

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTABLECIMIENTO DE
PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE *Rubus geoides* Sm.**

MELISSA INÉS FREDES OLIVOS

Santiago, Chile

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTABLECIMIENTO DE
PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE *Rubus geoides* Sm.**

**DESCRIPTION OF THE MORPHOLOGY AND ESTABLISHMENT OF
Rubus geoides Sm. SEED GERMINATION PROTOCOL**

MELISSA INÉS FREDES OLIVOS

Santiago, Chile

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTABLECIMIENTO DE
PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE *Rubus geoides* Sm.**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

MELISSA INÉS FREDES OLIVOS

Profesores Guías	Calificaciones
Sr. Carlos Muñoz Schick Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph.D.	7,0
Sr. Ricardo Pertuzé Concha Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	7,0
Profesores Evaluadores	
Sra. Loreto Prat del Río. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,8
Sr. José Ignacio Covarrubias Peña Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. Dr.	6,5

Santiago, Chile

2014

A mis padres, hermana y abuelos

AGRADECIMIENTOS

Sentarme a escribir acerca de todo lo que influyó en mi camino hasta aquí, me resulta como un universo de personas y cosas importantes que se confabularon para poder yo conseguirlo. Pienso en los logros, en todo lo que se va alcanzando en la medida que se tiene paciencia, esfuerzo y, por sobre todo, amor. Mis padres han sido el ejemplo de amor para mi hermana y para mí, quienes con su incondicionalidad nos han entregado las herramientas necesarias para ser quienes somos hoy. Mis abuelos se encargaron de complementar ese amor y educación que fue esencial para nuestra formación.

Mientras pasa el tiempo voy recordando todos los momentos desde mi infancia hasta hoy que me transformo en una profesional. El tiempo entrega frutos que solo con tiempo se consideran como tal.

*“...Y un astrónomo dijo, ‘Maestro, ¿qué del Tiempo?’ Y él contestó:
Medirías el tiempo, el sin límite y el incommensurable.
Ajustarías tu comportamiento y hasta dirigir el rumbo de tu espíritu según horas y las estaciones.
Del tiempo harías un arroyo en cuya orilla te sentarías y mirarlo fluyendo.
Pero lo eterno dentro de ti es consciente de la eternidad de la vida,
Y sabe que ayer sólo es la memoria de hoy y mañana es el sueño de hoy.
Y lo que canta y considera dentro de ti todavía habita dentro de los bordes de ese primer momento que salpicó las estrellas en el espacio.
Y, ¿quién de Uds. no se siente que su poder de amar es sin límite?
Pero, ¿quién no siente ese mismo amor, aunque es sin límite, contenido en el centro de su ser, y no moviéndose de pensamiento del amor a pensamiento del amor, ni de acto del amor a otro acto del amor?
Y, ¿el tiempo no es como el amor, íntegro y sin ritmo?
Pero, si en tu pensamiento tienes que medir el tiempo por estaciones, que cada estación rodee todas las otras estaciones,
Y que hoy abrace al pasado con recuerdo y al futuro con anhelo...” (Kahlil Gibran)*

Quiero agradecer a mis padres Catalina y Mario por darme la vida, por darme amor y por hacerme entender que todo esfuerzo tiene su recompensa. Mi madre es mi ejemplo, su coraje y bondad hacen que solo quiera alcanzar lo que ella es. Mi padre es completo, y en sus ojos se refleja el esfuerzo de trabajo y responsabilidad. A mi hermana Daniela, por ser mi mejor amiga y escuchar mis anhelos y frustraciones, por darme su apoyo incondicional que siempre sentí de su parte, por cuidarme y llevarme de la mano, por protegerme. Siempre cuidaremos la una de la otra. A mi Nonita por dar todo lo que ella es por nosotros, ella es amor. A mi Tata por su luz.

Mis amigos Freddy, Carlitos, Mariela, Daniela y Payo me entregaron todas las risas que quise soltar, noches de estudio sin dormir, discusiones que me hicieron entrar en razón, pero por sobre todo me dieron su amistad, maravillosa. A mi amiga Day, que aunque sea por un encuentro casual, siempre estuviste cerca, nuestra conexión, ambas sabemos la importancia de tener una familia increíble.

No dejo de lado a mis profesores Carlos y Ricardo. Gracias por su paciencia, enseñanza y cariño para llevar a cabo este trabajo. Gracias por su espera y por ser parte de mi logro profesional.

Veó mi futuro engrandecido gracias a todas las personas que han pasado por mi vida y han dejado una semilla de amor y sabiduría, pero más importante aún son las personas que llegan y se quedan en mi vida. Me siento satisfecha por mis pequeños logros alcanzados hasta ahora. Quiero seguir creciendo y estudiando, mejorando quien soy y cumpliendo nuevos sueños, para mirar hacia atrás y darme cuenta que tuve algo que dejar.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Materiales	7
Metodología.....	7
Análisis morfológico y anatómico de la semilla.....	7
Viabilidad de semilla	8
Definición de los requerimientos de germinación	8
Evaluaciones.....	13
Análisis Estadístico	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
Análisis Morfológico.....	15
Análisis Anatómico	16
Germinación de la semilla.....	24
Estudio 1. Eliminación de exodormancia	24
Estudio 2. Eliminación de endodormancia	27
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMEN

La frutilla magallánica o Miñe-miñe (*Rubus geoides* Sm.), es una especie nativa de Chile y Argentina, que produce frutos similares a los de la frambuesa cultivada. Actualmente existe interés por domesticar esta especie, sea para ser introducida a cultivo o para incorporar su pool genético al de la frambuesa cultivada.

Este trabajo aporta al conocimiento de la semilla y de los factores que contribuyen a la baja germinación que normalmente la especie presenta. Para ello se realizó una descripción de la morfología y anatomía de la semilla utilizando microscopía de luz y electrónica de barrido y se evaluaron diferentes métodos para eliminar su eventual exo y endodormancia con el propósito de elaborar un protocolo estandarizado para la germinación de la semilla de esta especie.

La semilla, de color pardo pálido, es semiglobosa, de 2,6 mm de ancho por 1,9 mm de largo y 1,3 mm de grosor. El pireno comprende el endocarpo, la testa, el endosperma y el embrión. El endocarpo tiene un grosor promedio de 0,014 mm, con una zona externa rugosa dada por depresiones redondeadas y crestas con bordes pronunciados. En la zona media se observan esclereidas alargadas y delgadas, con ordenamiento regular y unidas entre sí. La zona interna presenta esclereidas ordenadas, esféricas, pero de menor tamaño. La testa es delgada y bajo ella se encuentra el endosperma rodeando al embrión. El embrión ocupa el mayor volumen de la semilla y mide entre 1,6 a 2,0 mm.

Para la germinación se evaluó la escarificación con ácido sulfúrico concentrado (98%), hipoclorito de sodio (2,5%) y lija, donde el ácido fue el más efectivo para eliminar la exodormancia. Para la eliminación de la endodormancia se evaluó el nitrato de potasio (0,034%), el ácido giberélico (0,002%), una mezcla de ambos, agua y la estratificación a 5° C en oscuridad por 30 y 60 días.

Los resultados de los tratamientos antes indicados permitieron establecer un protocolo de germinación consistente en un tratamiento pregerminativo de escarificación por 1 h con ácido sulfúrico concentrado (98%), seguido de una estratificación a 5° C por 60 días, bajo condiciones de humedad y oscuridad, lo que permitió obtener una germinación cercana al 12% luego de tres semanas en una cámara de germinación a 24±1° C, bajo iluminación.

Palabras claves: frutilla magallánica, escarificación, estratificación.

ABSTRACT

The Magellan strawberry or Miñe miñe (*Rubus geoides* Sm.) is a native species from Chile and Argentina, which produces a fruit similar to the cultivated raspberry. There is current interest in domesticating this species to be introduced to cultivation or to incorporate its genetic pool to the cultivated raspberry.

This work contributes to the knowledge of the seed and the factors involved to the poor germination this species usually presents. To do this, a description of the morphology and anatomy of the seed was done using light and scanning electron microscopy, and different methods were used to break both exo and endodormancy, in order to elaborate a standardized protocol for seed germination of this species.

The pale and rounded seed is 2.6 mm wide 1.9 mm long and 1.3 mm thick. The pyrene comprises the endocarp, testa, endosperm and embryo. The endocarp has an average thickness of 0.014 mm with a rough outer zone caused by rounded depressions and ridges with sharp edges. In the middle long and thin sclereids are present, in a regular arrangement and joined together. The inner area showed ordered spherical sclereids, but of smaller size than those present of the middle area. The testa is thin and under it endosperm covers the embryo. The embryo is between 1.6 to 2.0 mm in length.

For germination scarification with concentrated sulfuric acid (98%), sodium hypochlorite (2.5%) and sandpaper was evaluated, being the acid the most effective for removing exodormancy. For removing endodormancy potassium nitrate (0.034%), gibberellic acid (0.002%), a mixture of both, water and stratification at 5 ° C in darkness for 30 and 60 days were evaluated.

Results of the above mentioned treatments, allowed for the establishment of a germination protocol consisting of a pregerminative scarification treatment with concentrated sulfuric acid (98%) for 1 h, followed by stratification at 5 ° C for 60 days, under humidity and dark conditions, which resulted in a 12% germination after three weeks in a germination chamber at 24 ± 1 ° C, under illumination.

Keywords: Magellan strawberry, scarification, stratification.

INTRODUCCIÓN

La especie *Rubus geoides* Sm., conocida como frambuesa silvestre, frutilla de Magallanes o miñe-miñe, es una especie nativa de la Patagonia que produce frutos rojos carnosos, formados por numerosas drupas pequeñas o drupéolos, agregados y unidos entre sí a un receptáculo común. Los drupéolos de las especies del género *Rubus* están constituidos por un exocarpo delgado, un mesocarpo carnoso y un pireno duro que consiste en un endocarpo esclerenquimatoso que rodea a la semilla (Nybom, 1980; Tomlik-Wyremblewska *et al.*, 2010).

El fruto puede ser consumido en fresco o procesado como mermeladas o jaleas (Vater y Arena, 2005). La especie pertenece a la familia Rosaceae, donde *Rubus* es uno de sus muchos géneros, y al subgénero *Comaropsis* (Alice y Campbell, 1999). El género *Rubus* contempla 12 subgéneros y alrededor de 750 especies, entre las cuales se cuentan algunas especies cultivadas como la frambuesa (*Rubus idaeus*) y la mora (*Rubus ulmifolius*). El género se encuentra en todos los continentes exceptuando la Antártica (Skirvin *et al.*, 2005; Finn, 2008).

En Chile la especie crece entre las Regiones del Maule y de Magallanes, encontrándose también en el archipiélago de Juan Fernández. Se desarrolla en claros de bosques o terrenos con directa incidencia de luz solar, desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal de la vegetación (Hoffmann *et al.*, 1998; Riedemann y Aldunate, 2003).

La demanda mundial en el consumo de las llamadas bayas o “berries” está creciendo debido a que los frutos de estas especies poseen propiedades funcionales derivadas de la actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante que previenen ciertas enfermedades degenerativas. Ello es producto de que estos frutos poseen, en general, altos contenidos de ácido ascórbico (vitamina C) y de compuestos fenólicos como flavonoides (antocianinas) y polifenoles (taninos), entre otros (Deighton *et al.*, 2000). Actualmente, el mejoramiento genético de algunas especies cultivadas de *Rubus* como la frambuesa, está orientado no solo a obtener frutos de calidad en cuanto a sabor, tamaño, firmeza, color y forma, sino también a mejorar sus características funcionales (Bañados, 2002). Además, se buscan variedades con resistencia a estreses bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (frío, salinidad, viento, entre otros). Lo anterior necesariamente conduce a la ampliación de la base genética actualmente usada para el desarrollo de nuevas variedades. Deighton *et al.* (2000) sugieren que esto deba hacerse incluyendo germoplasma de especies silvestres de *Rubus* en los programas de mejoramiento.

Las razones anteriores hacen pensar que la domesticación de *Rubus geoides* permitiría, por una parte, diversificar la producción frutícola de esta zona, que es muy restringida debido a las inclemencias climáticas, ya que permitiría contar con un cultivo que no requeriría protección contra ellas, como sí lo requieren la mayoría de las especies frutícolas cultivadas en la región a través del uso de cortinas cortavientos y/o invernaderos. Adicionalmente, se

contaría con una especie que podría ser utilizada para ampliar la base genética de la frambuesa cultivada, aportando características de interés en cuanto a calidad del fruto y resistencia a estreses abióticos y bióticos.

Para poder domesticar cualquier especie, es esencial conocer su biología reproductiva. Ello es indispensable para establecer programas de mejoramiento genético que permitan la adaptación de la especie a las nuevas condiciones de cultivo. El estudio de la biología reproductiva incluye el estudio del tipo de polinización (autógama o alógama), los agentes polinizantes, las características del crecimiento y maduración del fruto, y los requerimientos para la germinación de la semilla (Díaz, 2011)

Muchas especies presentan semillas que permanecen en estado latente y no germinan, aun cuando las condiciones de agua, oxígeno, luz y temperatura requeridos para la germinación, están disponibles, fenómeno que se conoce como dormancia. La dormancia presente en las semillas impide una rápida germinación y un buen crecimiento (Bewley, 1997; Werker, 1997). En la mayoría de los casos, las semillas del género *Rubus* presentan una doble dormancia, lo que se traduce en una muy baja o nula germinación. Los factores que la afectan están dados por la existencia de dos mecanismos: la dormancia del embrión, donde los agentes inhibidores de la germinación son intrínsecos del mismo y puede presentarse como un embrión latente, y la dormancia impuesta por la estructura que rodea al embrión (Bewley, 1997), que, en el caso de *Rubus*, es el endocarpo que envuelve a la semilla y afecta la permeabilidad al agua y al oxígeno (Zasada y Tappeiner, 2003). Moise *et al.* (2005) mencionan que las estructuras que envuelven al embrión pueden ejercer una influencia determinante en el ciclo de vida de las plantas, puesto que controlan la germinación de la semilla a través de la existencia de dormancia, el desarrollo del embrión y el establecimiento de nuevas plantas.

Algunos autores clasifican la dormancia en externa e interna. La externa está generalmente determinada por una restricción física relacionada a la presencia de endocarpo, que puede reducir la absorción del agua y el oxígeno requeridos para la germinación, además de prevenir mecánicamente la elongación de la radícula y el crecimiento del embrión. El quiebre de esta dormancia puede lograrse si la testa de la semilla o el endocarpo se debilita o remueve, proceso que se conoce como escarificación. Por otro lado, la dormancia interna, causada por inhibidores químicos de germinación, está regulada por procesos bioquímicos que ocurren durante la posmaduración del fruto a bajas temperaturas (entre 0° y 5°C) y que puede ser eliminada con estratificación a través de la remoción de los inhibidores, cuando las semillas son almacenadas a temperaturas entre 2° a 5°C, en condiciones de humedad (Taylor, 2005).

Se tiene poco conocimiento acerca de los requerimientos de escarificación para la mayoría de las especies del género *Rubus*, debido a la gran diferencia que hay entre las características del endocarpo de las distintas especies. Para algunas, con semillas pequeñas como la frambuesa, se ha determinado que 30 minutos de escarificación con ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado (98%) aumentan significativamente la germinación, dado que es un tiempo suficiente para degradar la cubierta antes que la germinación pueda ocurrir. En cambio para otras semillas más grandes se requiere mayor tiempo de exposición al ácido sulfúrico,

llegando incluso a 3 h como es el caso de las moras (Hummer y Peacock, 1994; Wada y Reed, 2011). Según Peacock (1995), la dormancia interna ligada al embrión también debe ser eliminada mediante estratificación, exponiendo semillas embebidas al frío (entre 3 a 10°C) y/o a una temperatura cálida por un tiempo determinado previo a la germinación.

El procedimiento de escarificación generalmente se basa en el uso de ácido sulfúrico concentrado (98%), neutralizado con hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) e hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) por tiempos variables según sea la especie. Esta escarificación ácida seguida por estratificación fría y cálida, con diferentes condiciones de luz, es considerado el mejor procedimiento para quebrar la dormancia en semillas que poseen un endocarpo duro (Heit, 1967; Baskin *et al.*, 2002). Después que la escarificación está completa, la realización de tratamientos adicionales también puede afectar la velocidad de germinación.

Existen promotores de germinación como el ácido giberélico (GA_3) y el nitrato de potasio (KNO_3), que pueden actuar sobre varios aspectos del crecimiento de las plantas. El GA_3 es una giberelina que, como fitohormona, además de controlar la elongación del tallo, promueve la germinación de las semillas actuando sobre la movilización de las reservas del endosperma y la pérdida de dormancia al debilitar las capas que rodean al embrión. Incluso puede actuar sobre la dormancia de semillas de plantas silvestres que requieren luz o frío para germinar (Taiz y Zeiger, 2010). El nitrato de potasio es comúnmente usado para eliminar la dormancia y favorecer la germinación de la semilla. Está asociado a su habilidad para aumentar la sensibilidad a la luz y controlar los requerimientos de luz de las semillas de muchas especies, funcionando como cofactor en la acción del fitocromo. También se relaciona con el metabolismo hormonal y la transducción de señales referentes a la germinación (Moreno, 2012).

En muchos casos la acción conjunta de GA_3 y KNO_3 aumenta el porcentaje y el tiempo de germinación de semillas. En algunas especies de *Rubus* adicionalmente se han usado estos compuestos como el ácido giberélico y el nitrato de potasio para favorecer la germinación, pero en la mayoría de los casos la germinación solo ocurre con la imbibición con agua (Wada, 2009; Wada y Reed, 2011).

Al estudiar las características anatómicas y morfológicas de las semillas, su composición química y la posible existencia de dormancia interna, se pueden identificar los factores que afectan la germinación de la semilla, y con ello, se hace posible el establecimiento de protocolos de germinación para las distintas especies (Wada *et al.*, 2011). En términos generales, es posible acelerar la germinación escarificando las semillas, ya sea en forma química o mecánica, y luego realizando una estratificación fría.

Dada la variabilidad existente en las características morfológicas y fisiológicas que influyen en la doble dormancia de las semillas de las distintas especies del género *Rubus*, no hay un solo protocolo de germinación que pueda aplicarse a todas ellas. Los resultados de germinación suelen variar no solo entre especies, sino que también dentro de una misma especie (Daubney, 1996; Zasada y Tappeiner, 2003).

Para *Rubus geoides* no se conoce la morfología ni la anatomía de la semilla, por lo tanto no es posible formular una hipótesis sobre el origen de su dormancia y menos disponer de un protocolo para su germinación. A través de los estudios de las características de la semilla y con pruebas de hipótesis, se busca proporcionar un protocolo que permita alcanzar altos porcentajes de germinación.

Hipótesis

El conocimiento de la morfología y anatomía de la semilla de *Rubus geoides* Sm. permite conocer los factores que afectan su dormancia y, con ello, proponer un protocolo para optimizar su germinación.

Objetivo General

Realizar una descripción de la morfología y anatomía de la semilla de *Rubus geoides* y elaborar un protocolo para su germinación.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológica y anatómicamente la semilla de *Rubus geoides*.
2. Determinar la influencia de la escarificación y estratificación en la doble dormancia de la semilla.
3. Establecer los tratamientos que permitan optimizar la germinación de las semillas para crear un protocolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En el presente estudio se utilizaron semillas de *Rubus geoides* provenientes de la Región de Magallanes las que estaban disponibles en el Banco de Germoplasma del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Los estudios y análisis se realizaron tanto en el Laboratorio de Semillas como en el de Anatomía Vegetal, ambos del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile en la Región Metropolitana. Además, parte del análisis morfológico y anatómico de la semilla se realizó en el Laboratorio de Microanálisis del Departamento de Criminalística de la Policía de Investigaciones de Chile (PDI), con quien la Facultad de Ciencias Agronómicas tiene un convenio de colaboración mutuo.

Metodología

Se hicieron diversas observaciones para caracterizar la semilla en cuanto a su morfología y anatomía, así como diversos ensayos para determinar el mejor método para la germinación de la semilla, según se describe a continuación.

Análisis morfológico y anatómico de la semilla

Se obtuvieron imágenes de la semilla a través del uso de un microscopio electrónico de barrido (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM), con estación de trabajo de doble haz (ESEM-FIB-EDX) marca FEI Company, modelo Quanta 3D 200, el que se encuentra en la Sección de Microanálisis, Laboratorio de Criminalística Central de la Policía de Investigaciones de Chile.

Las muestras de 60 semillas se montaron en soportes de aluminio, sobre una cinta adhesiva de doble cara de carbono, y fueron ubicadas en distintas posiciones para facilitar su observación. Se obtuvieron imágenes de una visión general de la semilla para determinar sus dimensiones (largo × ancho × alto) en mm, una visión de la superficie del endocarpo, una visión del micrópilo, del rafe y de la parte posterior de la semilla, además de una visión de cortes transversales y longitudinales con sus respectivos detalles. También se realizaron observaciones microscópicas mediante luz reflejada con un microscopio estéreo Olympus modelo SZ51 para observar las semillas y complementar la descripción de la semilla. La

captura de imágenes del microscopio de luz se hizo con la cámara Arquimed, modelo MEM 1300 y un software WINJOE.

Para complementar la descripción anatómica se realizó un análisis químico elemental de una muestra de la semilla, en base a la identificación del número atómico (Z) de los elementos químicos detectados en la muestra. Esto fue realizado mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, con un detector marca EDAX, modelo Apollo XL y un software Genesis, versión 6.37. Este análisis permitió identificar elementalmente la presencia del endosperma al interior de la semilla.

Viabilidad de semilla

Se realizó una prueba de viabilidad con el Test de Tetrazolio (TZ) para determinar el porcentaje de semillas viables. Se tomaron 100 semillas como muestra, las que fueron embebidas en agua destilada por 1 h y luego cortadas longitudinalmente, obteniéndose mitades que se trataron con una solución de 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolio (1%) a temperatura ambiente durante 24 h. El embrión de la semilla fue observado bajo microscopio. Se evaluó la viabilidad de las semillas en función del color del embrión. Si las semillas presentaban un embrión de color rojo en forma parcial o total se consideraron viables, si la coloración roja no se observaba en el embrión entonces la semilla fue considerada no viable.

Definición de los requerimientos de germinación

Para poder definir los requerimientos de germinación de la semilla fue necesario realizar estudios complementarios para eliminar cada una de las dormancias presente en la semilla por separado.

En base a la Figura 1, se establecieron dos estudios consecutivos para romper la dormancia externa e interna de la semilla. En un primer estudio se realizaron tres ensayos de escarificación destinados a romper la dormancia externa o exodormancia impuesta por el endocarpo. Estos ensayos fueron determinantes para realizar los ensayos de germinación del segundo estudio, los que se realizaron para romper la dormancia interna o endodormancia impuesta por el embrión.

Por lo tanto, para comprender la metodología utilizada, según el esquema de la Figura 1, los estudios se separaron en: Estudio 1. Eliminación de exodormancia y Estudio 2. Eliminación de endodormancia.

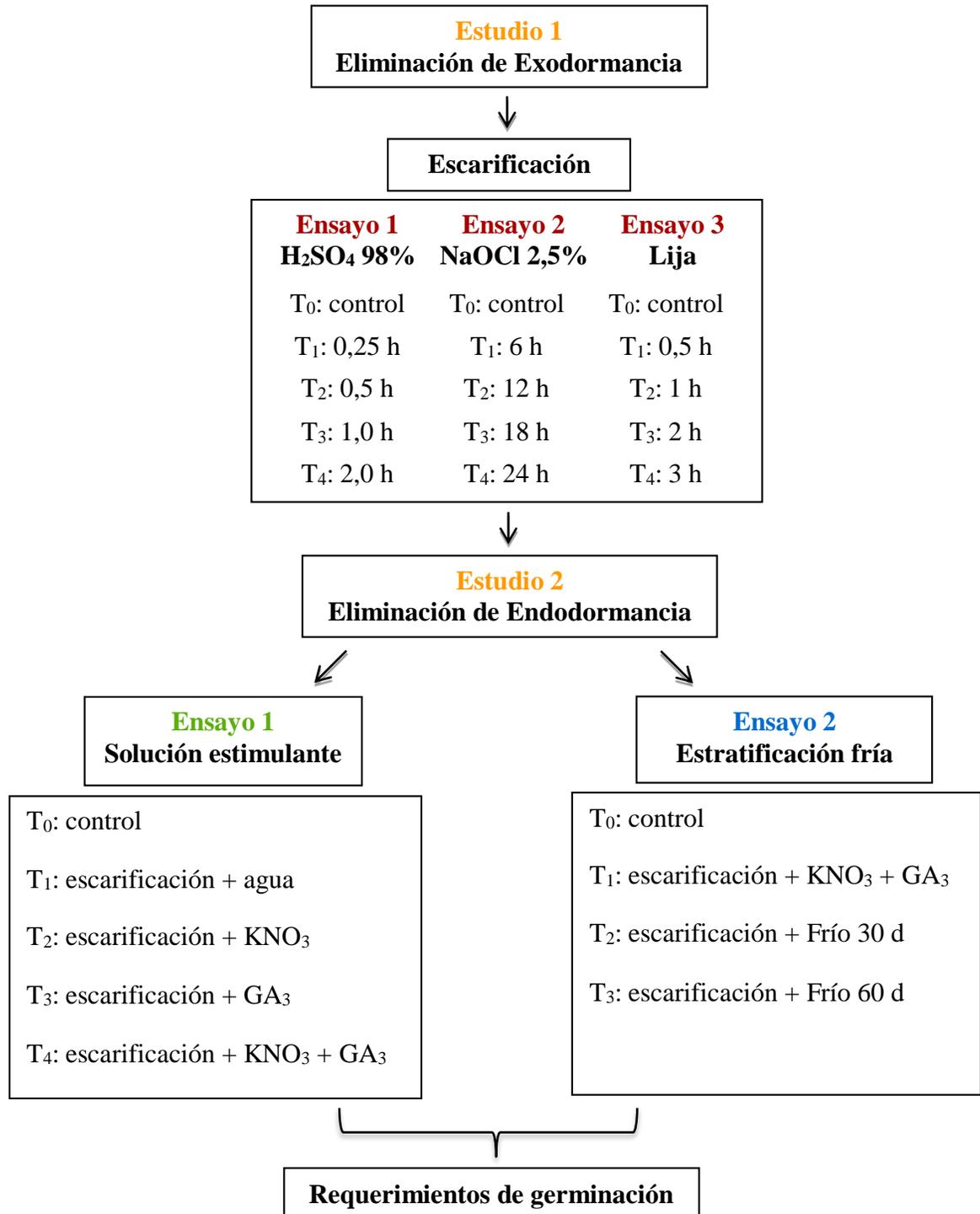


Figura 1. Estudios consecutivos para la definición de los requerimientos de germinación de la semilla de *Rubus geoides*.

Luego del primer estudio, se tomaron los valores de germinación significativamente más altos, como indicadores del método de escarificación más eficiente para eliminar la exodormancia, utilizándolo como base de escarificación de las semillas destinadas a realizar las pruebas de germinación del segundo estudio de endodormancia. Este último incluyó la aplicación de soluciones estimulantes de germinación y de estratificación.

Estudio 1. Eliminación de exodormancia

Se evaluaron distintos tiempos de exposición a diferentes medios de escarificación en ensayos que comprendieron el uso de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98%, hipoclorito de sodio (NaOCl) 2,5% y escarificación mecánica con lija. De esta forma se hicieron tres ensayos de escarificación independientes:

Ensayo 1. Escarificación con ácido sulfúrico. Las semillas se remojaron con H_2SO_4 concentrado (98%) por tiempos variables según el tratamiento (Cuadro 1). Luego se lavaron con agua destilada por 1 h. Además se removieron las partes carbonizadas de la semilla al frotarlas contra un colador con el cuidado de no dañar la semilla y su embrión.

Ensayo 2. Escarificación con hipoclorito de sodio. Las semillas se remojaron con una solución de NaOCl (2,5%) por tiempos variables según el tratamiento (Cuadro 1). Luego se lavaron con agua destilada por 1 h.

Ensayo 3. Escarificación mecánica con lija. La escarificación mecánica se hizo colocando las semillas en placas Petri forradas con papel lija, las que fueron montadas sobre un agitador a 400 rpm por tiempos variables según el tratamiento (Cuadro 1). Luego se lavaron con agua destilada por 1 h para eliminar los restos de semilla que pudieron quedar al pasar por el papel lija.

Dentro de cada ensayo se contempló un tratamiento control con semillas que no fueron escarificadas. Los ensayos se establecieron en un diseño completamente aleatorizado con 5 tratamientos cada uno, los que variaron según el tiempo de exposición al medio de escarificación (Cuadro 1). Cada tratamiento contó con 4 repeticiones de 50 semillas en una placa Petri. Las unidades experimentales fueron cada placa con 50 semillas cada una.

Cuadro 1. Tratamientos de los tres ensayos de escarificación de semillas de *Rubus geoides*, correspondientes al estudio de exodormancia.

Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
	H ₂ SO ₄ 98%	NaOCl 2,5%	Mecánica con lija
	----- horas -----		
T ₀	control	control	control
T ₁	0,25	6,0	0,5
T ₂	0,5	12,0	1,0
T ₃	1,0	18,0	2,0
T ₄	2,0	24,0	3,0

Una vez que las semillas fueron tratadas, incluidas las semillas del tratamiento control, se distribuyeron homogéneamente sobre papel absorbente en placas Petri con 50 semillas cada una. Todas las placas contaron con la aplicación de 5 mL de una solución de nitrato de potasio (KNO₃) 0,034% y ácido giberélico (GA₃) 0,002%, para favorecer la germinación de las semillas, además de 1 mL de solución fungicida (Captan 1 g/L) para evitar la contaminación por hongos. Luego las placas se ubicaron en una cámara de germinación a 21-23°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, durante 13 semanas (90 días).

Se realizaron mediciones de porcentaje de germinación, y el mayor porcentaje del estudio se identificó como el mejor tratamiento y medio de escarificación para romper la barrera de la exodormancia. Este tratamiento se empleó como base de escarificación de las semillas usadas en los ensayos siguientes de eliminación de la endodormancia.

Estudio 2. Eliminación de endodormancia

Las semillas utilizadas para este estudio fueron escarificadas con el tratamiento más eficiente en romper la exodormancia entre los tres ensayos del primer estudio, dando paso al desarrollo de dos ensayos destinados a romper la endodormancia. Estos ensayos implicaron la aplicación de soluciones estimulantes de germinación y de estratificación.

Ensayo 1. Soluciones estimulantes. En este ensayo se evaluaron cuatro soluciones estimulantes de germinación por separado: agua destilada, KNO₃ (0,034%), GA₃ (0,002%), y una mezcla de KNO₃ (0,034%) + GA₃ (0,002%), donde cada una de las soluciones correspondió a un tratamiento, los que fueron comparados con un tratamiento control (Cuadro 2).

Este ensayo se estableció en un diseño completamente aleatorizado con 5 tratamientos que variaron según la solución estimulante utilizada como muestra el Cuadro 2, donde cada

tratamiento contó con 4 repeticiones de 50 semillas en una placa Petri. Las unidades experimentales fueron cada placa con 50 semillas cada una.

Cuadro 2. Tratamientos del ensayo de soluciones estimulantes de germinación de semillas de *Rubus geoides*, correspondientes al estudio de endodormancia.

Tratamiento	Escarificación	Solución estimulante	
		Solución	Concentración (mg/L)
T ₀	No	Agua destilada	-
T ₁	Si	Agua destilada	-
T ₂	Si	KNO ₃	34,0
T ₃	Si	GA ₃	2,0
T ₄	Si	KNO ₃ + GA ₃	34,0 + 2,0

Para evaluar el efecto de estas soluciones, un grupo de semillas fueron escarificadas y luego se distribuyeron homogéneamente sobre papel absorbente en placas Petri con 50 semillas cada una. Cada placa se humedeció con 5 mL de solo una de las soluciones estimulantes, según el tratamiento. Las semillas sin escarificar fueron colocadas en placas Petri con 50 semillas cada una, humedecidas solo con agua destilada formando parte del tratamiento control. A todas las placas se les añadió 1 mL de una solución de Captan (1 g/L) para evitar la contaminación por hongos. Luego las placas se ubicaron en la cámara de germinación descrita anteriormente durante 13 semanas (90 días).

Ensayo 2. Estratificación. Se hizo un segundo ensayo a fin de evaluar la estratificación de las semillas a 5°C en oscuridad durante 30 y 60 días.

Las semillas empleadas para este ensayo también fueron escarificadas con el mejor tratamiento para romper la exodormancia. Un grupo de semillas se separó del resto para ser estratificadas durante 30 y 60 días a 5°C en oscuridad. Ambos tiempos de estratificación corresponden a dos tratamientos, los que fueron comparados con un tercer tratamiento utilizando semillas sin estratificar. Este último tratamiento sólo consistió en una mezcla de KNO₃ (0,034%) + GA₃ (0,002%) a temperatura ambiente, de manera de conocer la efectividad del frío en comparación con la solución estimulante para favorecer la germinación de las semillas. Todos ellos se compararon con un tratamiento control el que presentó semillas sin escarificar que solo se humedecieron con agua, tal como se indica en el Cuadro 3.

Este ensayo se estableció en un diseño completamente aleatorizado con 4 tratamientos que variaron según la solución estimulante utilizada y el tiempo de estratificación, donde cada tratamiento contó con 4 repeticiones de 50 semillas en cada placa. Las unidades experimentales fueron cada placa con 50 semillas cada una (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos del ensayo de estratificación a 5°C de semillas de *Rubus geoides*, correspondiente al estudio de endodormancia.

Tratamiento	Escarificación	Estratificación
T ₀	No	No, Control
T ₁	Sí	No, sólo KNO ₃ + GA ₃
T ₂	Sí	Sí, frío 30 días
T ₃	Sí	Sí, frío 60 días

Para este ensayo se escarificaron las semillas con el mejor tratamiento de escarificación del estudio de exodormancia. Luego una parte de las semillas escarificadas fueron puestas a germinar en placas Petri con 50 semillas cada una, con 5 mL de una mezcla de KNO₃ (0,034%) + GA₃ (0,002%) en la cámara de germinación durante 4 semanas. El resto de las semillas fueron mantenidas a 5°C donde a medida que se cumplía el tiempo de estratificación (30 y 60 días) se separaron sobre papel absorbente en placas Petri con 50 semillas cada una humedecidas solo con agua destilada y llevadas luego a la cámara de germinación durante 8 semanas para las semillas estratificadas por 30 días, y durante 4 semanas para las semillas estratificadas durante 60 días. Al total de placas se les añadió 1 mL de solución de Captan (1 g/L) para evitar la contaminación fúngica.

Evaluaciones

Análisis morfológico y anatómico de la semilla

Se realizó una descripción de las características morfológicas y anatómicas de la semilla de *Rubus geoides* con las imágenes SEM. El tamaño total, la masa y las dimensiones, las características de la superficie y el grosor del endocarpo, el color y la forma de las semillas fueron evaluados, además de sus características internas observadas con cortes longitudinales y transversales con el análisis químico elemental.

Conjuntamente se realizó una descripción de las semillas que fueron sometidas a los distintos medios de escarificación, con el propósito de comparar visualmente los posibles efectos producidos en el endocarpo durante el proceso.

Germinación de la semilla

Se evaluó el porcentaje de germinación durante 13 semanas para todos los ensayos de ambos estudios de exo y endodormancia.

Las semillas se consideraron como germinadas cuando la radícula se hizo visible fuera de la semilla, o en su defecto cuando los cotiledones emergieron. Entonces el porcentaje se estableció como la proporción del número de semillas germinadas, en relación al número total de semillas utilizadas en cada unidad experimental, bajo las condiciones de germinación entregadas para los ensayos.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de acuerdo al diseño descrito, y al encontrarse diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación múltiple de Duncan con un nivel de confianza del 95% para separar las medias de los tratamientos. Para la realización del ANDEVA se evaluaron los supuestos de homogeneidad y normalidad de los datos y los datos porcentuales fueron transformados a grados Bliss (arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Morfológico

La semilla de *Rubus geoides* presenta un color pardo pálido y una forma semiglobosa, siendo aguzada en la región apical donde se ubica la radícula, y ovalada hacia el extremo opuesto. El micrópilo se ubica en la región apical, al extremo del rafe presentándose muy marcado en algunas semillas mientras que en otras es difícil de observar. El rafe exhibe una forma recta a convexa (Figura 2).

Las dimensiones de la semilla se pueden observar en la Figura 3. En la Figura 4-a se presenta la diferencia observada en el tamaño de las semillas, las que variaron de $2,17 \times 1,64 \times 1,07$ mm (largo \times ancho \times alto) a $3,23 \times 2,12 \times 1,82$ mm, con un promedio de $2,56 \times 1,87 \times 1,33$ mm. Esto concuerda con lo mencionado por Hummer y Peacock (1994) y por Wada (2009), donde señalan que el largo de las semillas de algunas especies de *Rubus* puede ir desde 1,2 mm hasta 6,1 mm. Las dimensiones del micrópilo cuando éste es marcado se aprecian próximas a los 125,47 μ m de diámetro (Figura 5).

La Figura 6 muestra en detalle la superficie de la semilla. Se observa un patrón de rugosidad dada por pequeñas depresiones y elevaciones redondeadas e irregulares que se encuentran extendidas por toda la cubierta. Estas elevaciones o crestas presentan bordes muy notorios y pronunciados en su parte más alta, haciéndose más suaves en las crestas ubicadas hacia las regiones laterales de la semilla. Cuando se observa con mayor detalle y aumento ($\times 175$) se distingue un patrón reticulado y ocelado en la superficie, es decir, que las depresiones presentan contornos curvos con una apariencia geométrica parecida a un círculo, como una cavidad en forma de ojo. Por otro lado, se ve que el rafe de la semilla es muy marcado, notándose en cada una de las muestras observadas. Wada y Reed (2008) realizaron un estudio morfológico para diez subgéneros del género *Rubus*. Según la descripción, *Rubus geoides* se asemeja morfológicamente a la semilla de frambuesa cultivada (Figura 7) y de mora, de los subgéneros *Ideaobatus* y *Rubus* respectivamente, que tienen una escultura reticulada conspicua, notándose una superficie rugosa de la semilla, además de un rafe muy amplio y definido. Los mismos autores indican que la forma del rafe puede favorecer en la identificación de especies dentro del género *Rubus*, al igual que la forma de la semilla y las características de su superficie.

Se realizó otra observación morfológica orientada a reconocer cambios en la superficie de las semillas que fueron escarificadas con ácido sulfúrico, hipoclorito de sodio y papel lija (Figura 8). El uso de hipoclorito de sodio y de papel lija realzaron aún más el relieve rugoso y reticulado de la superficie, viéndose más notorios las crestas y depresiones en las semillas tratadas con hipoclorito de sodio que las escarificadas con papel lija. En cambio con la escarificación ácida la superficie quedó carbonizada y agrietada en la mayoría de los casos, disminuyendo claramente la superficie, dejándola más suave, sin rugosidades ni crestas

pronunciadas. Según Wada (2009) la superficie puede verse reducida entre un 12% y 39% luego de una escarificación ácida, en cambio con la escarificación con hipoclorito de sodio es posible que la testa se vea reducida entre un 20% y un 34%.

Análisis Anatómico

Tomlik-Wyremblewska *et al.* (2010) indican que cada uno de los drupéolos de los frutos de *Rubus* contienen en su interior un pireno, el que consiste, listado desde fuera hacia dentro, en el endocarpo, la testa de la semilla, el endosperma y el embrión.

Endocarpo

La semilla de *Rubus geoides* está envuelta por el endocarpo lignificado del fruto (figuras 4-b y 4-c). Peacock (1995) indica que la mayoría de las semillas del género *Rubus* está envuelta por un endocarpo duro y rugoso. Esto también ocurre en la semilla de *Rubus geoides*, tal como se evidencia al observar los cortes longitudinales y transversales de los pirenos (Figuras 9 y 10).

El grosor del endocarpo varió entre 102,42 a 185,56 μm de ancho con un promedio cercano a los 138,65 μm (figuras 4-b y 4-c). El endocarpo presenta tres zonas delimitadas. La zona externa que presenta las reticulaciones y rugosidades de la superficie anteriormente descritas, es delgada y presenta dos a tres capas de células, donde se ven traqueidas y haces vasculares. Una zona media, más gruesa y predominante, donde se observan fibras longitudinales lignificadas y delgadas, con un ordenamiento regular y muy unidas entre sí, y una zona interna menos gruesa que también presenta fibras transversales lignificadas ordenadas, de forma esférica y menor tamaño (Figura 11). Coincidentemente, la descripción del endocarpo se asemeja a lo descrito por Wada *et al.* (2011) para *R. hoffmeisterianus*, que presenta un endocarpo delgado, con una zona media e interna compuesta por esclereidas homogéneas en forma y tamaño.

Testa

La testa de la semilla, ubicada por debajo del endocarpo, es muy delgada presentando pocas capas de células. Ésta contiene al embrión y al endosperma (Figura 9 y 10)

Endosperma

Al realizar un análisis químico elemental de la semilla, se observa una notoria cantidad de potasio y fósforo sobre los cotiledones, lo que indicaría la presencia de compuestos nutricios indicando la posición del endosperma (Figura 12).

Embrión

Dependiendo del tamaño de la semilla, el embrión puede alcanzar dimensiones entre los 1,64 a 1,99 mm aproximadamente ocupando la mayor parte del volumen total de la semilla, principalmente representado por los cotiledones (Figura 9 y 10).

Figuras de análisis morfológico y anatómico de la semilla de *Rubus geoides*.



Figura 2. Imágenes de semillas de *Rubus geoides* observadas bajo microscopio de luz: (a) tres posiciones de la semilla: parte posterior, de frente, rafe; (b) grupo de semillas para distinguir la variación en forma y tamaño de la semilla, y el rafe.

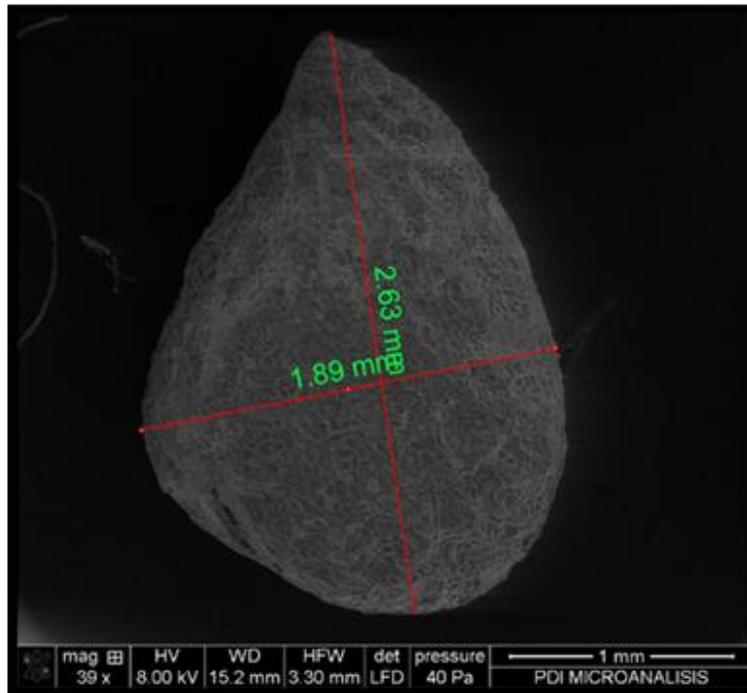


Figura 3. Imagen SEM de la semilla de *Rubus geoides* con sus dimensiones de largo y ancho.



Figura 4. Semillas de *Rubus geoides*: (a) imagen de microscopio de luz de semillas de variados tamaños y formas, (b) imagen de microscopio de luz de la testa de la semilla en corte longitudinal, (c) imagen SEM de la testa de la semilla en corte longitudinal. Imágenes b y c corresponden a la misma muestra.

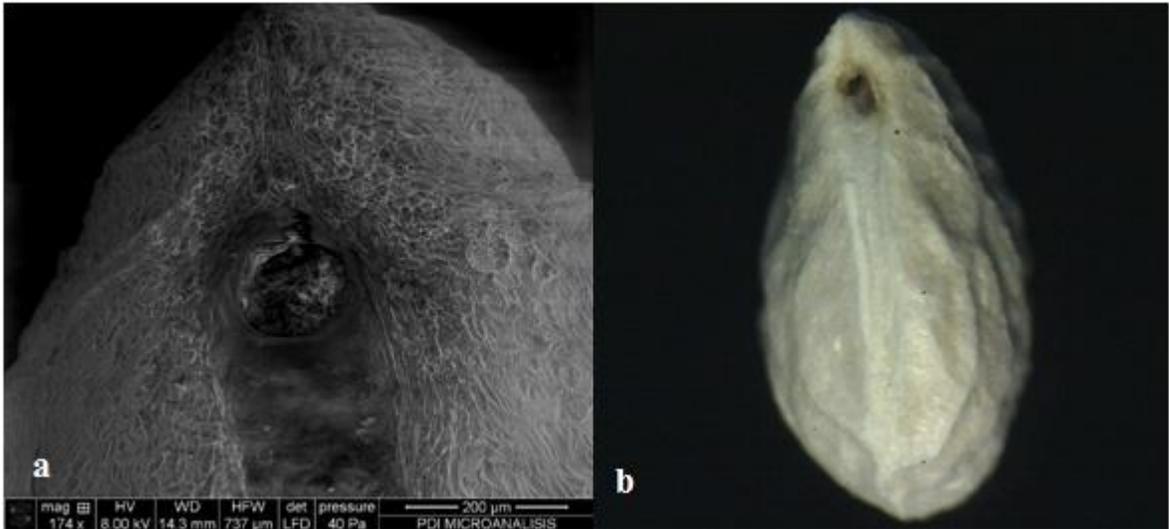


Figura 5. Micrópilo de la semilla de *Rubus geoides*: (a) imagen SEM del micrópilo en detalle, (b) imagen de microscopio de luz de semilla con micrópilo muy visible. Ambas imágenes corresponden a la misma muestra.

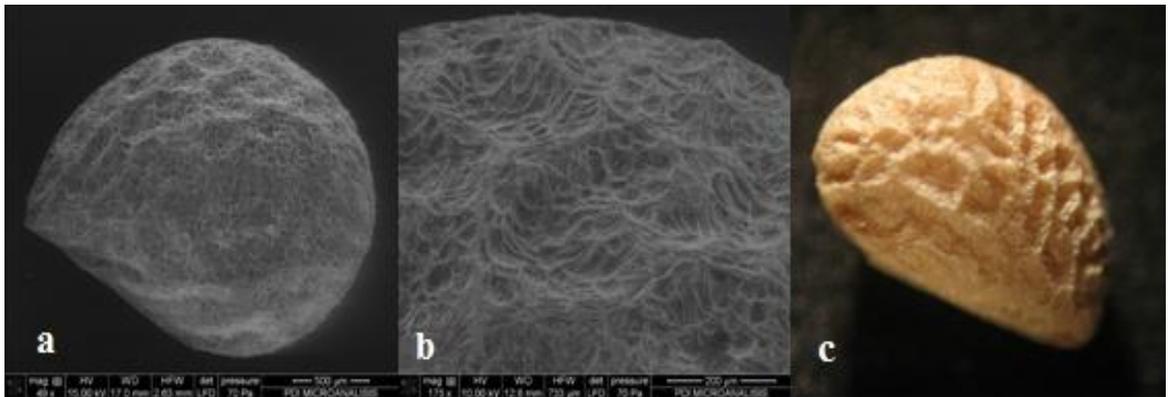


Figura 6. Semillas de *Rubus geoides*: (a) imagen SEM de la semilla, (b) imagen SEM de la superficie del endocarpo de la semilla en detalle, (c) imagen de microscopio de luz de la semilla.

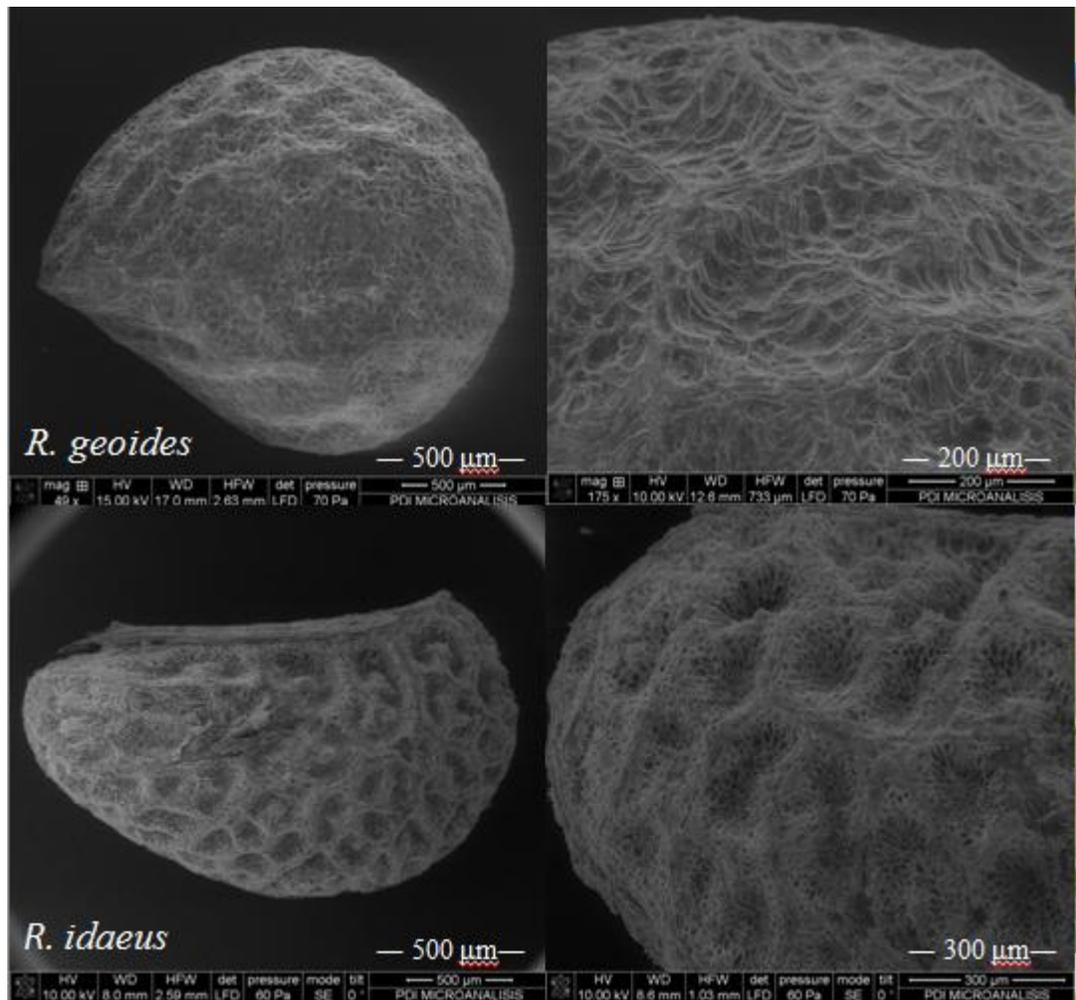


Figura 7. Semillas de *Rubus geoides* y *Rubus idaeus*. Izquierda: imagen SEM de la semilla. Derecha: imagen SEM de la superficie del endocarpo de la semilla en detalle.

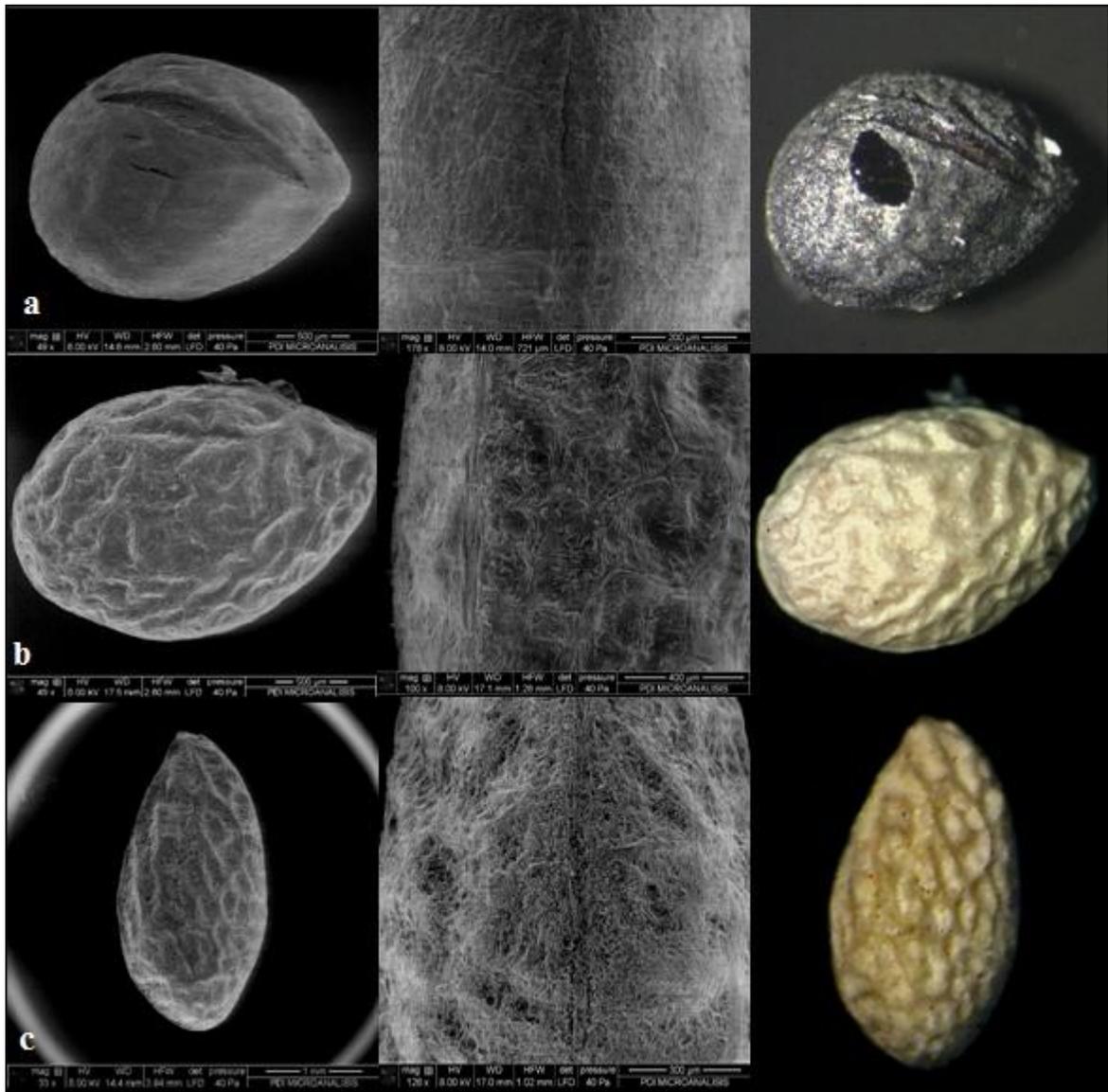


Figura 8. Semillas de *Rubus geoides* tratadas con distintos medios de escarificación: (a) semilla escarificada con ácido sulfúrico H_2SO_4 (98%), (b) semilla escarificada con hipoclorito de sodio $NaOCl$ (2,5%), (c) semilla escarificada con papel lija. Izquierda: imagen SEM de la semilla. Centro: imagen SEM de la superficie del endocarpo en detalle. Derecha: imagen de microscopio de luz de la semilla. Imágenes de cada grupo de semillas corresponden a la misma muestra.

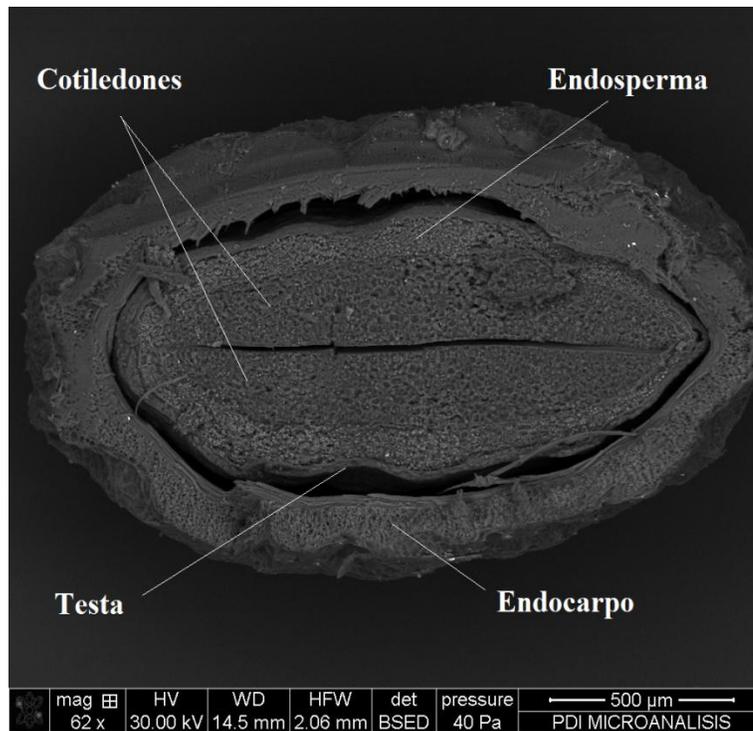


Figura 9. Imagen SEM de la semilla de *Rubus geoides* en corte transversal de la semilla.

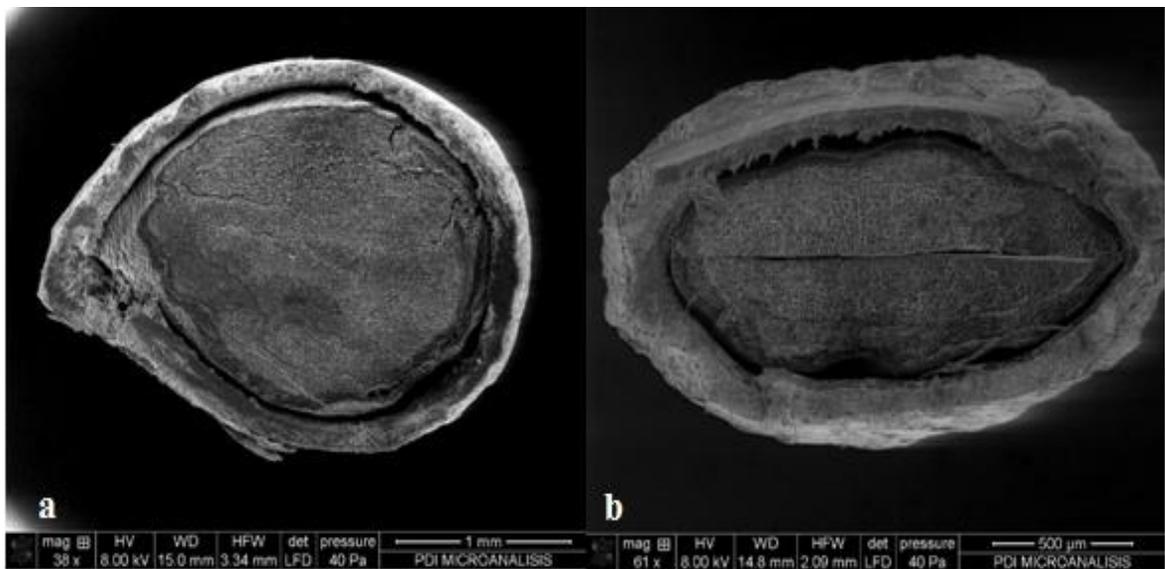


Figura 10. Imágenes SEM de la semilla de *Rubus geoides*: (a) corte longitudinal de la semilla, (b) corte transversal de la semilla. En ambas imágenes puede observarse el embrión y la testa.

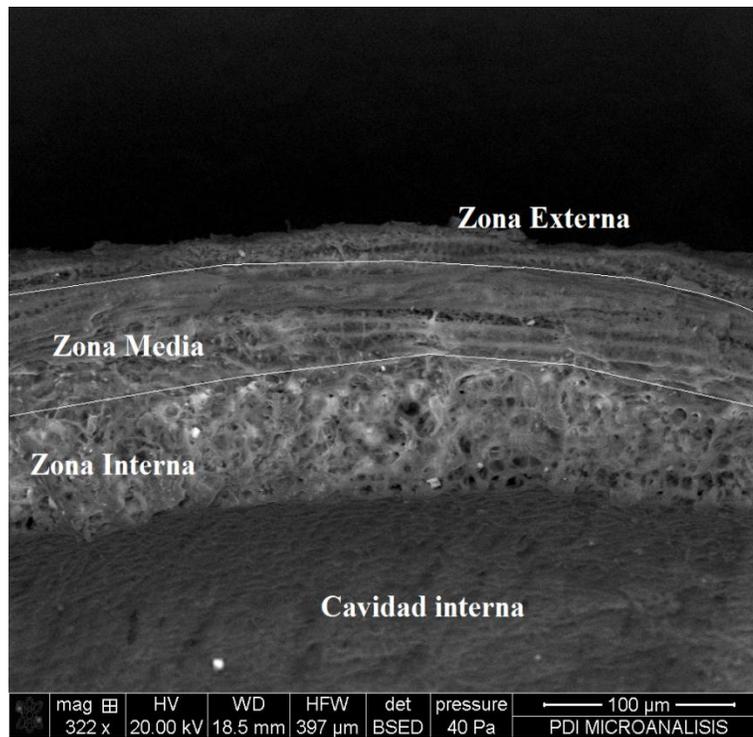


Figura 11. Imagen SEM de la semilla de *Rubus geoides* con las 3 zonas del endocapo demarcadas: externa, media e interna.

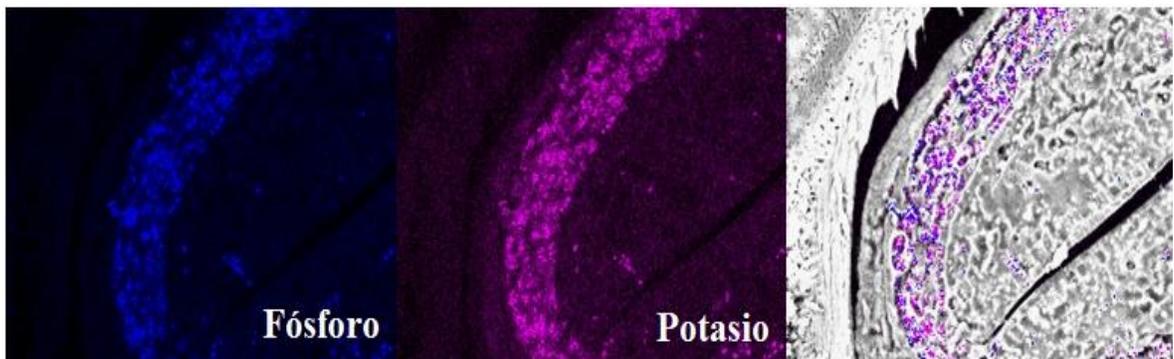


Figura 12. Imágenes de análisis químico elemental de la semilla de *Rubus geoides* en corte transversal. Se observan los cotiledones, endosperma, testa y parte del endocarpo. Fósforo y potasio concentrados en la endosperma

Germinación de la semilla

El resultado de la prueba de viabilidad de semillas que arrojó el test de tetrazolio fue de 91%. Esto permitió disponer de un gran número de semillas viables para llevar a cabo los estudios de germinación.

Estudio 1. Eliminación de exodormancia

Durante los 90 días en que se evaluó la germinación de semillas escarificadas, el único ensayo que mostró resultados fue el que utilizó ácido sulfúrico (H_2SO_4 al 98%). Los ensayos que contemplaron hipoclorito de sodio (NaOCl al 2,5%) y escarificación mecánica con lija, obtuvieron una germinación de 0% (Cuadro 4), al igual que los tratamientos T_0 y T_1 del ensayo de escarificación ácida. Por esta razón, el análisis estadístico de los tres ensayos se hizo sólo en base a los resultados de la escarificación con ácido sulfúrico, dejando los resultados de hipoclorito de sodio y lija estadísticamente iguales a los tratamientos sin germinación (T_0 y T_1) (Cuadro 5).

Cuadro 4. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* para distintos tratamientos de escarificación con hipoclorito de sodio (NaOCl) 2,5% y con lija, luego de 13 semanas.

Tratamiento	Tiempo de escarificación (horas)		Porcentaje de germinación para ambos ensayos (%)
	NaOCl al 2,5%	Lija	
T_0	control	control	0,0 a ¹
T_1	6,0	0,5	0,0 a
T_2	12,0	1,0	0,0 a
T_3	18,0,	2,0	0,0 a
T_4	24,0	3,0	0,0 a

¹Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), según comparación múltiple de medias de Duncan.

El ensayo que consideró el uso de ácido sulfúrico concentrado para el estudio de exodormancia, mostró los más altos porcentajes de germinación alcanzando como máximo un 20% de semillas germinadas en una de las repeticiones durante los 90 días, pero en promedio el porcentaje obtenido fue de 12,16%, distinguiéndose una diferencia significativa entre los tratamientos, como se advierte en el Cuadro 5. Basándose en estos resultados, se puede concluir que la semilla de la frutilla magallánica presenta una clara dormancia externa, la que es explicada por la barrera física que impone el endocarpo, tal como Bewley (1997)

sugiere que ocurre con la mayoría de las semillas del género *Rubus*. Al escarificar las semillas, esta exodormancia se elimina, dando lugar a una germinación menos limitada.

Cuadro 5. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* para distintos tratamientos de escarificación con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 98% luego de 13 semanas.

Tratamiento	Tiempo de escarificación (horas)	Porcentaje de germinación (%)
T ₀	control	0,00 b ¹
T ₁	0,25	0,00 b
T ₂	0,50	3,10 b
T ₃	1,00	12,16 a
T ₄	2,00	1,13 b

¹Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), según comparación múltiple de medias de Duncan.

Al observar la Figura 12 y comparar entre los tratamientos se observó que a partir de la cuarta semana, las semillas de los tratamientos T₂, T₃ y T₄ comenzaron su germinación, siendo T₃ el tratamiento con mayor porcentaje de germinación (4,08%), siguiéndolo T₂ y T₄ con un 0,5% en ambos. Este comportamiento entre tratamientos se mantuvo durante todo el periodo de evaluación. Cabe señalar que aunque T₂ y T₄ sí presentaron germinación, no son estadísticamente distintos del T₀ y T₁.

Posteriormente las semillas continuaron germinando en los tres tratamientos, no obstante T₂ y T₄ tuvieron un leve aumento en su germinación, las que no presentaron variación a partir de la octava semana en adelante. En cambio T₃ sí presentó un aumento considerable en la germinación a partir de la cuarta semana, donde las últimas semillas germinadas alcanzaron un total de 12,16% de germinación en la semana 11, manteniéndose hasta el final del periodo.

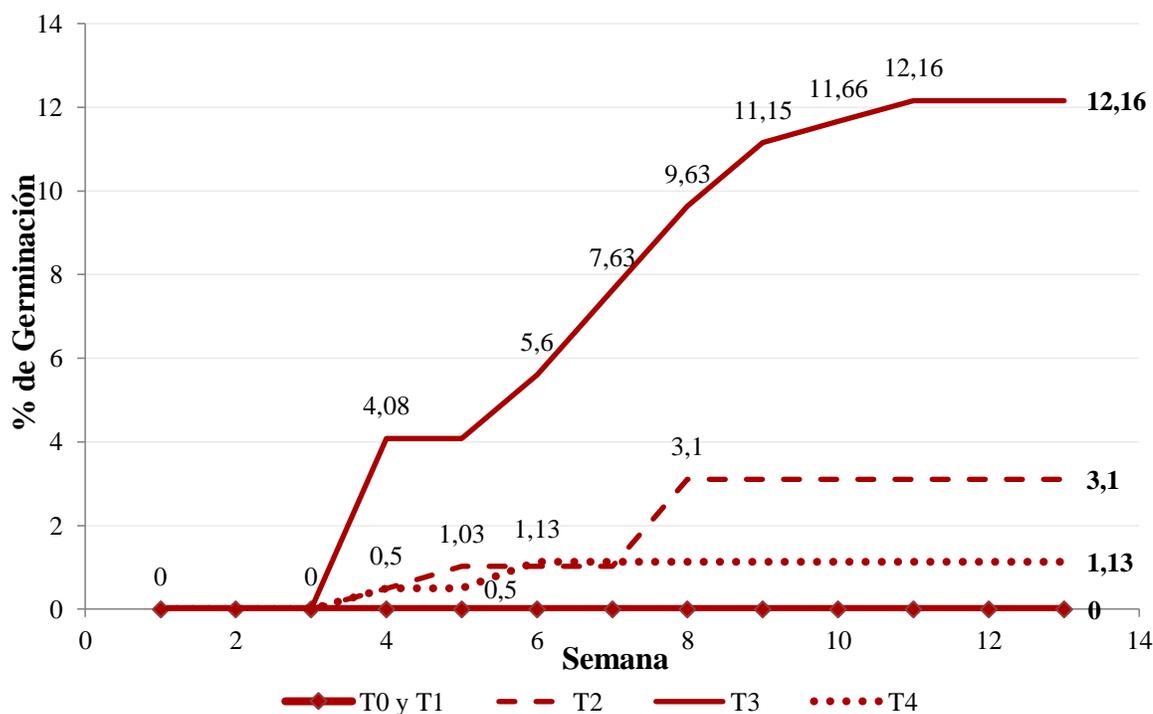


Figura 12. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* del estudio de exodormancia. Todos los tratamientos corresponden al ensayo de escarificación con ácido sulfúrico. Línea con rombos representa a los tratamientos control T₀ y T₁ (0,25 h), línea con guiones representa al tratamiento T₂ (0,5 h), línea continua representa al tratamiento T₃ (1,0 h) y línea punteada representa al tratamiento T₄ (2,0 h).

En el tratamiento T₄ sólo pocas semillas lograron germinar comenzando en un 0,5% en la cuarta semana y llegando a 1,13% en la sexta semana, manteniéndose así hasta los 90 días. Esta baja respuesta pudo deberse a las 2 horas de exposición al ácido sulfúrico que sufrieron las semillas. Si se considera que el embrión pudo verse afectado con un tratamiento tan severo, de dos horas de exposición, es posible que conlleve a una muy baja o nula germinación como lo estipulan Hummer y Peacock (1996) y Diaz (2011).

Los porcentajes nulos de germinación de los tratamientos T₀ y T₁ del ensayo con escarificación ácida, más los ensayos de hipoclorito de sodio y escarificación mecánica, pueden deberse a que los tiempos de exposición al tratamiento fueron inadecuados, a que los productos no tuvieron efecto, o a que los productos tuvieron efectos fitotóxicos. Es posible que las condiciones de la cámara de germinación fueron desfavorables, que los tiempos de exposición no fueron suficientes, la falta de estratificación fría de las semillas y la inviabilidad del embrión también hayan afectado en la nula germinación.

La utilización de NaOCl al 2,5% se ocupa como una alternativa al ácido sulfúrico. Existen estudios que indican que su uso por 24 h –que se estimó como tiempo máximo en el estudio de exodormancia– arroja resultados que varían entre 1% y 90% de germinación. Es posible que, en este caso, el tratamiento por 24 h haya sido muy severo (Hall *et al.*, 2009). Esto es

aplicable en parte a la explicación de los resultados nulos del ensayo de hipoclorito de sodio, aunque también puede inferirse que las 13 semanas en la cámara de germinación no fueron suficientes o que simplemente no germinaron debido a la presencia de una dormancia adicional que requiere estratificación fría (Wada, 2009). Sin embargo, Zasada y Tappeiner (2003) indican que la concentración de hipoclorito de sodio puede ser insuficiente como medio de escarificación y es posible que pueda tener mayor efecto con una concentración más alta.

Los resultados del ensayo 3 de escarificación que consideró el uso de lija, pueden explicarse por una escarificación insuficiente, lo que permite inferir que las 400 rpm o el tiempo usado para la escarificación con el agitador no fueron suficientes (Figura 8), considerándose también la falta de estratificación fría, como una posible explicación. Es posible que esto pueda ser mejorado con la aplicación de cortes en la semilla en vez de eliminada la exodormancia a través de roce (Warr *et al.*, 1979). El bajo peso de las semillas también pudo ser un factor que afecta a que pueda verse desgastada con lija mediante la agitación.

Dado los resultados, el mejor tratamiento fue la escarificación con ácido sulfúrico al 98% de concentración por 1 h, ya que éste fue estadísticamente mejor que el resto de los tratamientos del mismo ensayo. Los resultados entonces indicaron que esta escarificación sería utilizada como base en el estudio de endodormancia para romper la dormancia externa o barrera física impuesta por el endocarpo a la semilla. Aunque el porcentaje de 12,16% de germinación alcanzado por este tratamiento fue el más alto en relación con los otros, aún fue un bajo resultado, por lo que se hizo necesario mejorarlo con la realización del segundo estudio.

Es posible que mayores porcentajes sean alcanzados con este tratamiento dado que no hubo estratificación fría, ya que el objetivo del estudio de exodormancia era sólo determinar el mejor tiempo de exposición a los medios de escarificación propuestos.

Estudio 2. Eliminación de endodormancia

Ensayo 1. Soluciones estimulantes. El primer ensayo relacionado con la solución estimulante de germinación mostró los primeros resultados a partir de la cuarta semana, al igual que en el estudio anterior. Sin embargo, los porcentajes alcanzados no fueron mejorados y no llegaron a ser tan altos como en el primer estudio.

Como se observa en el Cuadro 6, el tratamiento con el mayor porcentaje de germinación alcanzado durante el periodo de estudio fue T₄ (4,5%), el que presentó una diferencia significativa en comparación con el tratamiento control y T₂. Aunque los tratamientos T₁ y T₃ no fueron estadísticamente distintos del T₄, pero sí este último entregó una mayor cantidad de semillas germinadas, es posible establecer que la solución que mejor estimula la germinación entre todos los tratamientos es la mezcla de GA₃ y KNO₃.

Cuadro 6. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* para distintos tratamientos de solución estimulante luego de 13 semanas.

Tratamiento	Tiempo de escarificación con H ₂ SO ₄ al 98% (horas)	Solución estimulante		Porcentaje de germinación (%)
		Solución	Concentración (mg/L)	
T ₀	control	Agua destilada	-	0,0 b ¹
T ₁	1,0	Agua destilada	-	1,0 ab
T ₂	1,0	KNO ₃	34,0	0,0 b
T ₃	1,0	GA ₃	2,0	2,5 ab
T ₄	1,0	KNO ₃ + GA ₃	34,0 + 2,0	4,5 a

¹Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), según comparación múltiple de medias de Duncan.

En la Figura 13 se señala que un 4,5% de germinación se obtuvo solo en la semana seis para el tratamiento T₄, que utilizó la mezcla de ácido giberélico y nitrato de potasio. El mismo comportamiento presentó T₃ pero con menores porcentajes de germinación (2,5%) a partir de la séptima semana en adelante. Por otro lado el tratamiento que empleó agua solo permaneció con un 1% de semillas germinadas desde la cuarta semana. Los tratamientos control y de KNO₃, T₀ y T₂ respectivamente, no presentaron germinación, lo que indicaría que la sola acción del nitrato de potasio como estimulante de germinación no tiene efecto en ella para las semillas de frutilla magallánica.

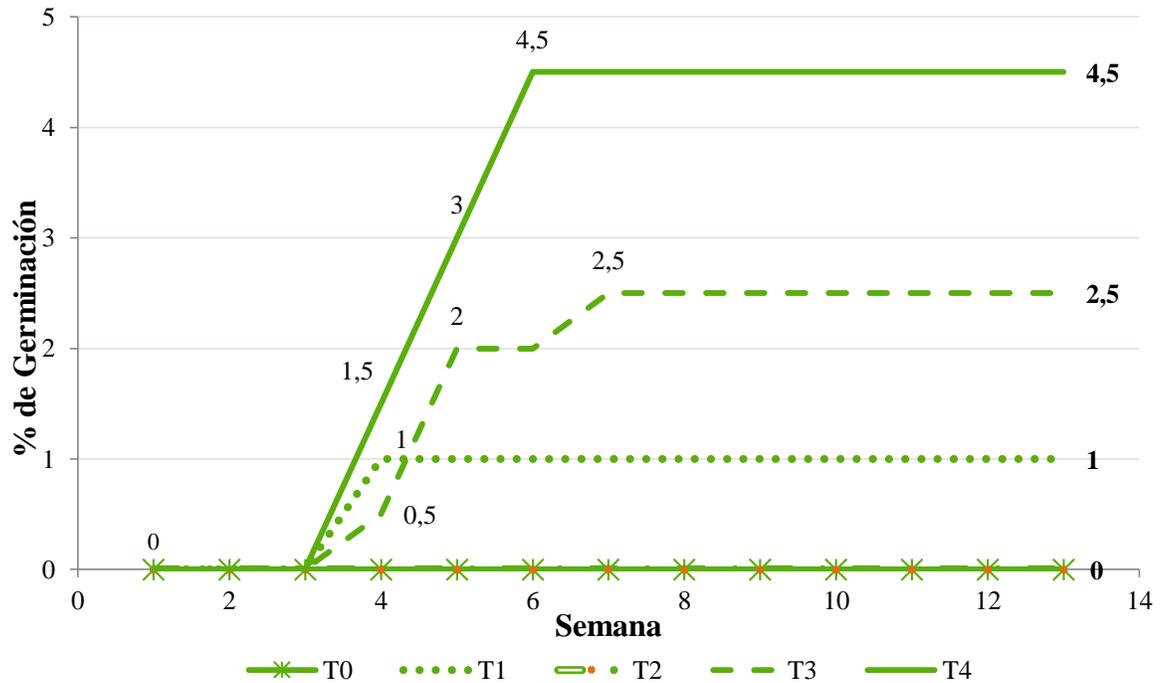


Figura 13. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* del estudio de endodormancia referente al ensayo de solución estimulante. Línea con estrella representa al tratamiento control T₀, línea punteada representa al tratamiento T₁ con agua como solución estimulante, línea con punto y guion representa al tratamiento T₂ con KNO₃, línea con guiones al tratamiento T₃ con GA₃ y línea continua al tratamiento T₄ con la mezcla de KNO₃ y GA₃.

La germinación baja obtenida en este ensayo también se relaciona con los factores que pudieron afectar la germinación, como la falta de bajas temperaturas, la concentración de ácido giberélico y nitrato de potasio, la escarificación con ácido sulfúrico, entre otras.

Dado los resultados la mejor solución que facilita la germinación es la combinación de KNO₃ y GA₃, alcanzando un 4,5% luego de 6 semanas en cámara, aunque este porcentaje es posible de aumentar con las mejoras en los estudios de germinación de la semilla de *Rubus geoides*.

Ensayo 2. Estratificación. Para el ensayo que contempla la comparación entre el efecto de la solución estimulante y el efecto de las bajas temperaturas de estratificación, se obtuvo que el mejor tratamiento fue el frío durante 60 días (T₃) alcanzando 11,5% a la cuarta semana de germinación (Cuadro 7), lo que fue estadísticamente mejor que los ensayos con 30 días de estratificación y la solución estimulante. Estos últimos no tuvieron diferencias significativas entre sí.

Los tratamientos con semillas estratificadas comenzaron su germinación a contar de la segunda semana, lo que implica que el efecto de las bajas temperaturas disminuye el tiempo en que las semillas germinan, en comparación con la germinación del tratamiento con la

solución estimulante (Figura 14). De hecho tuvieron resultados muy parecidos hacia el final de cada periodo de germinación: 8% para la estratificación de 30 días y 7,5% para la solución estimulante de KNO_3 y GA_3 .

Cuadro 7. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* para distintos tratamientos de estratificación.

Tratamiento	Tiempo de escarificación con H_2SO_4 al 98% (horas)	Estratificación	Porcentaje de germinación (%)
T ₀	control	No, control	0,0 b ¹
T ₁	1,0	No, solo KNO_3 + GA_3	7,5 ab
T ₂	1,0	Sí, frío 30 días	8,0 ab
T ₃	1,0	Sí, frío 60 días	11,5 a

¹Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), según comparación múltiple de medias de Duncan.

Los tratamientos que contemplaron la estratificación a bajas temperaturas comenzaron su germinación a partir de la segunda semana en que se encontraban las semillas en la cámara, lo que permite obtener una germinación más rápida en relación al tratamiento que consideró la solución estimulante, la que permitió una germinación a la tercera semana.

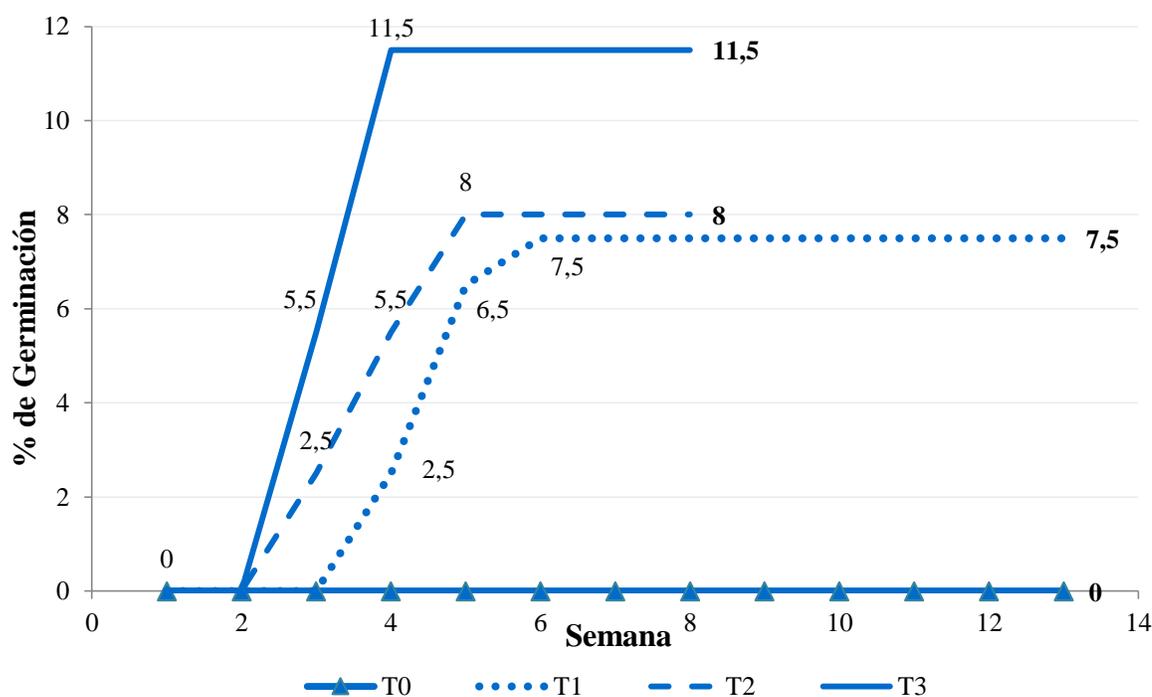


Figura 14. Respuesta de germinación de la semilla de *Rubus geoides* del estudio de endodormancia referente al ensayo de estratificación. Línea con triángulos representa al tratamiento control T₀, línea punteada al tratamiento T₁ con la solución estimulante de KNO₃ y GA₃, línea con guiones representa al tratamiento T₂ de estratificación fría de 30 días y línea continua al tratamiento T₃ con estratificación fría de 60 días. En estos dos últimos tratamientos, el final del periodo de germinación fue a la octava semana ya que en ese tiempo se cumplía el periodo de 13 semanas contando desde el primer día de estratificación.

Todos los resultados presentados indican que las semillas no tratadas del tratamiento control no germinan durante 90 días sin tener un tratamiento pregerminativo, por lo que para obtener una germinación anticipada y más facilitada es necesario tratarlas con la combinación de los factores estudiados. Con ello se comprende la existencia de dormancia interna que puede ser eliminada a través de bajas temperaturas y con una buena condición de germinación posterior a ellas.

Cabe mencionar que la estratificación fría no aumenta el 12% de germinación obtenido sin ella, ya que el mismo porcentaje de germinación fue alcanzado solo con la escarificación ácida. Aunque es posible reducir el tiempo en que la germinación se obtiene.

Con esta información fue posible establecer un protocolo de germinación para la semilla de frutilla magallánica, el que indica que un tratamiento con escarificación por una hora con ácido sulfúrico concentrado (98%) es necesario aplicarlo previamente a semillas que se estratifiquen por 60 días en oscuridad a 5° C para obtener una germinación cercana al 12% de germinación luego de tres semanas en una cámara con temperaturas entre 23 a 25° C.

CONCLUSIONES

La semilla de *Rubus geoides* muestra características morfológicas y anatómicas concordantes a las descritas para el género. Esto implica la presencia de rugosidades y reticulaciones en su superficie, un endocarpo duro, una testa delgada, la presencia de endosperma y el embrión.

Esta semilla exhibe exo y endodormancia. La presencia de exodormancia es el motivo de la impermeabilidad de la semilla para la germinación dadas las características morfológicas y anatómicas. La endodormancia responde a factores intrínsecos del embrión. Por lo tanto el conjunto de factores influye en la germinación de la semilla.

Entre los factores que intervienen en la germinación de las semillas, la barrera física que impone el endocarpo a la emergencia de la radícula, es esencial eliminarla a través de la escarificación. En cuanto a los medios de escarificación, el tratamiento por una hora con ácido sulfúrico (98%) tuvo diferencias significativas para eliminar esta barrera en relación a los otros tiempos empleados, y al mismo tiempo, la escarificación ácida tuvo diferencias significativas en relación al hipoclorito de sodio (2,5%) y el papel lija, los que no fueron eficientes para eliminar la exodormancia, sin ser diferentes significativamente entre ambos. Esto indicó que es posible eliminar la exodormancia de la semilla de *Rubus geoides* a través de 1 hora de exposición a ácido sulfúrico concentrado (98%). Así, la germinación comienza a partir de 4 semanas aproximadamente, bajo condiciones de fotoperiodo de 16/8 (luz y oscuridad, respectivamente) entre 23-25°C.

Aunque los porcentajes de germinación obtenidos no fueron altos, tampoco fueron mejorados con los tratamientos realizados posteriormente. No obstante, en el caso de las soluciones estimulantes y la estratificación, se observó que la capacidad de germinación de la semilla se ve aumentada con una solución que mezcla nitrato de potasio (34%) y ácido giberélico (2,0%) y un tiempo de estratificación fría de 60 días mantenidas a 5°C en condiciones de oscuridad, a manera de eliminar la endodormancia y los factores del embrión que afectan la germinación.

Todos los resultados alcanzados durante el análisis y los estudios de germinación de las semillas siguen siendo bajos para optar a programas de mejoramiento genético o de propagación de la especie, sin embargo sigue siendo necesario ahondar en mejoras del protocolo recientemente planteado, obteniendo nuevos y más altos porcentajes de germinación.

Obtener un mayor número de individuos, permitiría contar con mayor cantidad de material para el estudio de la especie y la comprensión de su biología reproductiva, aportando en la mantención de la reproducción silvestre de esta especie nativa y en programas de mejoramiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Alice, L. and C. Campbell. 1999, jan. Phylogeny of *Rubus* (*Rosaceae*) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86:81-97.
- Bañados, M. 2002. Frambuesas en Chile: sus variedades y características. Santiago, Chile: FIA. 88p.
- Baskin, C., O. Zackrisson, and J. Baskin. 2002. Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *American Journal of Botany*. 89:486-493.
- Bewley, J. 1997, jul. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9:1055-1066.
- Daubney, H. 1996. Brambles. In: John Wiley and Sons, Inc. (eds.). Fruit Breeding II. Nueva York, USA.
- Deighton, N., R. Brennan, C. Finn and H. Davies. 2000, feb. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1307-1313.
- Díaz, C. 2011. Categorización de la latencia en semillas de mora (*Rubus glaucus* Benth.), para el apoyo a programas de mejoramiento y conservación de la especie. Tesis de Magíster en Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. 69h.
- Finn, C. 2008. *Rubus* spp., blackberry. (pp. 348-351). In: Janick, J. and R. Paull (eds.). The Encyclopedia of Fruits and Nuts. Cambridge, USA: CABI.
- Heit, C. 1967. Propagation from seed: part 6: Hardseededness - a critical factor. American Nurseryman. 125: 1-5.
- Hoffmann, A., L. Liberona, M. Muñoz y J. Watson. 1998. Plantas Altoandinas en la Flora Silvestre de Chile. Santiago, Chile: Fundación Claudio Gay. 281p.
- Hummer, K. and D. Peacock. 1994, sept. Seed dimension and weight of selected *Rubus* species. *HortScience*. 29:1034-1036.
- Moise, J., S. Han, L. Gudynaite-Savitch, D. Johnson and B. Miki. 2005, sept-oct. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 41:620-644.

- Moreno, C. 2012. Efecto de ácido giberélico (AG₃), nitrato de potasio (KNO₃) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), sobre el desarrollo temprano de *Solanum sessiliflorum* (Cocona). Trabajo especial del Programa de Biología Aplicada. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada. 42h.
- Nybohm, H. 1980. Germination in Swedish blackberries (*Rubus* L. subgen *Rubus*). *Botaniska Notiser*, 133:619-631.
- Peacock, D. 1995. *Rubus* spp. Seed germination and morphology. Thesis for the degree of Master of Science in Horticulture. Oregon, USA. Oregon State University. 70h.
- Peacock, D. and K. Hummer. 1996, apr. Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. *HortScience*. 31:239-239.
- Riedemann, P. y G. Aldunate. 2003. Flora Nativa de Valor Ornamental; Identificación y Propagación. Chile, Zona Sur. Santiago, Chile: Editorial Andrés Bello. 516p.
- Skirvin R., S. Motoike, M. Coyner and M. Norton. 2005. *Rubus* spp. Cane Fruit. (pp. 566-582). In: Litz, R. (ed.). Biotechnology and agriculture No. 29. Biotechnology of fruit and nut crops. Florida, USA. 731p.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts
- Taylor, K., 2005, nov. Biological flora of the British Isles: *Rubus vestitus* Weihe. *Journal of Ecology*, 93:1249-1262.
- Tomlik-Wyremblewska, A., J. Zielinski and M. Guzicka. 2010. Morphology and anatomy of blackberry pyrenes (*Rubus* L., *Rosaceae*). Elementary studies of the European representatives of the genus *Rubus* L. *Flora*, 205:370–375.
- Vater, G. and M. Arena. 2005, mar. In vitro propagation of *Rubus geoides*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33:277-281.
- Wada, S. and B. Reed. 2011, aug. Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. *Scientia Horticulturae*. 130:660-664.
- Wada, S., J. Kennedy and B. Reed. 2011, aug. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*. 130:762–768.
- Warr, H. Savory, D. Bal. A.K. 1979. Germination studies of bakeapple (cloudberry) seeds. *Canadian Journal of Plant Science*.59: 69-74.

Werker, E. 1997. Seed anatomy. Encyclopedia of Plant Anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 424p.

Zasada, J. and J. Tappeiner. 2008. *Rubus* L. (pp. 984-996). In: Bonner, F. and R. Karrfalt (eds.). The Woody Plant Seed Manual. Agriculture Handbook 727. USA: U.S.D.A. Forest Service.