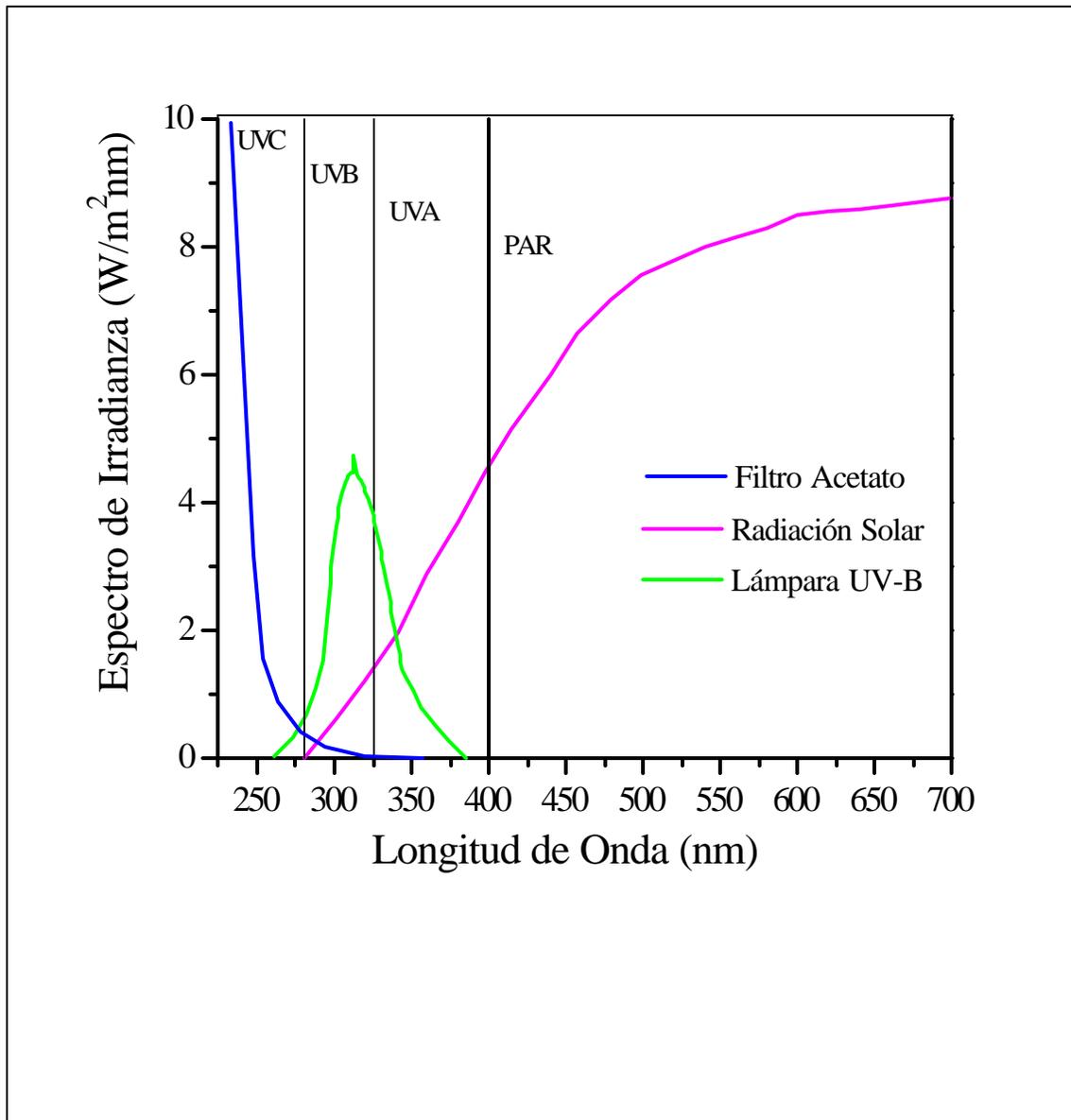
Continuación Anexo 2.**Medio según método modificado de BAEZ (1998):**

- | | |
|------------|-------|
| - Sacarosa | 10 gr |
| - Gelatina | 4 gr |

ANEXO 3 Espectro de transmitancia de radiación UV-B de los materiales acetato, mylar, cubreobjetos de vidrio (Corning) y transparencia para escribir (Schwan Stabilo PVC).



ANEXO 4 Distribución espectral de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre compuesta por radiación ultravioleta (UV-B y UV-A) y radiación fotosintéticamente activa (PAR), simulada por la fuente de radiación UV-B (Philips Q-Panel 313) y del filtro de acetato utilizado para filtrar las radiaciones UV-C (<280 nm) emitidas por la lámpara.



ANEXO 5 Nivel de germinación (%) en los medios Brewbaker y Kwack, Roberts y Hodgkin y Lyon. Además del elaborado según el método de BAÉZ (1998) modificado (con 4 g de gelatina)

Medio Brewbaker y Kwack:

- Repetición 1= 52,90
 - Repetición 2= 51,30
 - Repetición 3= 52,30
 - Repetición 4= 49,90
- Promedio 51,60 ± 1.3**

Medio Robert:

- Repetición 1= 47,80
 - Repetición 2= 49,10
 - Repetición 3= 43,50
 - Repetición 4= 46,40
- Promedio 46,70 ± 2.4**

Medio Hodgkin y Lyon:

- Repetición 1= 46,80
- Repetición 2= 45,70
- Repetición 3= 42,60
- Repetición 4= 48,40

Promedio 45,88 ± 2.4

Continuación Anexo 5.**Medio según método modificado de BAEZ (1998):**

- Repetición 1= 65,20

- Repetición 2= 64,30

- Repetición 3= 67,00

- Repetición 4= 62,70

Promedio 64,80 ± 1.8

ANEXO 6 Análisis de Varianza para el parámetro porcentaje de germinación en polen de *Gevuina avellana* Mol.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	P cal	P (0.05)
Factores					
Radiación	384.944	1	384.944	19.51	0.0008
Tiempo	395.214	1	395.214	20.03	0.0008
Interacción					
Rad.-Tpo.	115.133	1	115.133	5.83	0.0326
Error	236.807	12	19.7339		
Total	1132.1	15			

ANEXO 7 Test de comparación de medias de Tukey (99%) para el parámetro porcentaje de germinación en polen de *Gevuina avellana* Mol. considerando dos relaciones fotónicas PAR:UV-A:UV-B.

Tratamiento	n	Promedios	Comparaciones
100:10:1	8	60.5175	X
100:10:1,15	8	50.7075	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
100:10.1-		*9.81	6.80549
100:10:1,15			

* Denota diferencias estadísticamente significativas

ANEXO 8 Test de comparación de medias de Tukey (99%) para el parámetro porcentaje de germinación en polen de *Gevuina avellana* Mol. considerando dos tiempos de exposición (h)

Tratamiento	n	Promedios	Comparaciones
2 h	8	60.5825	X
4 h	8	50.6425	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
2 h-4 h		* 9.94	6.80549

* Denota diferencias estadísticamente significativas

ANEXO 9 Análisis de varianza para el parámetro longitud de tubo polínico en polen de *Gevuina avellana* Mol.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	P cal	P (0.05)
Factores					
Radiación	2.93266	1	2.93266	0.02	0.8899
Tiempo	1.55626	1	1.55626	0.01	0.9197
Interacción					
Rad.-Tpo.	252.413	1	252.413	1.72	0.2142
Error	1760.96	12	146.747		
Total	2017.86	15			