



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**CALIDAD MORFO-FISIOLÓGICA Y SANITARIA DE
SEMILLAS DE *Ruprechtia apetala* WEDD.
(POLYGONACEAE) PARA SU
DOMESTICACIÓN**

María Soledad Diaz

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención: Tecnología de Semillas

Córdoba, 2018

**CALIDAD MORFO-FISIOLÓGICA Y SANITARIA DE
SEMILLAS DE *Ruprechtia apétala* WEDD.
(POLYGONACEAE) PARA SU
DOMESTICACIÓN**

María Soledad Diaz

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Ing. Agr. (M.Sc.) María Laura Molinelli

Co-Directora: Ing. Agr. (M.Sc.) Vilma Mazzuferi

Asesora: Ing. Agr. (M.Sc.) Jimena E. Martinat

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. (M.Sc.) Claudia Alzugaray

Ing. Agr. (Dra.) Jacqueline Joseau

Ing. Agr. (M.Sc.) Jimena E. Martinat

Presentación formal académica

.....

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

“La función de equilibrio ambiental proporcionado por las plantas nativas jamás se podrá equiparar al cultivo homogéneo de especies exóticas. Si bien incursionar en la investigación de las especies nativas es un reto y una necesidad, la incorporación de especies nuevas a la silvicultura, es un proceso que lleva tiempo y debe tener respaldo científico”

Arias (1994)

*A Andrés, Nacho y Renata,
motor de todas mis mañanas*

Agradecimientos

A mis padres, por su apoyo incondicional, por ser motivo de inspiración y superación todos los días de mi vida.

A Andrés, por impulsarme a la realización de cada uno de mis proyectos. Y a sus papás, sin los cuales no podría haber hecho ni la mitad de este camino.

A mis hermanos, ejemplos de valor, confianza y apoyo.

A mi directora de tesis María Laura Molinelli, por guiarme y acompañarme en este desafío del estudio de especies nativas, desde el primer día que lo encaramos.

A mi co-directora, Vilma Mazzuferi, con quien aprendí mucho más que zoología, por transmitirme su pasión al estudio y la profesión.

A Jimena Martinat, por sus aportes como integrante de la comisión asesora.

A Susana Aráoz, por compartir desinteresadamente su conocimiento.

A la Escuela de Posgrado en particular y la FCA en general, por brindarme un lugar para ampliar mis conocimientos en una temática que me apasiona y por facilitarme las instalaciones para realizar los ensayos.

A mis amigas, hermanas que me regaló la vida, Thamara, Nadia, Sivina, Caros, Ceci y Laurin...Por tantos años de aguante, amistad verdadera e incondicionalidad.

A mis compañeros y amigos del trabajo, Anita, Lore, Fer, Tina, Naty, Flor y Vir, con quienes formamos un equipo capaz de encarar los proyectos más desafiantes; y un muy especial agradecimiento a Eugenia que coordina este grupo, quien me brindó un apoyo invaluable para realizar la maestría.

A mis compañeros de cursado César, Dolo, Mauri, Seba, Nacho, Ale, Rooo, Sil, Yes y las interminables rondas de mate con charlas que iban mucho más allá de las semillas.

A todos los profesores del posgrado, por transmitirnos sus conocimientos y experiencias, permitiéndonos opinar y aprender abiertamente.

Al CEPROCOR, lugar que aprecio con el corazón, donde realizo mi trabajo con gran libertad y apoyo. A sus directores, quienes incentivaron y apostaron a mi formación de posgrado.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de profundizar los conocimientos relacionados a aspectos morfológicos, fisiológicos y sanitarios de frutos y semillas de *Ruprechtia apétala* Wedd. (manzano del campo). Esta especie de la familia *Poligonaceae*, originaria del Chaco Serrano, presenta un deterioro que se ha incrementado en los últimos años por factores variados. La pérdida del bosque nativo pone en peligro de extinción a numerosas especies autóctonas, entre ellas, el manzano del campo del cual existen muy pocos estudios sobre todo en lo relativo a la reproducción por semillas. En cuanto al aspecto morfológico, se describieron características morfo-anatómicas novedosas del fruto y la semilla, se identificaron las vías de entrada del agua y su movimiento en el fruto y en la semilla. En relación a la calidad fisiológica, se analizaron los efectos de las variables luz y temperatura en diferentes estructuras (aquenios con sépalos, aquenios sin sépalos y semillas) para optimizar la germinación. A través de ensayos a campo y en laboratorio, se tipificaron las plántulas según los caracteres señalados en las reglas de la *International Seed Testing Association* (ISTA). Además se distinguió entre plántulas normales intactas, con ligeros defectos y anormales. Empleando el criterio de diversos autores y mediante el seguimiento periódico de la germinación, se establecieron los días para realizar el primer conteo y el conteo final para la determinación del poder germinativo. En el análisis entre individuos de una misma localidad en dos años de cosecha consecutivos, se observó variabilidad intra-poblacional e interanual en la germinación. En el aspecto sanitario, se determinó que la infestación fue causada por un insecto de la familia *Anobiidae*, subfamilia *Dorcatominae*, sección *Tricorynus*, siendo la primera mención de esta familia infestando semillas de *R. apétala*. Las semillas infestadas mostraron un daño marcado en su estructura, con grandes porciones del embrión y endosperma dañados, lo que impidió que las mismas germinaran. Todos estos resultados contribuyen al conocimiento para el cultivo y futura domesticación de la especie.

Palabras claves

Ruprechtia apétala, semillas, germinación, sanidad, domesticación.

ABSTRACT

The aim of this work was to expand the knowledge related to the morphological, physiological and healthy aspects of *Ruprechtia apetala* Wedd. (manzano del campo) seeds and fruits. This species, of the *Polygonaceae* family, native of the Chaco Serrano region, had suffered an increasing damage during the past years due to different factors. The loss of natural forest threatens many native species, manzano del campo among them, of which there is limited background of its study, especially in reproduction by seeds. New features of fruit and seed morpho-anatomy were described, and pathways of water entry and movement in the fruit and seed were also identified. In relation to the physiological quality, the effects of light and temperature variables were analyzed over different structures (achenes with sepals, achenes without them and seeds) to improve germination. The field and laboratory assays allowed the typification of the seedlings, according to the *International Seed Testing Association (ISTA) Rules*. Intact seedlings, slight defects and abnormal seedlings were also distinguished. Employing different authors criteria and the periodic monitoring of the germination assay, the days for first and final count were determined. The analysis between single trees of the same location in two consecutive years of harvest, an intrapopulation and interannual variability was observed. Regarding to seeds health, insects of *Anobiidae* family – *Dorcatominae* subfamily and *Tricorynu* section, were found as the infestation agents. This is the first mention of this family infesting *R. apetala* seeds. A pronounced damage of the seminal structures was observed, with large part of the embryo and endosperm spoiled, which inhibit seed germination. These results contribute to the cultivation and future domestication of this species.

Key words

Ruprechtia apetala, seeds, germination, health, domestication.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I: INTRODUCCION GENERAL	1
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA DEL FRUTO Y SEMILLA DE <i>Ruprechtia apetala</i> WEDD	10
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE <i>Ruprechtia apetala</i> WEDD. A MEDIANTE EL ENSAYO DE GERMINACIÓN	31
INTRODUCCIÓN	31
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	57
CAPÍTULO IV: CALIDAD SANITARIA DE SEMILLAS DE <i>Ruprechtia apetala</i> WEDD.	58
INTRODUCCIÓN	58
MATERIALES Y MÉTODOS	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	68
CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFIA CITADA	69
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES	81
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	82
FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION EN CUMPLIMIENTO DE LA FINALIDAD DE ESTA TESIS.....	83

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

- Fig. 1.1. Regiones de la Provincia fitogeográfica Chaqueña (tomado de Cabrera, 1971) y área de distribución de *Ruprechtia apetala*.....2
- Fig. 1.2. *Ruprechtiaapetala*. A: Vista general del árbol en fructificación; B: Rama floral mostrando flores femeninas en distinto estado de desarrollo; C: Racimo de flores masculinas; D: Ramas fructíferas..... 4
- Fig. 2.1. Fruto de *Ruprechtia apetala*. A: Vista externa del fruto inmaduro con sépalos acrescentes; B: Detalle de recuadro marcado en A, mostrando los sépalos pilosos; C: Fruto maduro con sépalos persistentes; D: Aquenio sin sépalos..... 16
- Fig. 2.2. Sépalo de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal con hacecillo central rodeado por fibras; B: Tricoma simple..... 17
- Fig. 2.3. Fruto de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal de fruto inmaduro con sección trigona; B: Detalle de recuadro en A, zona de unión de los carpelos; C: Corte transversal del pericarpo de fruto inmaduro con esclereidas de paredes radiales delgadas; D: Vista superficial de las macroesclereidas del pericarpo del fruto maduro, se observan paredes tangenciales externas engrosadas; E: Corte transversal de macroesclereidas, la flecha indica el canal longitudinal ramificado; F: Vista superficial de las macroesclereidas en la zona basal ensanchada, ocupada por taninos..... 19
- Fig. 2.4. Distribución de tejidos en el pericarpo del aquenio inmaduro de *Ruprechtiaapetala*. A: Clorénquima del mesocarpo; B: Parénquima incoloro del mesocarpo con presencia de cristales; C: Mesocarpo y endocarpo plegado, en el centro se observa el embrión; D: Células de mesocarpo con escasas reservas, la flecha indica gránulos de almidón..... 21

Fig. 2.5. Fruto, semilla y embrión de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal del fruto de *R. apetala* mostrando endosperma ruminado y embrión plegado en el centro; B: Semilla con episperma de aspecto papiloso; C: Corte longitudinal del aquenio con semilla madura; D: Corte longitudinal de la semilla con embrión derivado de óvulo ortótropo; E: Vista superficial del embrión con cotiledones foliáceos..... 23

Fig. 2.6. Caracteres anatómicos de las semillas de *R. apetala*. A: Episperma constituido por células papilosas de paredes delgadas; B: Capa de aleurona; C: Engrosamiento en zona de radícula; D: Tinción de capa de aleurona; E: Tinción del endosperma mostrando reservas de almidón; F: Corte transversal de cotiledones, las flechas señalan la presencia de cristales en el embrión..... 25

Fig. 2.7. Entrada del agua en fruto y semilla de *Ruprechtia apetala* sumergidos en verde rápido (A-H) y agua (I). A: Vista superficial del aquenio con restos de los tres estilos, las flechas indican las aberturas teñidas; B: corte transversal del estilo con discontinuidad en la capa de macroescleridas; C: Corte longitudinal del estilo con células subyacentes al epicarpo y teñidas con verde rápido; D: Corte longitudinal del aquenio; E: Corte longitudinal de la semilla en la zona de la chalaza; F: Células de la hipostase con taninos; G: Corte longitudinal de la región del micrópilo con epistase; H: Células del episperma; I: Corte transversal del fruto con endosperma hidratado..... 28

Fig. 3.1. Vista del ensayo de germinación a los 3 días desde la siembra de las diferentes estructuras. A. Aquenios con sépalos. B. Aquenios sin sépalos. C. Semillas..... 45

Fig. 3.2. Germinación de ACS, ASS y SE en diferentes condiciones térmicas (DDS: días desde la siembra)..... 46

Fig. 3.3. Evolución de la germinación de *R. apetala* en suelo. A y B: elongación del hipocótilo sobre la superficie a los 7 días desde la siembra; C: Apertura y cambio de color de los cotiledones, desarrollo del primer par de hojas verdaderas (15 días desde la siembra); D: Elongación de epicótilo y desarrollo de plántulas completas (20 días).... 47

Fig. 3.4. Semillas germinadas de <i>R. apetala</i> en condiciones de laboratorio. A y B: Emisión de radícula y cotiledones; C: Semillas en diferentes niveles de desarrollo hasta la formación de la plántula completa.....	49
Fig. 3.5. Plántulas normales con diferencias en longitud de hipocótilo y radícula.....	50
Fig. 3.6. Plántulas normales. A: intactas con hipocotilo y raíz de diferente longitud; B: ligero defecto: daño en los cotiledones en una proporción inferior al 50 %; C: ligero defecto: infección secundaria en raíz principal; D: extremo de la raíz atrapado en el fruto.	51
Fig. 3.7. Plántulas anormales de <i>R. apetala</i> . A: raíz principal con retardo en el crecimiento; B: infección primaria y retardo en el crecimiento de raíz; C: cotiledones retenidos en el fruto e hipocótilo en forma de lazo cerrado; D: plántula totalmente desarrollada sin desprendimiento del fruto; E: ambos cotiledones dañados en una proporción mayor al 50 %; F: plántulas con infección primaria en raíz; G: vista en lupa binocular de infección primaria de raíz.....	52
Fig. 3.8. Porcentajes de germinación (y desvíos) de diferentes individuos de la población de Luyaba en dos años de cosecha. A: Primer conteo (día 8); B: Conteo final (día 17).....	55
Fig. 4.1. Insecto adulto emergido de los frutos de <i>R. apetala</i> . A: Vista lateral; B: Cara dorsal; C: Cara ventral.....	63
Fig. 4.2. Aquenios de <i>R. apetala</i> A: Aparentemente sanos; B: Con orificio de salida.....	64
Fig. 4.3. Infestación (%) en aquenios de <i>R. apetala</i> . A: Localidad de Capilla del Monte; B: Localidad de La Calera; C: Localidad de Luyaba.	65
Fig. 4.4. Daños provocados por <i>Tricorynus</i> en las estructuras seminales. A: Interior de semilla dañado, la flecha indica el orificio de salida del insecto adulto; B: Semilla completamente comida, ausencia de embrión y endosperma; C: Insecto alojado dentro de la semilla (flecha).....	67

TABLAS:

Tabla 3.1. Porcentaje de germinación (% plántulas normales) de aquenios con sépalos (ACS), aquenios sin sépalos (ASS) y semillas (SE) de *Ruprechtia apetala* en distintas condiciones térmicas y lumínicas, a los 35 días de ensayo43

Tabla 3.2. Número de plántulas normales desarrolladas durante el ensayo de germinación de *Ruprechtia apétala* para determinar el día del primer conteo..... 53

LISTADO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

%: Porcentaje

°: Grados

°C: Grados Centígrados

µm: micrómetros

<=>: Rango de temperaturas

ACS: Aquenios con sépalos

ASS: Aquenios sin sépalos

DDS: Días después de siembra

Ha: Hectárea

h: Horas

L/O: Luz/Oscuridad

m: Metro

mm: milímetros

m s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar

O: Oeste

PG: Porcentaje de germinación

S: Sur

SE: Semilla

Temp.: Temperatura

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ruprechtia apétala Weddell (Polygonaceae) es una especie endémica de Argentina y Bolivia que crece en la Provincia Chaqueña, encontrándose en el Chaco Occidental y en el Chaco Serrano (Fig. 1.1) conviviendo con especies predominantes como el “quebracho colorado santiagueño” y el “orco quebracho” respectivamente (Cabrera, 1971).

El área original del bosque nativo del Chaco Serrano viene sufriendo, a lo largo de los años, una dramática disminución y un permanente deterioro originado por causas antrópicas tales como la tala indiscriminada, la expansión agropecuaria, el sobrepastoreo, el fuego, la erosión, la degradación de los suelos y la invasión de especies exóticas (Zak *et al.*, 2004; Tecco *et al.*, 2006; Hoyos *et al.*, 2010; Montenegro, 2013) donde Córdoba no es ajena a esta situación. Estas condiciones ambientales, rápidamente cambiantes, no proveen las condiciones más favorables para la persistencia a largo plazo de muchas especies nativas (Ashworth y Martí, 2011). Se han registrado extinciones locales de especies (Cagnolo *et al.*, 2009), impactos negativos sobre la reproducción sexual y la aptitud biológica de la progenie de plantas (Aguilar *et al.*, 2006; Ashworth y Martí, 2011).

La acción de estos factores originan en los ecosistemas desequilibrios ecológicos, económicos y sociales (Atlas de los bosques nativos argentinos, 2003; FUNAM, 2004; Torrella *et al.*, 2006; Nori *et al.*, 2013) poniendo a miles de especies en riesgo como *R. apétala*, categorizada como especie casi amenazada por la pérdida del hábitat (IUCN, 2013). Dicha fragmentación es considerada una de las causas principales de la actual crisis de biodiversidad ya que las especies presentan patrones de distribución discontinuos producidos por la variación espacial de las condiciones ambientales que determinan la calidad de sus hábitats (Santos y Tellería, 2006).

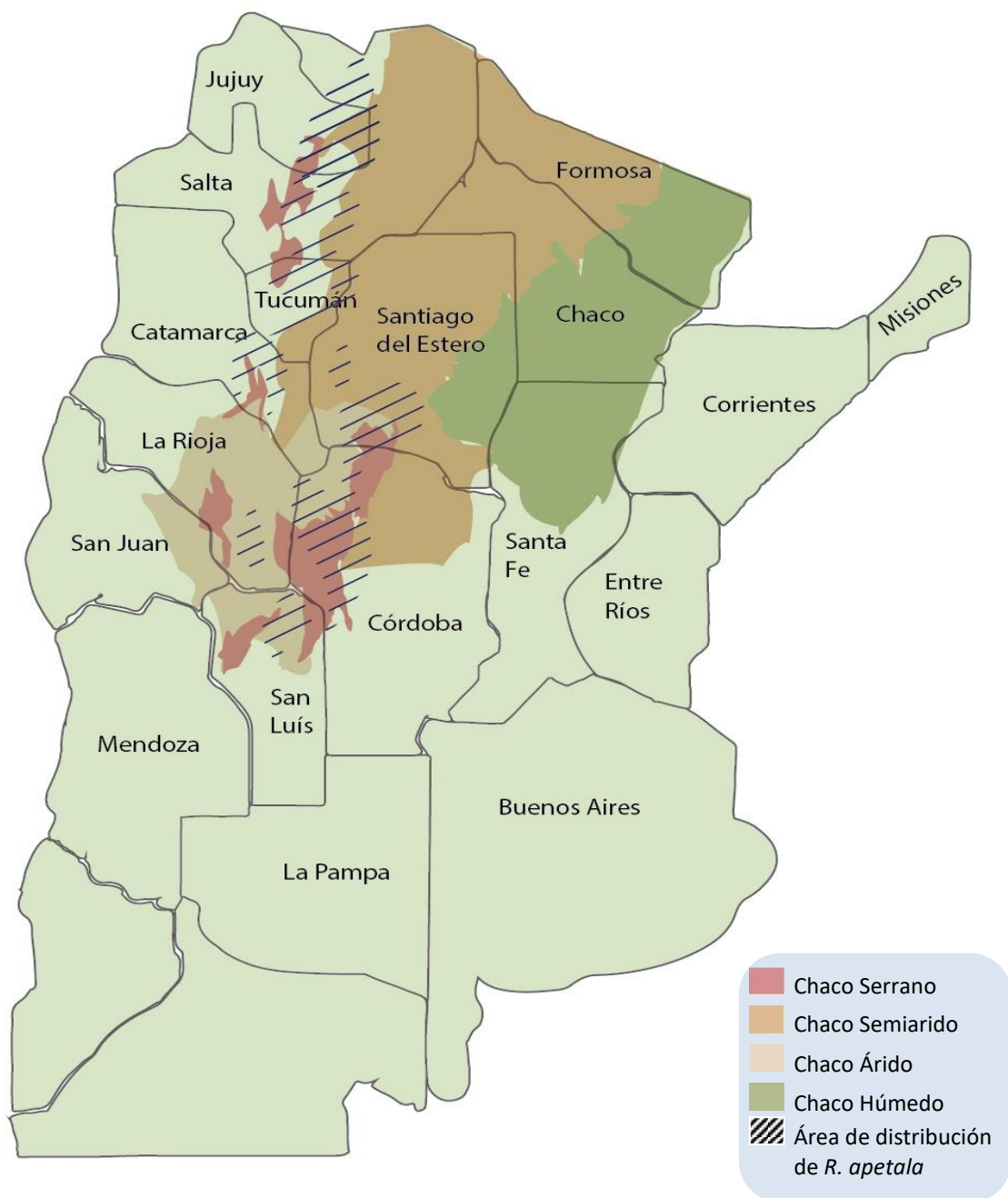


Fig. 1.1.Regiones de la Provincia fitogeográfica Chaqueña (tomado de Cabrera, 1971) y área de distribución de *Ruprechtia apetala*.

Descripción botánica y usos de *Ruprechtia apetala*. Importancia del estudio de la semilla.

Ruprechtia apetala, vulgarmente conocida como “manzano del campo”, “manzanito”, “higuerón”, “higuerilla”, “duraznillo blanco”, “duraznillo”, “virarú”, “virarú colorado” o “chuluco” es una especie arbórea nativa dioica (Fig. 1.2 A) de 2-10 m de altura, con copa redondeada y corteza lisa de color gris oscuro (Barboza *et al.*, 2006). Las hojas adquieren una coloración rojiza al finalizar el verano. Las flores se agrupan en racimos y la floración se produce en diciembre y enero. Las flores masculinas son rosado-pálidas (Fig.1.2 C), mientras que las femeninas son rojizas o amarillentas y forman frutos muy llamativos (Fig.1.2 B). La fructificación ocurre en los meses de febrero, marzo y abril, con permanencia en el árbol durante varios meses (Fig.1.2 D). El fruto es un aquenio con forma de pera y conserva sus sépalos (Demaiot *et al.*, 2002; Barboza *et al.*, 2006). Se reproduce por semillas (BEA, 2008).



Fig. 1.2. *Ruprechtia apetala*. A: Vista general del árbol en fructificación; B: Rama floral mostrando flores femeninas en distinto estado de desarrollo; C: Racimo de flores masculinas; D: Ramas fructíferas.

Las especies leñosas son excepcionalmente consideradas como un recurso que puede ser manipulado dentro de los establecimientos agropecuarios. En parte, esto es debido a la falta de conocimientos relacionados con la ecología y el manejo de los árboles y arbustos nativos y también a la ausencia de modelos de aprovechamiento que incorporen efectivamente como un recurso a la vegetación nativa (Marino, 2001). Es de resaltar que las semillas de los árboles y arbustos, particularmente si proceden de especies silvestres, son menos conocidas que las semillas de especies cultivadas, sin embargo, no por ello se deben considerar de menor importancia (Niembro Rocas, 1988).

R. apetalatiene gran importancia ya que presenta múltiples usos como medicinal, tintórea, su madera se emplea para fabricación de utensilios, es de uso ornamental y de gran poder insecticida. Asimismo, se sugiere para la conformación de combinaciones vegetales con beneficios múltiples en caminos de la Provincia de Córdoba (Demaio *et al.*, 2002; Barboza *et al.*, 2006; Gordillo, 2009; Trillo *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Del Corral *et al.*, 2014).

Entre los antecedentes de estudios de *R. apetalata*, Cocucci (1961) describe sus características morfológicas en un trabajo a nivel de género. Sin embargo, no hay trabajos que describan las particularidades anatómicas del aquenio y la semilla. El estudio de los caracteres morfológicos de las semillas aportan rasgos diferenciales para el reconocimiento y permiten explicar las relaciones entre su estructura y función, los mecanismos de diseminación y los procesos que ocurren durante la germinación (Werker, 1997; Abraham de Noir y Bravo, 2014).

Calidad de semillas

Desde el punto de vista biológico, la semilla es la unidad de reproducción sexual y tiene la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenece, siendo uno de los elementos más eficaces para que ésta se disperse en tiempo y espacio (Doria, 2010). Constituye una de las formas más importantes de germoplasma primario, ya que a partir de ella se lleva a cabo la regeneración natural o artificial de los bosques (Niembro Rocas, 1988); sin embargo, para lograrlo, esto dependerá, en parte, de su calidad.

Para Schmidt (2000) la calidad de la semilla es un término general que se refiere a la pureza, a la capacidad de germinación, al vigor y a la calidad genotípica del lote. Por su parte, Craviotto (2006) la define como un conjunto de cualidades o atributos que pueden ser divididos en “componentes primarios” y “componentes secundarios”. Entre los primeros, se encuentran la viabilidad, la germinación, el vigor y la sanidad, mientras que la pureza varietal, pureza físico – botánica, peso, densidad, humedad, tamaño, integridad física y forma, son algunos de los atributos que se clasifican como componentes secundarios. Los componentes primarios son aquellos que definen el stand inicial de plántulas, mientras que los componentes secundarios pueden condicionar la completa expresión de los primeros y, por ende, interferir en el establecimiento del cultivo. Lo que debe destacarse es la importancia que tienen estos atributos en la eficiencia y el éxito en la producción de plantines en vivero y en el establecimiento posterior en plantaciones forestales (Willan, 1985).

Para Popinigis (1974) la calidad de las semillas es la sumatoria de atributos físicos, fisiológicos, sanitarios y genéticos. El atributo fisiológico es muy importante para la domesticación, hace referencia a la longevidad, vigor y viabilidad de las semillas, esta última puede determinarse en condiciones de laboratorio mediante el ensayo de germinación estándar que, de todas las determinaciones de calidad, es la prueba de viabilidad universalmente aceptada y utilizada (AOSA, 1983; ISTA, 2014a). Los estudios de germinación son fundamentales, ya que permiten completar el conocimiento integral de las especies, desde el momento en que el embrión inicia su desarrollo para dar lugar a la plántula y luego de ésta a los órganos adultos (Ricardi, 1996). ISTA (2014a) define a la germinación como “la emergencia y desarrollo de una plántula hasta una etapa donde el aspecto de sus estructuras esenciales indica la posibilidad de que se desarrolle a planta normal bajo condiciones favorables de suelo.”

Si bien existen antecedentes en *R. apetala* y en otras especies del mismo género sobre las condiciones y requerimientos del ensayo de germinación (Alzugaray *et al.*, 2007a; Marino *et al.*, 2008; Funes *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2011; Pais Bosch *et al.*, 2012; Joseau *et al.*, 2013), no están incluidas en las Reglas AOSA (1983), *ISTA Tropical and Subtropical Tree and Shrub Seed Handbook* (ISTA, 1998), *Handbook on Seedling Evaluation* (ISTA, 2013) ni en las Reglas ISTA (2014a) por lo cual es necesario establecer

aspectos relacionados con el ensayo de germinación. En relación a especies nativas leñosas que crecen junto a *R. apetala*, son numerosos los trabajos científicos realizados que describen sus procesos germinativos, tanto del estrato arbóreo como arbustivo y herbáceo (Alzugaray *et al.*, 2007a; Marino *et al.*, 2008; Alzugaray y Carnevale, 2009; Funes *et al.*, 2009; Ashworth y Martí, 2011; Valfré-Giorello *et al.*, 2012) e inclusive algunas enredaderas (D'Agostino *et al.*, 2012).

En las Reglas ISTA (2014a) se describen protocolos de germinación en dos *Poligonaceae*, *Rheum rhaponticum* y *Rumex acetosa*, en ambas se prescribe temperatura alternante sin requerimientos específicos de luz. Barcelló Coll *et al.* (1998) informan que en *Rumex crispus* es necesaria la presencia de luz y temperatura alternante. Además, estos autores destacan que la eliminación de la testa en estas semillas induce la germinación.

La producción de semillas así como su calidad fisiológica puede ser muy variable entre temporadas, como fue observado por Tapia *et al.* (2012) en semillas de *Prosopis chilensis* que presentaron valores de PG variables en diferentes años de cosecha. Asimismo, Alzugaray *et al.* (2007b) informaron diferencias de PG en semillas de *Schinopsis balansae* y *Aspidosperma quebracho-blanco* al analizar muestras de diferentes años.

El concepto de calidad sanitaria de las semillas se refiere a la presencia o ausencia de enfermedades causadas por organismos tales como hongos, bacterias, virus, nematodos o insectos; también algunas condiciones fisiológicas como falta de elementos esenciales pueden ser incluidas (ISTA, 2014a). Considerando el atributo sanitario, diversas especies de insectos, particularmente de los órdenes Coleóptera y Lepidóptera, pueden infestar las semillas, tanto de especies nativas como cultivadas (Murga Orillo *et al.*, 2015).

En general, son escasos los antecedentes que evalúan el daño e impacto de los insectos seminófagos de las especies nativas y menos aún en *R. apetala*. Mazzuferi (1997) estudió diversos métodos de control de insectos de la familia *Bruchidae* que infestan semillas de *Prosopis*. Rojas-Rousse *et al.* (2009) estudiaron la infestación de semillas y vainas de *Acacia caven* causada por coleópteros de la familia *Anobiidae*.

Aunque la mayoría de las especies de insectos que se alimentan de las semillas de plantas silvestres se encuentran regulando sus poblaciones, al incorporarse estas especies vegetales al ámbito productivo, desde una mirada antropocéntrica, los insectos seminófagos se convierten en plagas (Mazzuferi, 2000). Por esta razón, el conocimiento y grado de daño de los insectos asociados a las especies nativas es muy relevante para la toma de decisiones en el manejo de los productos o subproductos generados (Romero, 2005).

Por otra parte, ciertas prácticas agronómicas inadecuadas favorecen el aumento de las poblaciones de organismos dañinos, incrementan la susceptibilidad de las plantas a la acción de estos y desencadenan enfermedades fisiológicas (Mazzuferi y Conles, 2013). Esto se incrementa, entre otros factores, por la intervención del hombre en los procesos de domesticación. La conservación y el uso de los recursos genéticos forestales son componentes claves en dichos procesos. La fusión de estos dos objetivos implica un abordaje interdisciplinario que deben interactuar sobre un mismo objeto: los recursos genéticos forestales nativos, dirigiendo sus esfuerzos tanto el desarrollo de sistemas productivos como para su conservación (Verga, 2013).

Los estudios sobre la recolección y conservación de germoplasma de poblaciones vegetales naturales, su multiplicación, manejo y valoración de la variabilidad genética, constituyen la base para su posterior uso, domesticación y manejo, evitando así procesos de erosión genética (Jaramillo y Baena, 2000). Para la perpetuación de una especie se hace necesaria la identificación, caracterización y conocimiento sobre su dinámica, con el fin de ajustar técnicas de germinación, a los efectos de obtener plantines en vivero y poder realizar a posteriori ensayos de reforestación (Villagra *et al.*, 2004; Villarreal Garza *et al.*, 2013).

En base a estos antecedentes se plantean las siguientes **hipótesis**:

Las características morfológicas e histoquímicas de frutos y semillas de *Ruprechtia apétala* explican su comportamiento durante la germinación.

La germinación de aquenios con sépalos, aquenios sin sépalos y semillas se incrementa bajo condiciones de temperatura alternante, sin requerimiento lumínico.

La presencia de insectos seminófagos afecta la calidad de la semilla, disminuyendo la germinación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad morfo-fisiológica y sanitaria de semillas de *Ruprechtia apétala* para su domesticación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir los caracteres morfo-anatómicos del fruto y la semilla de *Ruprechtia apétala* que establezcan relaciones con el proceso de germinación.
- Evaluar la calidad fisiológica de semillas mediante el ensayo de germinación.
- Determinar la presencia de insectos seminófagos que deterioran la calidad de las semillas de la especie en estudio.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA DEL FRUTO Y SEMILLA DE *Ruprechtia apetala* WEDD.

INTRODUCCIÓN

El fruto es el ovario maduro acompañado por estructuras que forman una unidad con él (Cronquist, 1977). Junto con la semilla, constituye la unidad de dispersión, es por ello que entre el fruto y la semilla existe una relación funcional y morfológica (Esau *et al.*, 1982).

Botánicamente, el fruto de *Ruprechtia apetala* Wedd. es un aquenio protegido por los sépalos acrescentes (Cocucci, 1961; Abraham de Noir y Bravo, 2014). El aquenio es un fruto simple, seco, indehisciente y pequeño (rara vez mide más de 1 cm de longitud), derivado de un gineceo tricarpelar unilocular y de ovario súpero; con el pericarpo delgado y duro y una única semilla, adyacente -pero no soldada- al pericarpo (Cronquist, 1977; Dimitri y Orfila, 1985).

Los frutos y semillas de las Poligonáceas fueron estudiados en varios trabajos. Entre ellos se mencionan los realizados por Arambarri y Bayón (1995), Ronse Decraene *et al.* (2000); Zomleffer (2004) y Barboza *et al.* (2006) quienes describen las características exomorfológicas generales de los aquenios y las semillas. Por otro lado, Spjut (1994) menciona con el nombre de pseudosámara, o falsa sámara, al fruto alado, que contiene alas distales que son 2 o más veces más largas que el pericarpo y formadas por el perianto acrescente, mencionando algunos ejemplos para la familia de las Poligonáceas.

En *Poligonum*, los caracteres morfológicos tales como el color, la forma, el tamaño y las características de la superficie de los aquenios fueron detallados por Kantachot y Chantaranothai (2011). Heo *et al.* (2001) describen la forma y la anatomía de los aquenios de 17 especies del género *Fagopyrum*, mientras que Wijngaard *et al.* (2007) estudiaron la morfoanatomía de los aquenios y semillas de *F. esculentum*. Por otro lado, Hong (1989)

trabajó sobre los caracteres morfológicos de las estructuras reproductivas en especies de *Persicarieae*, *Knorrigia*, *Aconogonon*, *Coccolobeae* y *Rumiceae*(*Poligonaceae*). Además de los antecedentes citados en las Poligonáceas, también se estudiaron las características morfoanatómicas de los aquenios de otras familias, como las Rosáceas, Ciperáceas y Asteráceas, en trabajos realizados por Tantawy y Naseri (2003), Hefler y Longhi-Wagner (2008), Zhu *et al.* (2006), Akcin y Akcin (2014). Por otro lado, se analizaron los trabajos de Voyiatzis (1992) y Mattana *et al.* (2012), quienes emplearon distintas soluciones para identificar la entrada del agua en la drupa de *Olea europea* y en la semilla de *Ribes multiflorum* respectivamente.

Considerando las semillas de diferentes familias, existe información general en las obras clásicas de Werker (1997) y Evert (2006), mientras que para las Poligonáceas se cita, entre otras, la obra de Corner (2009). Este autor, advierte que son escasos los conocimientos sobre las semillas de esta familia, debido a que se encuentran encerradas en frutos indehiscentes. Kanwal *et al.* (2016) analizaron los caracteres morfológicos de semillas de 40 taxones de la familia Poligonáceas con el fin de generar una nueva herramienta para la delimitación de taxones dentro de esta familia. Además, Martin (1946) describió la morfología de semillas de distintos géneros de Poligonáceas, sin embargo, no detalla las características del embrión de *Ruprechtia*. Cocucci (1961) informó la presencia de endosperma ruminado en especies de este género.

Por su parte, Woodcock (1914) estudió la morfología de las semillas de especies de la familia Poligonáceas y los cambios ocurridos en el proceso de germinación, mientras que Metzger (1992) evaluó la función de las estructuras seminales que obstaculizarían dicho proceso, representando un tipo de dormición impuesta por las cubiertas. En relación a las unidades de dispersión en las cuales interviene el fruto, Baskin y Baskin(2001) mencionan que si se aplican tratamientos tales como remover el pericarpo, es probable que se observen cambios en los porcentajes de germinación.

En base a los antecedentes expuestos y en función de la ausencia de información detallada sobre las características morfo-anatómicas de los aquenios y las semillas de *Ruprechtia apetala*, se plantean los siguientes objetivos:

- Describir los caracteres morfo-anatómicos del fruto y la semilla.
- Determinar por donde comienza la entrada del agua y su desplazamiento en el fruto y la semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el mes de junio del año 2014, se recolectaron flores y frutos maduros de un conjunto de árboles de *Ruprechtia apetala* de la localidad de Luyaba, Dpto. San Javier, Provincia de Córdoba, Argentina (32° 20'S, 65° 30'O, Altitud: 688 m s.n.m.). Se herborizaron ejemplares de *R. apetala* en el Herbario ACOR de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba y se catalogaron, para su documentación, en la colección LMC (N° 1044 y 1045). Los frutos se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Caracterización morfo-anatómica del fruto y la semilla

La caracterización morfo-anatómica del fruto y la semilla se realizó según los criterios de Spjut (1994) y Corner (2009), mientras que para las características internas generales de la semilla, en particular las del embrión y del endosperma se siguió a Martin (1946). Se utilizó un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4. Para determinar el color del pericarpo y la cubierta seminal se compararon frutos maduros y semillas con la carta de colores de Munsell (2000). Los datos de la longitud de los frutos y las semillas se obtuvieron midiendo 2 repeticiones de 25 unidades, el peso de los frutos se obtuvo según las Reglas ISTA (2014a) con 8 repeticiones de 100 unidades.

Para el estudio anatómico del fruto y la semilla se realizaron preparados permanentes mediante el método de inclusión en parafina y deshidrataciones sucesivas en graduaciones crecientes de etanol. Los frutos incluidos en parafina fueron cortados con micrótopo rotativo (6-8 μ m) y teñidos con safranina y *fast green*, según las técnicas de D'Ambrogio de Argüeso (1986). También se realizaron preparados semipermanentes, los cuales se tiñeron con safranina y azul astral. Para las pruebas histoquímicas se siguieron las técnicas descritas por Zarlavsky (2014) y se utilizaron los siguientes reactivos y colorantes: para determinar la presencia de almidón, reactivo de Lugol; lípidos, Sudan III; proteínas en la capa de aleurona, azul de Coomassie; lignina, floroglucina 1% en alcohol etílico 96°; taninos, sulfato férrico en formol 10%. Los preparados se observaron con un

microscopio Nikon Eclipse E 400, se tomaron registros fotográficos y se describieron empleando la terminología de Metcalfe y Chalk (1972, 1979).

Zona inicial de entrada de agua

Para determinar el sitio inicial de entrada de agua, se sumergieron 10 frutos en verde rápido saturado en alcohol etílico 96° a temperatura ambiente. Se realizó la observación de la tinción retirando los frutos a las 24 h y a los quince días. Luego, se lavaron con agua y secaron con toallas de papel a fin de absorber el exceso superficial del colorante. Otros 10 frutos se sumergieron en agua y se observaron a las 24 h. Se cortaron a mano libre en secciones longitudinales y transversales, y se observó el camino del colorante (en el primer caso) y evidencias de hidratación con un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4 y un microscopio Nikon Eclipse E 400. En todos los casos se tomaron registros fotográficos. La técnica descrita anteriormente es una adaptación de los métodos empleados por Voyiatzis (1992) y Gama-Arachchige *et al.* (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfo-anatómica del fruto

Exomorfología: El fruto de *R. apetala* es un aquenio rodeado por 3 sépalos acrescentes (Fig. 2.1 A), al igual que el fruto de otras 16 especies de *Ruprechtia* descritas por Cocucci (1961). Por otro lado, en otros géneros, Hong (1989) menciona de 3 a 5 sépalos en la tribu *Persicarieae*, 5 en *Coccolobeae*, 6 en *Rumiceae*, y 5 en los géneros *Aconogonon* y *Knorringia*.

En *R. apetala*, los sépalos del fruto inmaduro son pilosos (Fig. 2.1 B), esta característica disminuye con la madurez, donde los sépalos disminuyen su pilosidad y adquieren un color rojo 10R (4/6) (Fig. 2.1 C). La longitud del aquenio maduro con sépalos es de 3,2 cm y el peso de 1000 frutos es 29,70 g. Según Abraham de Noir y Bravo (2014), la presencia del cáliz acrescente y el peso reducido de los frutos son caracteres que favorecen la dispersión anemócora. En este sentido, Werker (1997) aclara que la mayoría de las estructuras aladas se dispersan mediante el viento, por otro lado, la presencia de alas también puede favorecer la flotabilidad.

El aquenio de *R. apetala* es trígono de forma piramidal o piriforme y el pericarpo es de color marrón 7,5 YR (5/4), glabro y de superficie lisa (Fig. 2.1 D). Mide de 7 mm a 1 cm de longitud y de 3 a 4 mm de ancho, en concordancia con Cronquist (1977) quien menciona que los aquenios son frutos pequeños y rara vez alcanzan más de 1 cm de longitud. Sin embargo, los valores hallados en *R. apetala* son comparativamente mayores a los observados en 20 especies del género *Polygonum* por Kantachot y Chantaranonthai (2011), quienes informaron una longitud de 1,3 a 3 mm para dichas especies.

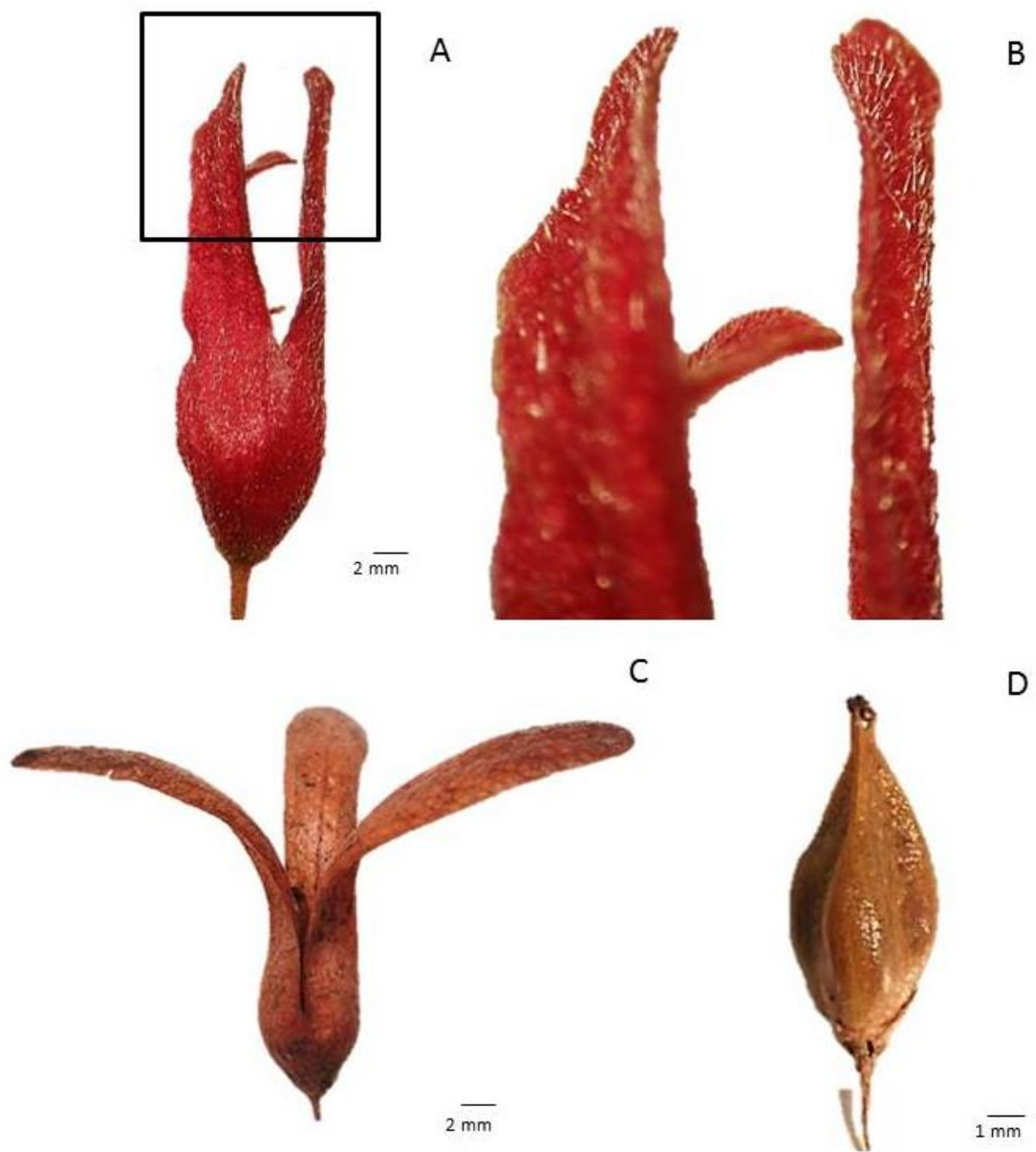


Fig. 2.1. Fruto de *Ruprechtia apetala*. A: Vista externa del fruto inmaduro con sépalos acrescentes; B: Detalle de recuadro marcado en A, mostrando los sépalos pilosos; C: Fruto maduro con sépalos persistentes; D: Aquenio sin sépalos.

Anatomía de sépalos: el sistema dérmico está representado por una epidermis uniestratificada, con células que, en transcorte, poseen forma rectangular a redondeada (Fig. 2.2 A). La epidermis adaxial presenta tricomas simples unicelulares cortos de 50 μ m (Fig. 2.2 B), mientras que en la epidermis abaxial son más abundantes y más largos (70 μ m). En los sépalos maduros, los tricomas se caen con la consecuente disminución de la pilosidad. El sistema fundamental está compuesto por el mesófilo formado por 5-7 capas de parénquima esponjoso laxo, los hacesillos del sistema vascular son colaterales, además los centrales están rodeados por un anillo de fibras (Fig. 2.2 A).



Fig. 2.2. Sépalo de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal con hacesillo central rodeado por fibras; B: Tricoma simple.

Anatomía del pericarpo: El aquenio de *R. apetala* es tricarpelar y en transcorte posee un contorno trilobado, la zona de unión de los carpelos coincide con los extremos de los lóbulos (Fig. 2.3 A y B). El epicarpo está compuesto por una capa de esclereidas, células columnares de 53 μ m de longitud, con las paredes radiales rectas a levemente onduladas en el fruto joven (Fig. 2.3 C), que se van engrosando conjuntamente con la pared tangencial externa, a medida que se produce la maduración del fruto (Fig. 2.3 D). Las esclereidas se pueden localizar en distintos órganos de la planta y son frecuentes en el endocarpo pétreo de las drupas y frutos nuciformes, así como en el tegumento seminal de

muchas semillas (Evert, 2006; González, 2017). Las esclereidas descritas en el pericarpo de *R. apétala* (Fig. 2.3 E), coinciden con las esclereidas alargadas, de paredes secundarias muy densas, que casi ocluyen el lumen y que forman una capa continua en empalizada, denominadas macroesclereidas, con función mecánica y de sostén, descritas por Evert (2006). En los textos clásicos de morfología vegetal, se cita a las macroesclereidas como células con paredes secundarias celulósicas o lignificadas (Fahn, 1974; Esau *et al.*, 1982); en el presente trabajo, la reacción con floroglucina dio resultado negativo, lo que indica que las macroesclereidas del aquenio de *R. apétala* no están lignificadas. También se mencionan macroesclereidas no lignificadas en el episperma del guisante (*Pisum sativum*, Evert, 2006). El lumen de las macroesclereidas tiene forma triangular hacia la pared tangencial interna, y forma un canal longitudinal en el centro de la célula que se ramifica hacia la pared tangencial externa (Fig. 2.3 E). En el lumen se hallaron taninos que dieron reacción positiva a la tinción con sulfato férrico, con un color pardo negro (Fig. 2.3 E, F). Werker (1997) y Evert (2006) explican las funciones de los taninos, como un grupo heterogéneo de sustancias polifenólicas responsable de la repulsión de los herbívoros, la protección contra los hongos, las bacterias y los virus; mencionan la impermeabilidad al agua, con el consecuente impedimento de la imbibición del embrión y también le atribuyen la capacidad de colorear el aquenio.

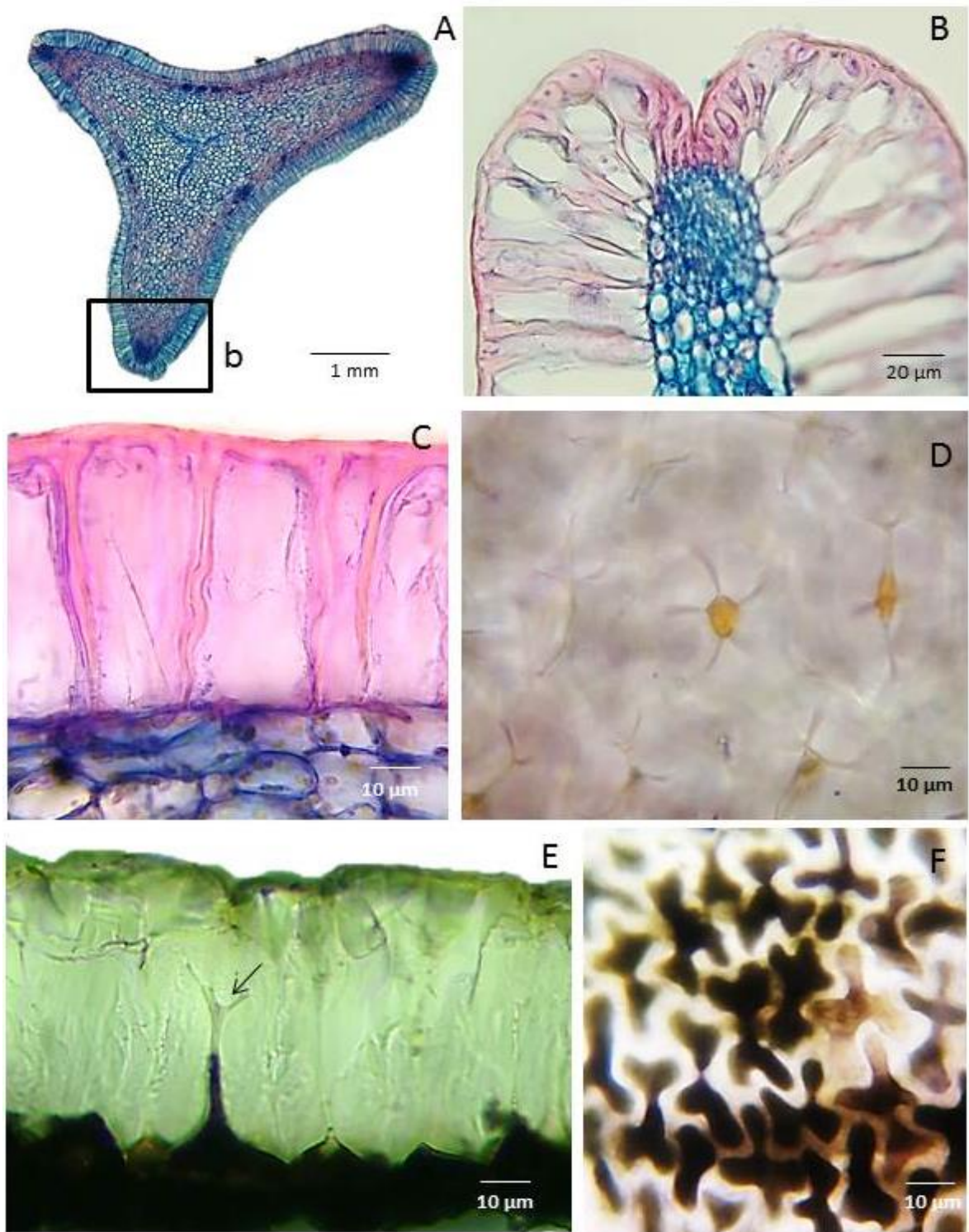


Fig. 2.3. Fruto de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal de fruto inmaduro con sección trígona; B: Detalle de recuadro en A, zona de unión de los carpelos; C: Corte transversal del pericarpo de fruto inmaduro con esclereidas de paredes radiales delgadas; D: Vista superficial de las macroesclereidas del pericarpo del fruto maduro, se observan paredes tangenciales externas engrosadas; E: Corte transversal de macroesclereidas, la flecha indica el canal longitudinal ramificado; F: Vista superficial de las macroesclereidas en la zona basal ensanchada, ocupada por taninos.

A continuación del epicarpo, se observa el mesocarpo (Fig. 2.4 A) constituido por 4-8 capas de clorénquima, con las células pequeñas y alargadas tangencialmente o algo isodiamétricas, gradualmente, hacia las capas más internas las células adoptan forma redondeada, aumentan su tamaño y son incoloras. En estas primeras capas se encuentran los hacecillos, distribuidos de a tres en cada valle y un hacecillo de mayor tamaño en cada costilla; en la zona del parénquima incoloro se observan cristales (Fig. 2.4 B). El número total de capas del mesocarpo varía acompañando las hendiduras del aquenio trígono.

El endocarpo está compuesto por una capa de células redondeadas o alargadas y plegado en algunas zonas para acompañar la forma ruminada de la semilla (Fig. 2.4 C).

En relación al tamaño del aquenio de *Ruprechtia*, Cocucci (1961) afirma que a medida que el fruto madura, el ovario aumenta mucho de volumen (comparándolo con el escaso aumento de tamaño observado en el embrión) y acumula reservas en el pericarpo. Si bien las observaciones del presente trabajo coinciden con las modificaciones descritas en las paredes del fruto y en el embrión conforme se produce la maduración, al realizar las tinciones con Lugol, se encontraron escasas sustancias de reservas de almidón (Fig. 2.4 D).

En el fruto maduro se mantienen las macroesclereidas del epicarpo, el mesocarpo se reduce a 1-3 capas de células en la zona de los valles y 4-6 en la zona de las costillas, en tanto que no quedan vestigios del endocarpo. Estos datos coinciden con lo informado en el trabajo de Ronse Decraene *et al.* (2000) al describir el fruto maduro en otras especies de la familia. En relación a la función de las macroesclereidas en el fruto indehisciente de *R. apetala*, se considera a Werker (1997), quien aclara que en las especies donde los frutos constituyen la unidad de dispersión, las esclereidas del pericarpo pueden constituir la principal capa de protección de la semilla.

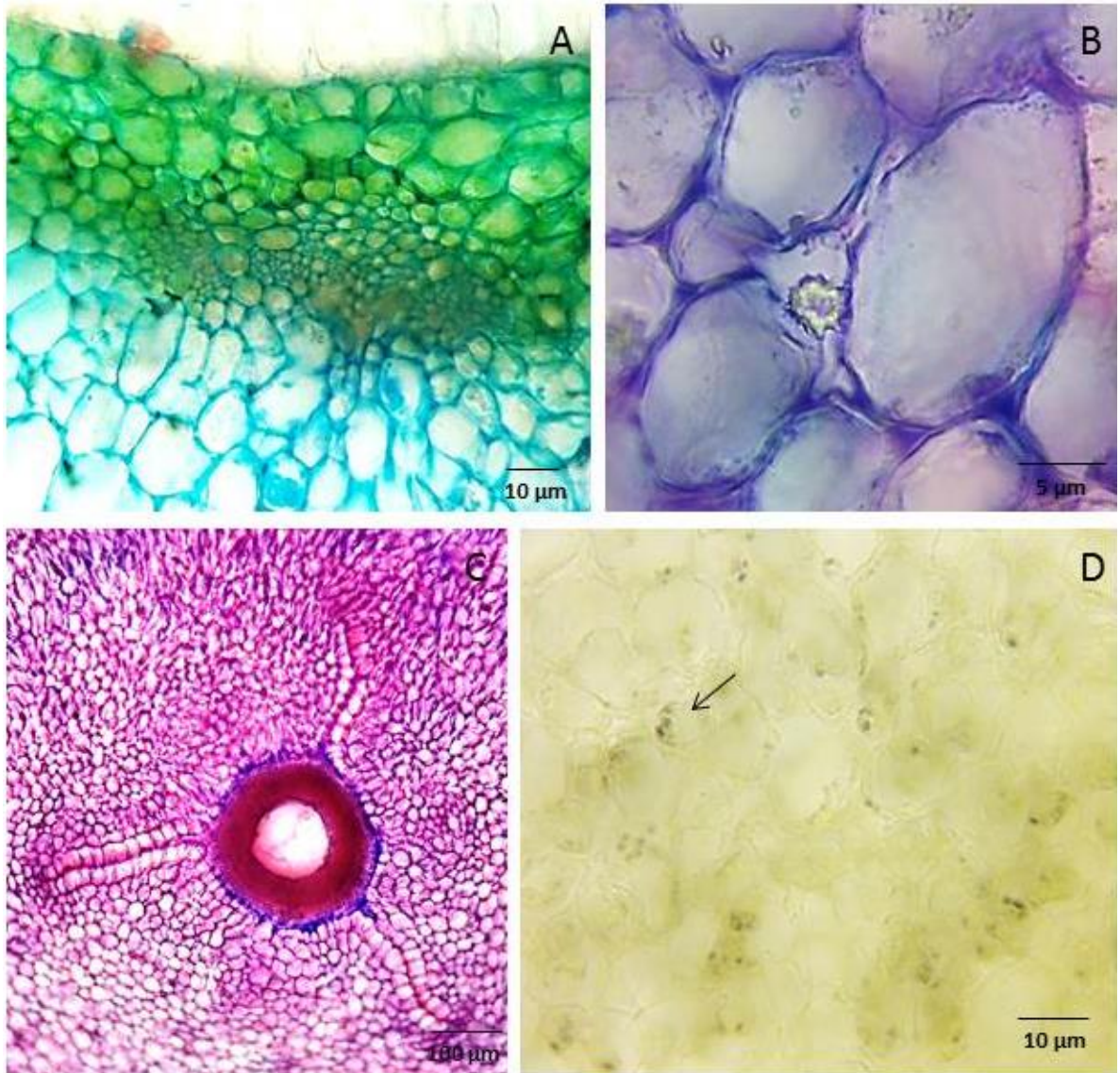


Fig. 2.4. Distribución de tejidos en el pericarpio del aquenio inmaduro de *Ruprechtia apetala*. A: Clorénquima del mesocarpo; B: Parénquima incoloro del mesocarpo con presencia de cristales; C: Mesocarpo y endocarpo plegado, en el centro se observa el embrión; D: Células de mesocarpo con escasas reservas, la flecha indica gránulos de almidón.

Caracterización morfo-anatómica de la semilla

Exomorfología: La semilla de *R. apétala* mide 5-7 mm de largo y 3-3,5 mm de ancho. Es trígona y de forma piramidal o piriforme, al igual que el pericarpo que la contiene (Fig. 2.5 B). La superficie externa de la cubierta seminal muestra un patrón papiloso, formado por la protrusión leve de la pared tangencial externa convexa (Fig. 2.5 B). Estos resultados concuerdan con lo informado por Kanwal *et al.* (2016) en semillas de otros géneros de la familia. Las invaginaciones observadas en la cubierta seminal unistrata permiten clasificar a la semilla de *Ruprechtia* dentro del tipo Coccoloba, según la clasificación de Periasamy (1962).

En relación al tejido nutricional, se observa endosperma amiláceo ruminado (Fig. 2.5 A, C) en concordancia con lo informado por Cocucci (1961) en el género *Ruprechtia*. Sin embargo, Hong (1989) describe un endosperma no ruminado para los géneros *Knorringia* y *Aconogonon*. Con respecto al embrión, deriva de un óvulo ortótropo, con cotiledones foliáceos, ampliamente expandidos hacia dos de los vértices del aquenio y plegados en sentido transversal (Fig. 2.5 A, D, E). Todas estas descripciones coinciden con las realizadas por Martin (1946) quien clasifica a este tipo de embrión según su ubicación en la división Axial, subdivisión Foliado, tipo Plegado.

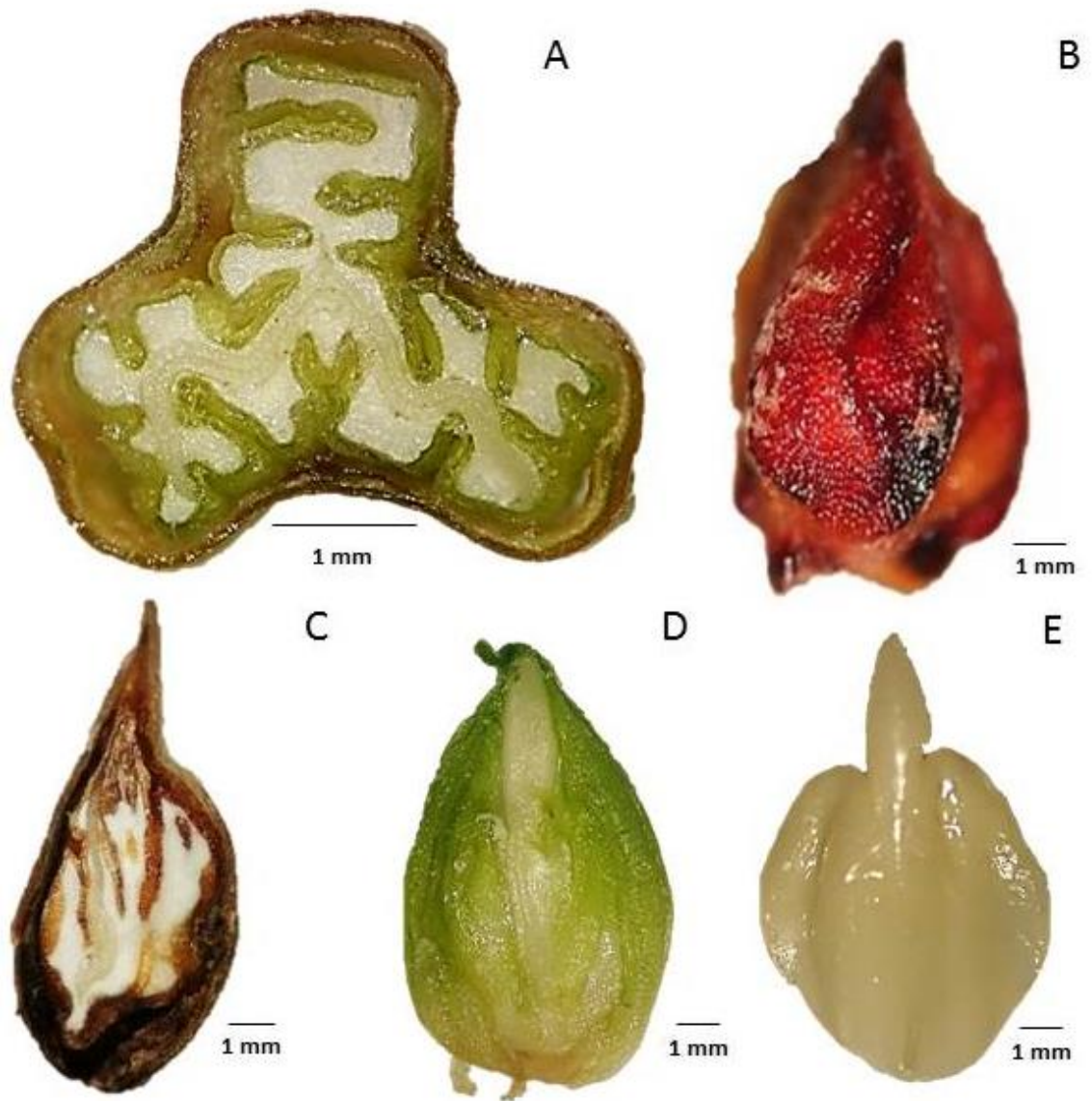


Fig. 2.5. Fruto, semilla y embrión de *Ruprechtia apetala*. A: Corte transversal del fruto de *R. apetala* mostrando endosperma ruminado y embrión plegado en el centro; B: Semilla con episperma de aspecto papiloso; C: Corte longitudinal del aquenio con semilla madura; D: Corte longitudinal de la semilla con embrión derivado de óvulo ortótropo; E: Vista superficial del embrión con cotiledones foliáceos.

Anatomía de Semilla: El episperma está constituido por una hilera de células cuboides, que miden 90 μm de alto y poseen paredes delgadas (Fig. 2.6 A). Según Werker (1997), el episperma constituido por células con paredes delgadas y lumen celular grande, contribuye a la baja densidad, y son típicas de semillas que se dispersan con el viento o con el agua. Esta autora también menciona que una cubierta seminal delgada es característica de semillas que se encuentran dentro de un fruto indehiscente, como es el caso del aquenio de *R. apetala*. No se observan tricomas ni estomas. Por debajo del episperma se encuentran 2 a 3 hileras de células con cloroplastos, a continuación, la capa de aleurona está rodeada por una delgada cutícula y formada por una a dos hileras de células y hasta cinco en la zona de la radícula (Fig. 2.6 B, C). Las proteínas de la capa de aleurona reaccionaron positivamente a la tinción con azul de Coomasie (Fig. 2.6 D). La presencia de la capa de aleurona ya es mencionada para las Polygonaceae por Werker (1997). Además, Woodcock (1914) sugiere que estas proteínas juegan un papel importante durante la germinación en semillas de *Polygonum*. El endosperma está formado por células grandes, de paredes delgadas que contienen gránulos de almidón, los cuales se tiñeron con lugol (Fig. 2.6 E). Estas observaciones coinciden con los trabajos de Neubauer (1971) y Ronse Decraene *et al.* (2000) quienes destacan que la presencia de la capa de aleurona es una característica poco común en dicotiledóneas.

En relación al embrión, en el mesofilo de los cotiledones se observan cristales estrellados. Algunos se ubican dentro de las células del embrión y otros por fuera (Fig. 2.6 F).

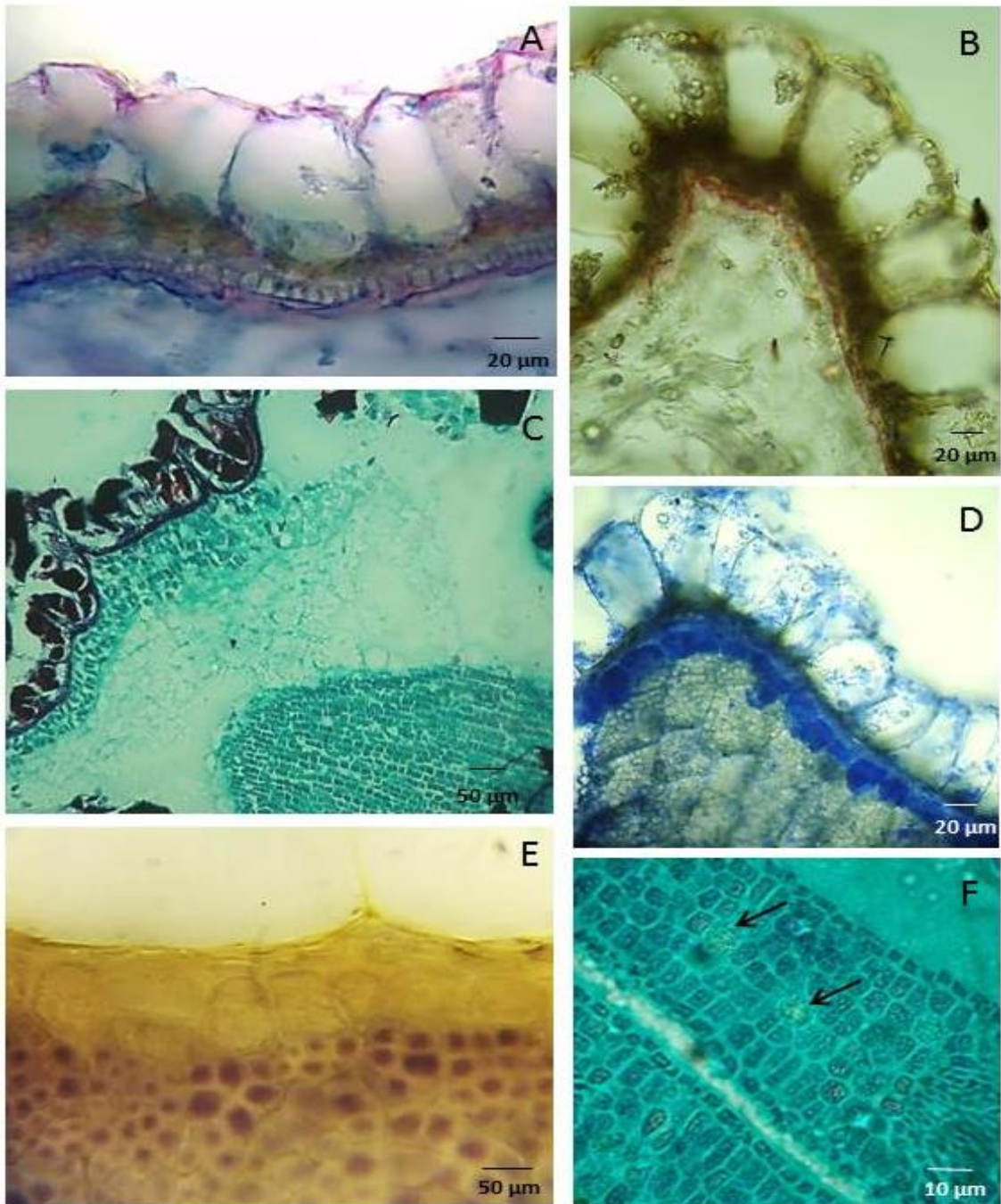


Fig. 2.6. Caracteres anatómicos de las semillas de *R. apetala*. A: Episperma constituido por células papilosas de paredes delgadas; B: Capa de aleurona; C: Engrosamiento en zona de radícula; D: Tinción de capa de aleurona; E: Tinción del endosperma mostrando reservas de almidón; F: Corte transversal de cotiledones, las flechas señalan la presencia de cristales en el embrión.

Zona inicial de entrada del agua

Las observaciones realizadas en los frutos retirados a las 24 h del comienzo de la imbibición en la solución de verde rápido, ponen en evidencia que el ingreso de agua ocurre por los restos de los tres estilos (Fig. 2.7 A). Existe una discontinuidad en la capa de macroesclereidas del epicarpo, en la zona de la sutura apical de los carpelos que conforman cada estilo (Fig. 2.7 B). Se forman así tres aberturas apicales, a través de las cuales ingresa el colorante, que permiten superar el bloqueo causado por las macroesclereidas en empalizada del pericarpo. Los cortes histológicos longitudinales del estilo muestran que las células alargadas de paredes gruesas subyacentes al epicarpo, reaccionan positivamente con el verde rápido (Fig. 2.7 C), indicando la zona de movimiento del agua hacia el interior del lóculo. Estas observaciones concuerdan con las realizadas en el fruto de *Olea europea* L. por Voyiatzis (1992), quien identificó que el agua ingresa a las drupas por la sutura ventral del carpelo.

También se observa coloración a lo largo del haz vascular desde el pedicelo, el cual permanece unido al aquenio de *R. apetala*, continuando por el funículo, hasta su punto de terminación en la chalaza de la semilla (Fig. 2.7 D). En esta última región se encuentra la hipostase, constituida por un grupo de células bien diferenciadas y dispuestas en 5-11 capas compactas que adoptan la forma de plato (Fig. 2.7 E). Las células son angulares y poseen contenidos rojizos a marrones que viran al verde en presencia del sulfato férrico, lo que indica la presencia de taninos (Fig. 2.7 F). Estos resultados concuerdan con los hallados en la semilla de *Ribes multiflorum* por Mattana *et al.* (2012), quienes observan ausencia de tinción en la hipostase con la solución de azul de metileno, debido a la presencia de taninos en las células que evitan la entrada de la solución y actúan como un *tapón chalazal*.

En la región micropilar de la semilla de *Ruprechtia apetala*, a diferencia de lo informado por Mattana *et al.* (2012) en *Ribes multiflorum*, no se tiñó la epistase y se observó que esta estructura constituida por células suberizadas, que obstruyen el micrópilo, permanecieron incoloras durante el período de imbibición con el verde rápido (Fig. 2.7 G).

Las células de la capa más externa del tegumento seminal se colorearon de celeste, lo que indica que el agua difunde a través de episperma, mientras que el endosperma y el embrión permanecieron sin teñir con el verde rápido (Fig. 2.7 D, E, G y H), aunque sí se mostraron significativamente hidratados.

Después de 15 días del comienzo de la imbibición en la solución de verde rápido, el endosperma y el embrión aún permanecieron sin teñir, pero mostraron claras evidencias en el incremento del contenido de agua en sus tejidos. Estos resultados son semejantes a los descrito por Mattana *et al.* (2012), quienes sugieren que algunos métodos de tinción son solo aproximaciones indirectas, ya que la cubierta seminal presenta distinto comportamiento frente al agua (peso molecular: 18,015 g/mol), en contraste con otros colorantes que poseen moléculas de mayor tamaño (verde rápido: 808,843 g/mol).

En el fruto colocado en agua, las observaciones realizadas a las 24 h, mostraron evidencias de que la imbibición del endosperma ocurre por el agua que ingresa a través de las células del episperma subyacente. Las zonas periféricas del endosperma se observaron grises debido al mayor contenido de agua, mientras que el endosperma cercano al embrión permanecía aún blanco (Fig. 2.7 I).

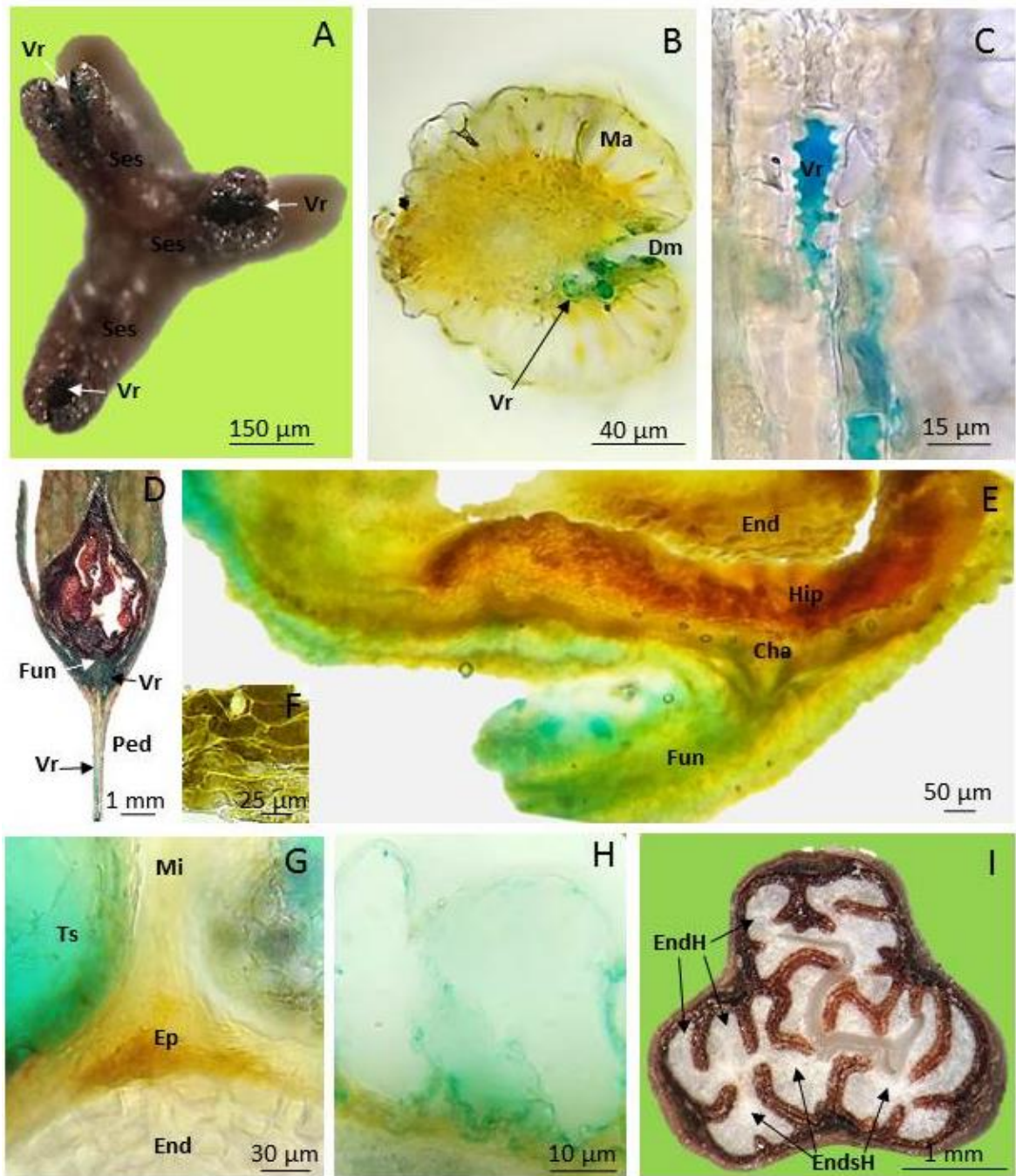


Fig. 2.7. Entrada del agua en fruto y semilla de *Ruprechtia apetala* sumergidos en verde rápido (A-H) y agua (I). A: Vista superficial del aquenio con restos de los tres estilos, las flechas indican las aberturas teñidas; B: corte transversal del estilo con discontinuidad en la capa de macroescleriedas; C: Corte longitudinal del estilo con células subyacentes al epicarpo y teñidas con verde rápido; D: Corte longitudinal del aquenio; E: Corte longitudinal de la semilla en la zona de la chalaza; F: Células de la hipostase con taninos; G: Corte longitudinal de la región del micrópilo con epistase; H: Células del episperma; I: Corte transversal del fruto con endosperma hidratado. Referencias: Ch, chalaza; Dm, discontinuidad de las macroescleriedas; End, endosperma; EndH, endosperma adyacente al

episperma hidratado; EndsH, endosperma sin hidratar; Ep, epistase; Fun, funículo; Hip, hipostase; Ma, macroesclereidas; Mi, micrópilo; Ped, pedicelo; Ra, radícula; Ses, sutura estilo; Ts, tegumento seminal; Vr, verde rápido.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo aportan características morfo-anatómicas novedosas del aquenio y de la semilla de *R. apetala*. En el aquenio, se demuestra la presencia de macroesclereidas no lignificadas y de taninos en el lumen de las mismas, también se confirma la naturaleza de las sustancias de reserva del mesocarpo, los gránulos de almidón. En la semilla, se corrobora la presencia de la capa de aleurona en el endosperma y se revela, por primera vez, la existencia de cristales en el mesófilo de los cotiledones. Se identifica como vía de entrada del agua en el fruto, la sutura ventral de los carpelos en los estilos, mientras que en la semilla, el agua ingresa a través del tegumento seminal.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE *Ruprechtia apetala* WEDD. A MEDIANTE EL ENSAYO DE GERMINACIÓN

INTRODUCCIÓN

El manejo de los recursos forestales hoy se concibe necesariamente desde un punto de vista de la conservación y manejo de los recursos genéticos, con todo lo que implica valorar económicamente a los árboles, aquilatar su función ecológica y sobre todo reflexionar ante una fuente potencial de nuevos productos. De aquí que el manejo forestal debe contribuir a la conservación de la biodiversidad en general y de los recursos genéticos en particular (Ledig, 1997).

En la región del Chaco Serrano, el bosque nativo ha perdido cobertura por causas variadas, lo que trae como consecuencia la fragmentación del hábitat, con profundas modificaciones ecológicas. Esta fragmentación trae aparejado la pérdida de especies nativas, invasión de especies exóticas y cambio en la dinámica de interacción entre plantas y animales (Aguilar y Galetto, 2004; Dardanelli *et al.*, 2006; Ferreras y Galetto, 2010). Numerosos trabajos realizados en las últimas dos décadas muestran que este tipo de disturbio puede tener un fuerte impacto sobre la reproducción sexual de las plantas (McGarigal y Cushman, 2002; Fahrig, 2003; Aizen, 2007).

El ensayo de germinación es la prueba universalmente aceptada y utilizada para determinar la calidad fisiológica de las semillas en condiciones de laboratorio (AOSA, 1983; ISTA, 2014a). La calidad fisiológica de un lote de semillas implica que estas cumplan con la condición indispensable de viabilidad, pero además de estar vivas, las semillas deben poder germinar y producir una plántula con sus estructuras esenciales desarrolladas normalmente (Gallo, 2008). Según las Reglas ISTA (2014a), el objeto del ensayo de germinación es determinar el potencial de germinación de un lote de semillas

que puede ser utilizado para comparar la calidad de diferentes lotes y estimar el valor de implantación en el campo.

Este ensayo tomó importancia en especies forestales a partir de las décadas del 70 y 80 debido al creciente interés económico y conservacionista (Oliveira *et al.*, 1989). Existen protocolos de germinación para numerosas especies cultivadas de árboles y arbustos que están incluidas en Reglas ISTA (2014a). Sin embargo, aquellas de origen silvestre como *Ruprechtia apetala*, son menos conocidas y estudiadas por lo que no cuentan con normas estandarizadas aunque, no por ello, se deben considerar de menor importancia (Niembro Rocas, 1988).

Esta tesis aborda el estudio de las metodologías para la reproducción sexual de *R. apetala*, empleando como soporte protocolos, conceptos y pautas de ISTA (2013, 2014a). Por ello, es necesario previamente definir semilla pura, así como caracterizar plántulas normales y anormales, establecer la duración del ensayo de germinación y determinar los requerimientos térmicos y lumínicos.

En las Reglas ISTA (2014a) se prescribe que para realizar el ensayo de germinación se parte de semilla pura, sin embargo, la descripción de semilla pura de la especie en estudio no está indicada en estas reglas. Su unidad de dispersión es un “aquenio con sépalos acrescentes” (Cocucci, 1961). Según las características morfológicas de su estructurase incluye al género *Ruprechtia* en la definición de semilla pura número 2 de ISTA (2014b) que considera a “aquenios o racimos con o sin perianto o pedicelo, a menos que sea obvia la ausencia de semilla; partes del aquenio o racimo de tamaño mayor a la mitad del tamaño original, a menos que sea obvia la ausencia de semillas; semilla con pericarpo/testa parcial o completamente removida y partes de semilla cuyo tamaño sea mayor a la mitad del tamaño original con pericarpo/testa parcial o totalmente removido.”

Para que la semilla pura germine, además de ser una semilla viable, es preciso que concurren una serie de condiciones externas favorables como la humedad, temperatura, oxígeno e iluminación (Pérez, 2003). Este autor también sostiene que el primer acontecimiento que tiene lugar en el proceso germinativo es la absorción de agua, ya que, para que la semilla vuelva a un metabolismo activo, es necesario que sus tejidos se rehidraten, no obstante, la temperatura es un factor decisivo en este proceso. Heydeker

(1977) describe a los factores humedad y temperatura como los más influyentes. Cuando la humedad no es limitante, la tasa de germinación es controlada por la temperatura (Funes y Venier, 2006). Las temperaturas cardinales de germinación (mínima, máxima y óptima) estarían estrechamente relacionadas con las condiciones ambientales del área geográfica de establecimiento de las especies (Aráoz *et al.*, 2004). En sistemas boscosos con una marcada estacionalidad térmica, en los que el estrato arbóreo es en general abierto, el proceso de germinación está regulado principalmente por la temperatura (Baskin y Baskin, 1998).

Al respecto, existen algunos antecedentes sobre las condiciones y requerimientos del ensayo de germinación de *R. apetala*. Así, Funes *et al.* (2009) determinaron como temperaturas óptimas de germinación 25 \leq => 15 °C y 35 \leq =>20 °C con valores de PG de 80 y 63% respectivamente. Asimismo, Pais Bosch *et al.* (2012) trabajando solamente con temperaturas alternantes obtuvieron resultados similares de 60 % de PG a 25 \leq =>15 °C y 80 % a 20 \leq =>10 °C. Cabe destacar que entre las temperaturas alternantes aplicadas por estos autores no se encuentra el rango 30 \leq =>20 °C, más adecuado a la zona climática templada, en donde se encuentra esta especie. Esta temperatura es la prescripta en las Reglas ISTA, (2014a) en la mayoría de las especies agrícolas, hortícolas, medicinales, así como en árboles y arbustos.

Barcelló Coll *et al.*(1998) indican que la germinación de las especies de la familia Poligonácea mejora cuando se emplean temperaturas alternantes. *Rheum rhaponticum* L., *Rumex acetosa* L. y *Fagopyrum esculentum* Moench., son las únicas Poligonáceas incluidas en los protocolos de germinación de las Reglas ISTA (2014a) donde se prescriben 20 \leq =>30 °C y además 20 °C pero solamente para *F. esculentum*. Alzugaray *et al.* (2007a) establecen 25 °C para *Ruprechtia laxiflora* y Soriano *et al.* (2011)25 \leq =>30 °C en *Ruprechtia fusca*. Funes *et al.* (2009) determinaron 25 \leq =>15 °C en 25 especies arbóreas y arbustivas del Chaco Serrano, y Valfré-Giorello *et al.* (2012) 35 \leq =>20 °C y 25 \leq =>15 °C para *Sebastiania commersoniana*, especie nativa de la misma zona. En la misma área geográfica y coincidiendo con Funes *et al.* (2009), D'Agostino *et al.* (2012) informaron similares temperaturas óptimas para la germinación de algunas enredaderas. Aráoz (2005) observó que las semillas de *Ziziphus mistol* Griseb. muestran un intervalo de temperaturas óptimas de germinación comprendido entre 25 y 35°C constantes así como la temperatura

alternante de 20<=>30 °C. Alzugaray y Carnevale (2009) indican una temperatura entre 25 y 35 °C para *Schinopsis balansae*.

La luzes otro de los factores ambientales que influye en la germinación y emergencia de plántulas. Diversas investigaciones demostraron que la luz actúa induciendo o eliminando latencia en las semillas, impidiendo o estimulando el crecimiento de la radícula (Perez Perez, 2007). ISTA (2013) destaca la importancia de la luz para algunas especies, sobre todo para aquellas con semillas pequeñas, con escasas reservas, que deben germinar rápidamente para ser autótrofas. Por otro lado, la presencia de luz es indiferente para la germinación de varias especies, aunque en las condiciones de laboratorio es necesaria a los fines de favorecer el desarrollo de las plántulas, reducir las posibilidades de ataques de microorganismos, prevenir plántulas etioladas y promover la formación de clorofila, sin embargo, la germinación de algunas especies puede ser inhibida por la luz. Este factor frecuentemente interactúa con la temperatura (Hartmann *et al.*, 1990; Carpenter *et al.*, 1993; Aular *et al.*, 1994).

En las Polygonáceas presentes en las Reglas ISTA (2014a) se indica que el proceso de germinación es indiferente a la condición lumínica empleada, característica de la mayoría de las especies protocolizadas en estas reglas. Sin embargo, Barcello Coll *et al.* (1998) afirma que la luz es necesaria en *Rumex crispus*.

En relación al fotoperiodo, Funes *et al.* (2009) no observaron diferencias significativas en el poder germinativo de *R. apétala* realizado en condiciones lumínicas (12 h luz/12 h oscuridad – PG: 80%) y en oscuridad permanente (PG: 67%), para un mismo rango de temperatura (25<=>15 °C), al igual que lo encontrado por Pais Bosch *et al.* (2012) al trabajar con estas mismas temperaturas, que informaron un PG cercano al 60% en ambas condiciones lumínicas.

Cuando las condiciones de temperatura, humedad, oxígeno e iluminación son adecuadas, una semilla normalmente germina. Sin embargo, en algunos casos, aún cuando las condiciones son las más favorables, la semilla no germina debido a ciertos procesos de dormición (Joseau *et al.*, 2013). Incluso, dependiendo del tipo de dormición, puede observarse un retraso en la germinación cuando las condiciones son óptimas para germinar (Baskin y Baskin, 1998). En aquellas semillas que presentan dormición exógena, la

germinación se retrasa debido principalmente a propiedades físicas y químicas de las cubiertas seminales, por lo que puede denominarse dormición impuesta por las cubiertas (Doria, 2010).

En especies nativas, la dormición puede ser superada mediante la aplicación de tratamientos pregerminativos, como lo muestran los trabajos realizados en especies del género *Ruprechtia*. En *R. apetala*, Volkmann y Suarez (2009) y Joseau *et al.* (2013) afirman que no requiere tratamientos pregerminativos. En el primer caso, destacan que el proceso de germinación es lento sin indicar el valor de poder germinativo, mientras que en el segundo caso se obtuvo 73%. Funes *et al.* (2009) y Pais Bosch *et al.* (2012) sin aplicar tratamientos obtuvieron 80 y 60 % de germinación respectivamente. En las mismas condiciones, Soriano *et al.* (2011), informaron en *R. fusca* un 72% de germinación. Sin embargo, en *R. laxiflora*, Alzugaray *et al.* (2007a) obtuvieron una germinación del 63% por medio de la ruptura de las paredes del aquenio. Barcelló Coll *et al.* (1998) en *Rumex crispus* (*Poligonaceae*) aseguran que la eliminación de la testa induce la germinación. Existen trabajos en especies nativas leñosas de la misma área geográfica que *R. apetala*, donde se han descrito métodos exitosos que eliminan la dormición mediante la remoción de endocarpos para la germinación de mistol (Aráoz, 2005) y de chañar (Alzugaray *et al.*, 2007a).

Para tipificar las plántulas según su desarrollo, ISTA (2013) clasifica los “**tipos de plántulas**” cuando el ensayo de germinación es realizado en condiciones naturales y “**categorías y grupos**” cuando el mismo se realiza en condiciones controladas. Sin embargo, la especie *R. apetala* no está incluida en las Reglas ISTA (2014a), ni en el *Handbook on Seedling Evaluation* (ISTA, 2013).

Con respecto a la caracterización de las plántulas, ISTA (2014a) define como “**plántula normal**”, a aquella que “posee el potencial de continuar con el desarrollo de una planta normal cuando crece en suelo de buena calidad, y bajo condiciones adecuadas de humedad, temperatura y luz” y como “**plántula anormal**”, a la que “no posee el potencial de continuar con el desarrollo de una planta normal cuando crece en suelo de buena calidad y bajo condiciones adecuadas de humedad, temperatura y luz.”

En cuanto a la duración del ensayo de germinación, su seguimiento periódico permite establecer el primer conteo, cuando ha transcurrido un tiempo suficiente para la valoración real de las plántulas (ISTA, 2014a) y el conteo final, cuando la curva de germinación en función del tiempo se estabiliza. En las Reglas ISTA (2014a) se indica que el primer conteo debe realizarse en un estado de desarrollo suficiente para una correcta evaluación de las plántulas. Además, agrega que los tiempos tabulados para el primer conteo de cada especie son los indicados cuando el ensayo es llevado a cabo a la temperatura más alta prescrita. Si se realiza a temperaturas menores, el primer conteo debe posponerse.

Son escasos los trabajos que describen la duración de este ensayo y el criterio de cómo obtener el primer conteo en especies forestales nativas, ya que las Reglas ISTA (2014a) son poco precisas al respecto (Aráoz, 2005). Para la evaluación del primer conteo en *Ziziphus mistol*, Aráoz y Del Longo (2007), y Del Longo y Aráoz (2009) consideraron los criterios aplicados por diversos autores para determinar la energía germinativa. Willan (1991) considera el día en que se produce el número máximo de plántulas normales en 24 h. Allen (1958) establece que es el número de días requeridos para alcanzar el 50% del porcentaje de germinación final y Catalán (1992) consideró los 2/3 de dicho porcentaje en *Prosopis flexuosa* y *Prosopis chilensis*. Joseau *et al.* (2013) informan para *R. apetala* que la duración del ensayo de germinación es de 8-18 días desde la siembra.

En la mayoría de las especies que se reproducen por semillas, se observa variación en la velocidad de germinación, lo que reduce el riesgo del fracaso en el establecimiento mediante la distribución de la germinación en el tiempo (Evans y Cabin, 1995). Esa variación existe entre poblaciones y entre semillas de la misma planta (Hernández Verdugo *et al.*, 2010). Los mecanismos que regulan el inicio de la germinación están bajo presiones selectivas; así, la variación de la capacidad germinativa entre y dentro de las especies se interpreta como una adaptación a las condiciones específicas del hábitat local y regional (Meyer *et al.*, 1997).

La importancia de la variación en los árboles es fundamentada por Furnier (1997): “los niveles de variación genética dentro de especies y poblaciones interesan en el manejo de recursos genéticos, porque la variación sirve como materia prima de la evolución y

está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales. Los patrones de variación dentro de especies nos interesa, ya que determinan la manera en que explotamos y conservamos estos recursos ..."

Los niveles de reconocimiento de la variación, la determinación de la cantidad y tipo de variabilidad presente dentro de una especie es una tarea ardua que debe realizarse cuidadosamente, pues no existe una forma "única" de estimar los patrones de variabilidad dentro de los rodales naturales (Zobel y Talbert, 1988), ya que existen diversos niveles en que se expresa la variación, tales como, la variación geográfica (o de procedencia), sitios dentro de las procedencias, rodales dentro de los sitios, árboles individuales dentro de los rodales y dentro de los árboles. Esta variación que se presenta en las poblaciones es debida a factores genéticos y ambientales, por lo que es necesario encontrar una estrategia de medición de estos niveles y patrones de variación, considerando que no siempre es posible discernir si la variación es atribuible a uno u otro factor (Furnier, 1997). Describir la variación que se encuentra entre individuos de un rodal es extremadamente importante, pues así, se puede evaluar la variabilidad a nivel genético (Viveros Colorado, 2000).

Otro factor que debe considerarse es la variabilidad entre temporadas reproductivas. El conocimiento de estas características podría ser favorable para su manejo y conservación. Trabajos previos sugieren que la producción de frutos y semillas, así como su calidad fisiológica puede ser muy variable en las distintas temporadas, y que dicho fenómeno podría ser disparado por condiciones ambientales cambiantes, o por variaciones en la disponibilidad de recursos para la reproducción (Ferrerías *et al.*, 2014). Tapia *et al.* (2012) observaron que semillas de *Prosopis chilensis* presentaron valores de germinación variables en diferentes años de cosecha. Asimismo, Alzugaray *et al.* (2007b) informaron diferencias de PG en semillas de *Schinopsis balansae* y *Aspidosperma quebracho-blanco* al analizar muestras de diferentes años.

La variabilidad de la germinación de la especie en estudio no es conocida y tampoco se han encontrado antecedentes de variabilidad entre árboles y/o entre poblaciones dentro del género *Ruprechtia*.

En virtud de lo expuesto los objetivos de este capítulo son:

- Determinar los requerimientos térmicos, lumínicos y la duración del ensayo de germinación de aquenios con sépalos, aquenios sin sépalos y semillas.
- Establecer relaciones entre los resultados de la germinación con los caracteres morfo-anatómicos del fruto y la semilla.
- Tipificar la especie *Ruprechtia apétala* según su germinación y caracterizar plántulas normales y anormales.
- Conocer la variabilidad del poder germinativo entre árboles de una misma población durante dos años consecutivos de cosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la determinación de los requerimientos térmicos y lumínicos del ensayo de germinación, se recolectaron unidades de dispersión de *R. apetala* directamente de forma manual, de un árbol ubicado en Luyaba - Valle de Traslasierra (Prov.de Córdoba) (Lat. 32° 20'S- Long. 65° 30'O - Altitud: 688 m s.n.m.; temperatura media anual 17.1°C; precipitación anual: 613 mm) en el mes de diciembre del año 2013. Se tomó material de un solo árbol a los efectos de disminuir la variabilidad observada entre árboles, en ensayos preliminares. El árbol seleccionado presentaba un estado sanitario adecuado y gran cantidad de frutos.

Para establecer la variabilidad entre árboles de esta población y evaluar si hubo diferencias entre años de cosecha, se recolectaron unidades de dispersión de 4 árboles por separado (georeferenciados) a una distancia de separación superior a 50 metros entre ellos, en el mes de diciembre de los años 2013 y 2014. Los frutos se secaron al aire y se conservaron en bolsas de papel a temperatura ambiente.

Determinación de los requerimientos térmicos y lumínicos para la germinación

Para los ensayos de germinación, se sembraron 4 repeticiones de 25 unidades de cada una de las siguientes estructuras: aquenios con sépalos (ACS), aquenios sin sépalos (ASS) y semillas desnudas (SD). Los sépalos y las estructuras carpelares para los tratamientos ASS y SD respectivamente, fueron removidos manualmente y con la ayuda de pinzas histológicas. Cabe destacar que la remoción de tales estructuras resultó muy difícil, debido a la proximidad entre las paredes del pericarpo y la semilla.

La siembra se realizó entre papel, se utilizó papel Valot humedecido con agua destilada y se armaron rollos. Previo a la siembra, el material se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, durante 5 minutos y a continuación se enjuagó 3 veces con agua destilada. Los rollos se ubicaron dentro de bolsas de plástico para mantener la humedad y se acondicionaron en cámaras de germinación reguladas a temperatura

constante de 25 °C y alternante de 20<=>30°C, combinadas con oscuridad permanente y fotoperíodo de 16 h de oscuridad y 8 h de luz respectivamente. La oscuridad permanente se simuló cubriendo los rollos con papel de aluminio, que se dispusieron en doble bolsa de polietileno negro.

A través de observaciones realizadas cada dos días, durante 35 días, se determinó una curva de germinación en función del tiempo donde se consideró como porcentaje de germinación(PG)al porcentaje de plántulas normales (ISTA, 2014a).

Tipificación de *Ruprechtia apétala* según su germinación y caracterización de plántulas normales y anormales

La tipificación de la especie *R. apétala*, así como la caracterización de las plántulas normales y anormales se llevaron a cabo mediante el seguimiento del proceso germinativo a campo y en condiciones de laboratorio, tomando criterios generales establecidos en ISTA (2013, 2014a). Se realizó la observación, descripción y fotografiado de los cambios morfológicos más relevantes de la germinación de aquenios sin sépalos. La especie *R. apétala* no está incluida en las Reglas ISTA (2014a), ni en el *Handbook on Seedling Evaluation* (ISTA, 2013), es por ello que, para su tipificación, se describió si bajo condiciones controladas las plántulas desarrolladas eran normales o no. Se examinaron las estructuras esenciales de las plántulas formadas en el período del ensayo.

El desarrollo observado en las plántulas, permitió agrupar esta especie con aquellas representativas que se tomaron como referencia, cuyas plántulas muestran un desarrollo morfológico similar. Para las definiciones de plántula normal, plántula anormal y sus correspondientes categorías se trabajó con ISTA (2013, 2014a). Es de resaltar que al evaluar las plántulas es necesario aplicar la "regla del 50%" sobre los cotiledones y el primer par de hojas. De esta manera, las plántulas serán consideradas normales, cuando la mitad o más del tejido de los cotiledones es funcional, y serán anormales cuando más de la mitad de los tejidos estén ausentes, necróticos, decolorados o podridos.

ISTA define una plántula normal como aquella que muestra el potencial para continuar su desarrollo a planta normal cuando crece en un suelo de buena calidad y bajo condiciones de humedad, temperatura y luz favorables. De acuerdo a ello, se establecieron las categorías sugeridas por ISTA (2014):

a) “Plántulas intactas con todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas en proporción y sanidad.”

b) “Plántulas con ligeros defectos en sus estructuras esenciales, pero con un desarrollo equilibrado, comparable a otras plántulas normales intactas del mismo ensayo.”

c) “Plántulas con infección secundaria afectadas por hongos o bacterias de cualquier otra fuente ajena a la semilla.”

Así mismo, las plántulas anormales se definen como aquellas que no muestran un potencial para desarrollarse en plantas normales cuando crecen en un suelo de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. De acuerdo a ello, se establecieron las categorías sugeridas por ISTA (2014):

a) “Plántulas dañadas: en las que falta alguna estructura esencial o se encuentra dañada irreparablemente, donde no puede esperarse un desarrollo normal.”

b) “Plántulas deformadas o desbalanceadas: con un desarrollo débil, desbalances fisiológicos o con alguna de las estructuras esenciales deformadas o fuera de proporción.”

c) “Plántulas podridas y/o enfermas: donde alguna de las estructuras esenciales se encuentra dañada o débil como resultado de una infección primaria.”

Determinación de la duración del ensayo de germinación

Se determinó el primer conteo y el conteo final mediante el seguimiento del ensayo de germinación de aquenios con sépalos, a 25 °C con fotoperíodo de 16 h de oscuridad y 8 h de luz. El ensayo se mantuvo en cámara y se dio por terminado cuando se estabilizó la curva de germinación, dicho tiempo se atribuyó al *Conteo final*. Para la determinación del *Primer conteo* se aplicaron los enunciados de Willan (1991), Allen (1958) y Catalán (1992).

Se analizó la influencia de los caracteres morfo-anatómicos del fruto y la semilla en el proceso de germinación.

Variabilidad del poder germinativo entre árboles de una misma población y entre dos años de cosecha

El ensayo de germinación para determinar la variabilidad del poder germinativo entre árboles se realizó empleando aquenios con sépalos, ya que, por un lado, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las estructuras en el ensayo de germinación, y por otro, la simplicidad en la obtención de la muestra a analizar. La metodología fue igual a la empleada en la determinación de requerimientos térmicos y lumínicos pero solo se evaluó la germinación a 25 °C con fotoperiodo de 16 h de oscuridad y 8 h de luz. La razón de utilizar 25 °C se debe a que no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas aplicadas en el primer objetivo cuando se trabajó con aquenios con sépalos.

ANÁLISIS Y DISEÑO ESTADÍSTICO

Para determinar las condiciones óptimas en relación a los factores luz, temperatura y estructura en el ensayo de germinación, se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial, contemplando los factores antes mencionados.

Mediante análisis de la varianza se estableció la existencia de diferencias de germinación entre los árboles de la misma población y entre diferentes años de cosecha. Los datos se analizaron utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013). En todos los casos el nivel de significación se fijó en 0,05 y las comparaciones entre las medias se realizaron con la prueba LSD de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de los requerimientos térmicos y lumínicos para la germinación de aquenios con sépalos, aquenios sin sépalos y semillas

La Tabla. 3.1 muestra el Porcentaje de germinación de aquenios con sépalos, aquenios sin sépalos y semillas de *Ruprechtia apetala* en distintas condiciones térmicas y lumínicas.

Tabla 3.1. Porcentaje de germinación (% plántulas normales) de aquenios con sépalos (ACS), aquenios sin sépalos (ASS) y semillas (SD) de *Ruprechtia apetala* en distintas condiciones térmicas y lumínicas, a los 35 días de ensayo

	PLANTULAS NORMALES (%)					
	ACS		ASS		SD	
	25°C	20°C ⇄ 30°C	25°C	20°C ⇄ 30°C	25°C	20°C ⇄ 30°C
Fotoperíodo L/O (8/16h)	84 b	84b	81ab	84b	69ab	77 ab
Oscuridad permanente	78 ab	79ab	73 ab	79ab	65a	75ab

Test: LSD Fisher $\alpha = 0,05$ - Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). L: Luz; O: Oscuridad

La aplicación de las temperaturas alternante (20 ⇄ 30 °C) y constante (25 °C), no presentaron diferencias estadísticamente significativas del PG en ninguna de las estructuras empleadas. Los valores de PG son similares a los obtenidos por Funes *et al.* (2009) y Pais Bosch *et al.* (2012) en la misma especie y con temperaturas alternantes.

La evaluación a temperaturas alternantes responde a lo prescripto por ISTA (2014a) para otras Poligonáceas y a lo señalado por Barcelló Coll *et al.* (1998) en *Rumex crispus*. En relación a otras especies de esta familia, Alzugaray *et al.* (2007b) obtuvieron un PG de 63% en semillas de *Ruprechtia laxiflora* al realizar el ensayo a temperatura constante, mientras que Soriano *et al.* (2011) en el ensayo con semillas de *Ruprechtia fusca* obtuvo un PG de 72% al emplear temperaturas de 25 °C y 30 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de germinación del presente trabajo. Respecto a otras especies que

crecen en la misma zona geográfica, Aráoz *et al.* (2004) evaluaron la germinación de *Ziziphuz mistol* a temperaturas alternantes y constantes (20↔30 y 25 °C) sin obtener diferencias significativas entre ellas. Por su parte Alzugaray *et al.* (2007b) informaron un PG de 51% para semillas de *Aspidosperma quebracho blanco* al realizar el ensayo a temperatura constante (25 °C).

En relación a los ensayos realizados con fotoperiodo y con oscuridad permanente, sólo se observaron diferencias significativas en el PG de las semillas a 25 °C respecto al resto de las estructuras (Tabla 3.1). Los demás resultados no difieren mayormente de los encontrados por Funes *et al.* (2009) y Pais Bosch *et al.* (2012) en la misma especie en ambas condiciones lumínicas; y por D'Agostino *et al.* (2012) para enredaderas que crecen en la misma área geográfica. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de luz es un factor influyente sobre la germinación de semillas de otras especies. Barcelló Coll *et al.* (1998) indican que es necesaria la presencia de luz en *Rumex Crispus*, sin embargo, Aular *et al.* (1994) indican que la germinación de *Passiflora edulis* es inhibida al emplear fotoperiodo.

La remoción de las estructuras que rodean a la semilla para eliminar una supuesta dormición física se fundamenta en los antecedentes encontrados. Así, en *R. apetala*, Volkman y Suarez (2009) informaron que el proceso de germinación es lento, que según Baskin y Baskin (2014) el retraso puede ser la causa de dormición y, según Doria (2010) lo define como dormición impuesta por las cubiertas. Durante la realización del ensayo, pudo observarse que la emisión de radícula y formación de plántulas normales fueron más rápidas al emplear semillas desnudas (Fig. 3.1).

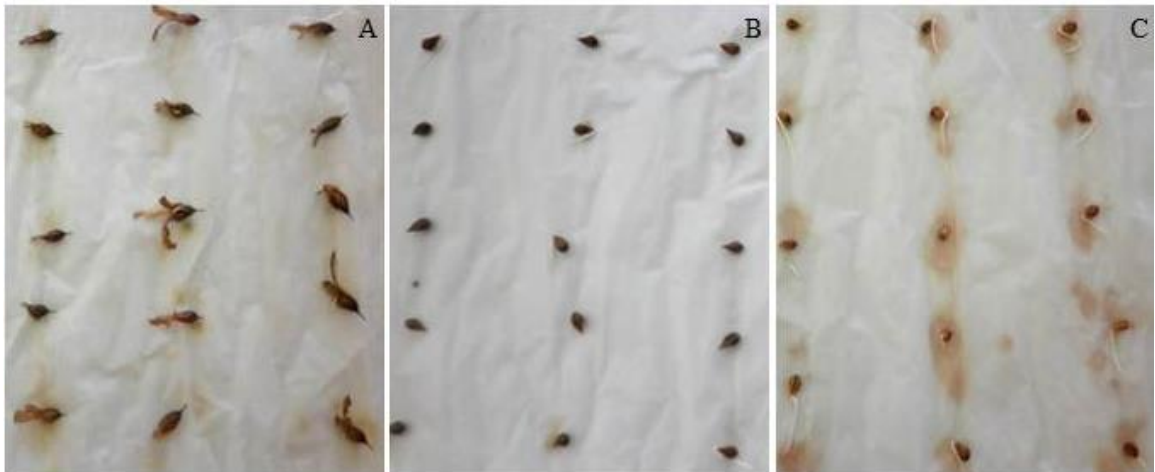


Fig. 3.1. Vista del ensayo de germinación a los 3 días desde la siembra de las diferentes estructuras. A. Aquenios con sépalos. B. Aquenios sin sépalos. C. Semillas desnudas.

La Fig. 3.2 muestra la evolución del proceso germinativo (PG) de ACS, ASS y SD en distintas condiciones térmicas. Las semillas a 25 °C fueron las primeras en germinar y en obtener un PG superior al 40 % a los 5 días y alrededor del 65 % al 8° día, mientras que a temperatura alternante no germinaron durante los primeros 5 días de ensayo y alcanzaron un valor de PG cercano al 80 % al 8° día. Al 5° día, los aquenios sin sépalos no germinaron en ninguna condición de temperatura, mientras que al 8° día el PG fue de 55 % a temperatura constante y 13 % a temperatura alternante. Los aquenios con sépalos tampoco germinaron durante los primeros 5 días de ensayo, y al 8° día el PG fue de 67 % a 25° C y solo 3% con 20<=>30 °C. Es de resaltar que SD, ASS y ACS siguieron igual patrón de germinación.

Si bien las SD fueron las primeras en producir plántulas normales en ambas temperaturas, el PG final presentó valores inferiores a ACS y ASS. Por ende, a la hora de seleccionar con qué estructura trabajar en el futuro, los ACS serían los más adecuados debido a que presentaron mayores valores de PG, por la practicidad de su empleo y que, además, en esta estructura la germinación solo se retrasa 2 días cuando la temperatura es de 25 °C y 4 días a los 20<=>30 °C. De acuerdo a lo observado, estos resultados coinciden con diversos autores (Funes *et al.*, 2009; Volkmann y Suarez, 2009; Pais Bosch *et al.*, 2012; Joseau *et al.*, 2013) que trabajaron con *R. apetala* sin aplicar tratamientos

pregerminativos, al igual que Soriano *et al.* (2011) en su trabajo de germinación de *R. fusca*.

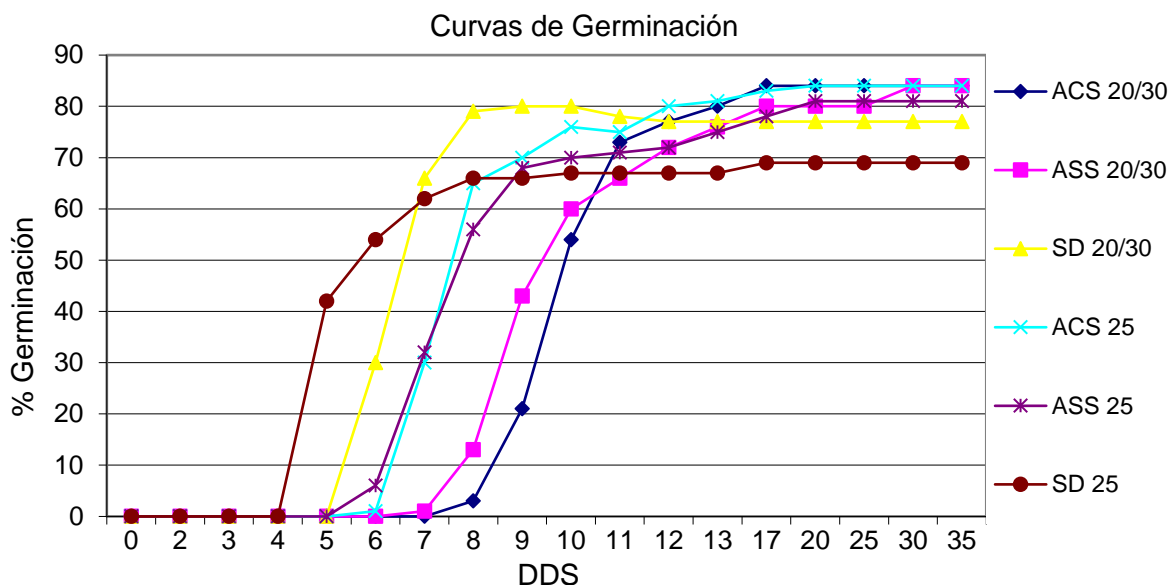


Fig. 3.2. Germinación de ACS, ASS y SD en diferentes condiciones térmicas (DDS: días desde la siembra)

Al relacionar las características morfo-anatómicas del fruto, la semilla y la zona de entrada de agua en la imbibición con los datos de los ensayos de germinación, se observa que las semillas desnudas germinaron antes que los aquenios, los cuales presentaron una germinación escalonada. Estos resultados se pueden explicar si se considera que la extracción del pericarpo de los aquenios disminuye las estructuras que el agua debe atravesar para llegar al episperma, lo que se traduce en la reducción del tiempo para la germinación en el tratamiento con semillas, en contraste con los resultados del tratamiento con aquenios.

Por otra parte, según Metzger (1992) la remoción de partes del pericarpo de *Polygonum* no promovió la germinación de aquenios, excepto cuando se removió la porción más cercana a la radícula, sugiriendo que las estructuras que cubren el embrión no previenen la germinación por restricción del intercambio de agua o gases, sino por una restricción mecánica.

Tipificación de la especie *Ruprechtia apetala* según su germinación y caracterización de plántulas normales y anormales

La germinación de *R. apetala* bajo condiciones naturales “suelo” (Fig. 3.3) incluye a *R. apetala* en el Tipo E (ISTA, 2013): “Plántulas dicotiledóneas con germinación epígea. La parte que emerge a la luz es el hipocótilo con los dos cotiledones unidos, que se transforman en verdes. En este grupo, el embrión bien diferenciado consiste en un eje embrional con dos puntos de crecimiento, radícula y plúmula, con los cotiledones unidos al eje embrional.” El género representativo de este Tipo es *Brassica*.

Se observó que el hipocótilo se elongó elevando la parte aérea. Para alcanzar la superficie formó un arco y luego se enderezó. Los cotiledones se expandieron, desprendiendo la cubierta seminal. Se pudo apreciar la coloración rojiza del hipocótilo y los cotiledones, que se volvieron verdes en el desarrollo (Fig. 3.3). Estas observaciones coinciden con lo descrito en el manual de evaluación de plántulas (ISTA, 2013), donde se indica que al principio de la germinación, el “Tipo E” se caracteriza por que “la raíz principal perfora la cubierta seminal, rápidamente se elonga y se establece en el suelo.” A excepción de la coloración rojiza característica de esta especie que no se encuentra informada en ISTA. Se observó la elongación del epicótilo corto y la aparición del primer par de hojas verdaderas alrededor de los 15 días desde la siembra.



Fig. 3.3. Evolución de la germinación de *R. apetala* en suelo. A y B: elongación del hipocótilo sobre la superficie a los 7 días desde la siembra; C: Apertura y cambio de color de los cotiledones, desarrollo del primer par de hojas verdaderas (15 días desde la siembra); D: Elongación de epicótilo y desarrollo de plántulas completas (20 días).

El seguimiento de la germinación en condiciones de laboratorio (Fig. 3.4) permitió encuadrar a *R. apetala* dentro del Grupo **B.2.1.1.1** que presenta las siguientes características (ISTA, 2013):

Grupo: **B. Árboles y Arbustos**

Clase Sistemática: **2. Dicotiledoneas**

Tipo de germinación: **1. Epígea**

Características del sistema apical: **1. Sin alargamiento del epicótilo**

Desarrollo del sistema radicular y su influencia con la evaluación de plántulas: **1. Raíz primaria esencial**

Dentro del Grupo **B 2.1.1.1** están incluidos los siguientes géneros: *Acacia*, *Crataegus*, *Eucalyptus*, *Gleditsia*, *Nothofagus*, *Prunus*, *Robinia*, entre otros, los cuales durante el periodo prescrito para el ensayo presentan características morfológicas similares a la especie en estudio.



Fig. 3.4. Semillas germinadas de *R. apetalata* en condiciones de laboratorio. A y B: Emisión de radícula y cotiledones; C: Semillas en diferentes niveles de desarrollo hasta la formación de la plántula completa.

Caracterización de plántulas

✓ Plántulas normales:

En la Fig. 3.5 se observan plántulas normales de *R. apetala* de diferentes estadios de desarrollo de radícula e hipocótilo obtenidas en el ensayo de germinación.

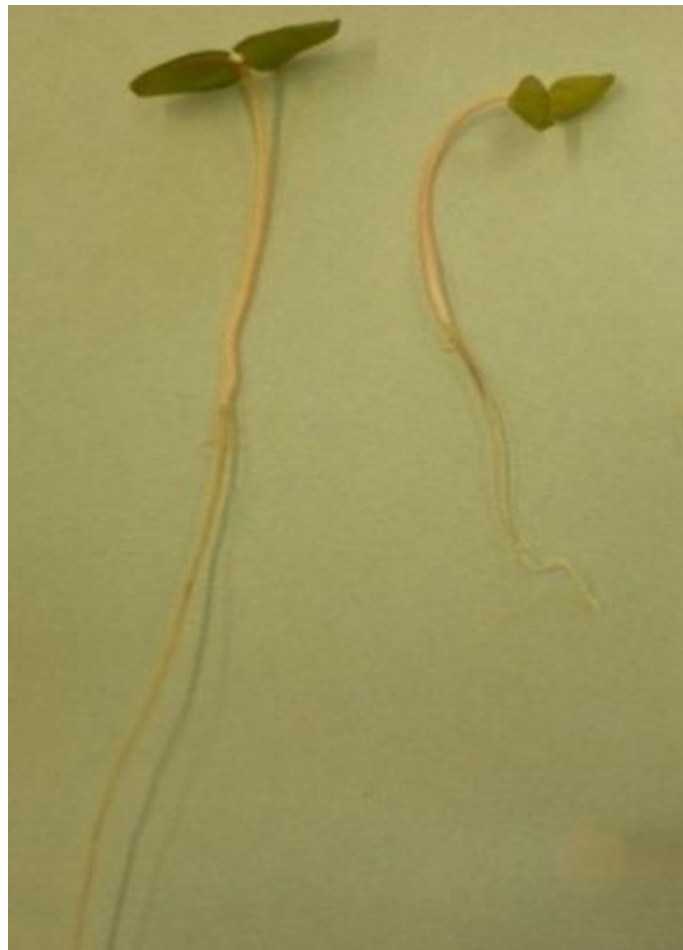


Fig. 3.5. Plántulas normales con diferencias en longitud de hipocótilo y radícula.

La Fig. 3.6 muestra plántulas normales obtenidas durante el ensayo de germinación. Cabe destacar la diferencia en tamaños de hipocótilo y radícula (Fig. 3.6 A) así como algunos de los defectos leves encontrados (Fig. 3.6 B y C). En una de las plántulas se observó que el extremo de la raíz quedó atrapado en el fruto (Fig. 3.6 D) y sería considerada según las reglas ISTA (2013) como plántula anormal, sin embargo, esto no

representó un impedimento para lograr una plántula con un buen desarrollo de sus estructuras esenciales. Es muy factible que la falta del desprendimiento del fruto podría resultar de alguna condición del ensayo, como falta de lugar o presión del papel, por ende, se tomó el criterio de considerarla plántula normal.



Fig. 3.6. Plántulas normales. A: intactas con hipocótilo y raíz de diferente longitud; B: ligero defecto: daño en los cotiledones en una proporción inferior al 50 %; C: ligero defecto: infección secundaria en raíz principal; D: extremo de la raíz atrapado en el fruto.

✓ **Plántulas anormales:**

La Fig. 3.7 muestra las anomalías encontradas en las plántulas durante el ensayo de germinación.



Fig. 3.7. Plántulas anormales de *R. apetala*. A: raíz principal con retardo en el crecimiento; B: infección primaria y retardo en el crecimiento de raíz; C: cotiledones retenidos en el fruto e hipocótilo en forma de lazo cerrado; D: plántula totalmente desarrollada sin desprendimiento del fruto; E: ambos cotiledones dañados en una proporción mayor al 50 %; F: plántulas con infección primaria en raíz; G: vista en lupa binocular de infección primaria de raíz.

Determinación de la duración del ensayo de germinación

Mediante el seguimiento del ensayo de germinación, se registraron las plántulas normales obtenidas de ACS observadas en el tiempo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Número de plántulas normales desarrolladas durante el ensayo de germinación de *Ruprechtia apetala* para determinar el día del primer conteo

DDS	Número de Plántulas normales por repetición				Número de plántulas normales		Germinación diaria Acumulada (%)
	A	B	C	D	TOTAL DIARIO	TOTAL ACUMULADO	
1-5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	1	1	1
8	12	12	18	20	62	63	63
10	6	3	0	2	11	74	74
12	1	2	0	0	3	77	77
14	1	0	1	0	2	79	79
17	1	1	1	0	3	82	82
19	0	0	1	0	1	83	83
21-35	0	0	1	0	1	84	84
Sumatoria de cada repetición	21	19	22	22	84		

Se estableció como el primer conteo el día 8 DDS ya que es el día que se obtuvo el número máximo de plántulas normales (no acumuladas), con 62 plántulas normales en concordancia con Willan (1991). Igualmente, al aplicar el criterio descrito por Allen (1958) y Catalán (1992), que consideran que el primer conteo debe realizarse cuando se detecta el 50% y los 2/3 (66%) del porcentaje de germinación final respectivamente, también coincidieron como día del primer conteo al octavo día de ensayo. Estos resultados concordaron con los obtenidos en *Ziziphus mistol* (Aráoz, 2005) quien determinó el día 8 para el primer conteo.

En relación a la finalización del ensayo, se observó que la germinación era escalonada por lo que los controles se realizaron durante 35 días. Sin embargo, la evaluación de la curva de germinación de ACS a 25 °C se estabilizó a los 17 días desde la

siembra, por lo que se elige este día para la realización del conteo final. Estos resultados se encuentran en el rango de los valores observados por Joseau *et al.* (2013) para *R. apetala*.

Variabilidad del poder germinativo entre árboles de una misma población

La Fig. 3.8 muestra los resultados de germinación en términos del primer conteo y conteo final, obtenidos con frutos cosechados de cuatro árboles (por separado) en dos fechas de cosecha diferentes. En términos generales, puede observarse que la germinación entre los individuos analizados fue muy variable y también se observaron diferencias entre los años de cosecha. En todos los individuos se obtuvieron mayores PG en el año 2013, sin embargo, el árbol 3 presentó una baja germinación el primer año de cosecha (PG=7%) y no germinaron los aquenios con sépalos ensayados en el segundo año (2014). La variabilidad observada en la germinación es muy común en especies que se reproducen por semillas (Evans y Cabin, 1995) y especialmente en especies no domesticadas, que por lo general presentan floración y germinación escalonada.

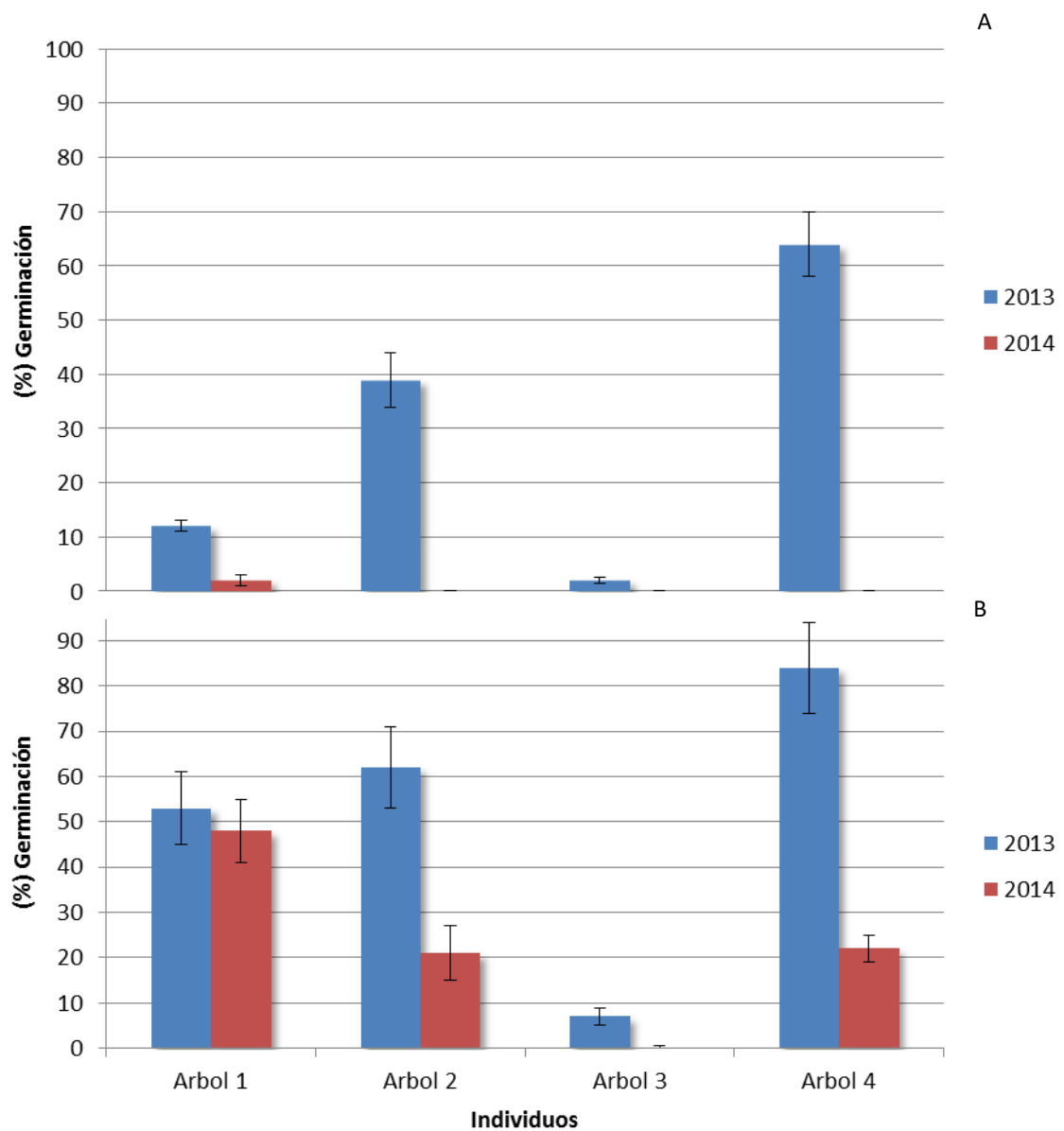


Fig. 3.8. Porcentajes de germinación (y desvíos) de diferentes individuos de la población de Luyaba en dos años de cosecha. A: Primer conteo (día 8); B: Conteo final (día 17).

Como señala Zobel y Talbert (1988), son numerosos los niveles en los que puede expresarse la variabilidad. En este trabajo, se encontró que los individuos dentro de la población se diferenciaron significativamente ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de germinación. Esto permite confirmar la presencia de variabilidad en el rodal semillero, que posteriormente podría llevar a un análisis más minucioso a nivel genético (Viveros Colorado, 2000).

La variación de los porcentajes y las velocidades de germinación entre individuos contribuye a reducir el riesgo de que todos sean sometidos a condiciones adversas simultáneamente durante su desarrollo, ayuda a evitar o disminuir la competencia por recursos entre hermanos, aumenta la distribución de edades de las semillas en el banco de semillas, y así se eleva la variación genética dentro de una población (Evans y Cabin 1995; Shütz y Rave, 2003).

Las poblaciones naturales de plantas comúnmente presentan años de menor o mayor producción de semillas. Esto se debe, entre otras razones, a factores externos como condiciones climáticas desfavorables para la reproducción o abundancia anormal de parásitos o depredadores de las partes reproductivas de las plantas (Vázquez Yanes *et al.*, 1997). En relación a esto, en la población analizada de *R. apetala* se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de germinación de unidades de dispersión recolectadas en años diferentes de cosecha (2013 y 2014). Esto puede atribuirse a las diferencias climáticas ya que el año 2013 fue relativamente más seco (544 mm de precipitaciones anuales) en comparación al año 2014 (846 mm de precipitaciones anuales), con abundantes precipitaciones en la temporada estival. Esto concuerda con lo descrito por Alzugaray y Vesprini (2012) para la región chaqueña húmeda, donde las condiciones ambientales suelen ser cambiantes en los distintos años, alternando intensas sequías con períodos sumamente lluviosos, durante el período de maduración de algunos frutos, afectando su calidad.

CONCLUSIONES

- ✓ Los requerimientos y condiciones para el ensayo de germinación de *Ruprechtia apetala* son:
 - Las temperaturas de 25 °C y 20 °C \Leftrightarrow 30°C son indistintas para llevar a cabo este proceso.
 - La germinación es independiente de la condición lumínica empleada.
 - Estructura: Aquenios con sépalos es la estructura más adecuada para llevar a cabo el ensayo de germinación.
- ✓ En relación al proceso germinativo, las características morfo-anatómicas del aquenio son responsables de la germinación escalonada.
- ✓ La germinación de *Ruprechtia apetala* en condiciones naturales incluye a las plántulas en el Tipo E, y en condiciones de laboratorio en el Grupo B. 2.1.1.1.
- ✓ La duración del ensayo se establece como día 8 desde la siembra para realizar el primer conteo y el día 17 para el conteo final.
- ✓ Existe variación en los porcentajes de germinación entre los individuos de una misma población y entre los años de cosecha.

CALIDAD SANITARIA DE SEMILLAS DE *Ruprechtia apétala* WEDD.

INTRODUCCIÓN

Entre los atributos de calidad de las semillas, la calidad sanitaria está determinada por la presencia de diversos organismos perjudiciales tales como insectos, ácaros, moluscos, nematodos y microorganismos que generan enfermedades infecciosas, como hongos, bacterias y virus (Mazzuferi y Conles, 2013).

Crawley (2000) en estudios sobre el grado de consumo y mortalidad de semillas causados por la predación, remarcó la importancia de distinguir los procesos de predación pre-dispersión y post-dispersión. La mayoría de las especies involucradas en la predación pre-dispersión son predadores pequeños, sedentarios, especialistas, principalmente insectos pertenecientes a los órdenes Díptera, Lepidóptera, Coleóptera e Hymenóptera (Santos *et al.*, 1998; Murga Orillo *et al.*, 2015). En contraste, los predadores post-dispersión son de mayor tamaño, con más movilidad y generalmente herbívoros, tales como roedores y pájaros granívoros. Sin embargo, en las zonas desérticas y de escasos recursos nutricionales, las hormigas son importantes predadores post- dispersión (Crawley, 2000).

Cabe destacar el grado de especialización de los insectos seminófagos, tanto por aspectos relacionados con la dieta (alta calidad nutricional de las semillas, donde el contenido de proteínas es mayor que en cualquier otra parte de la planta) como por diversas características en sus biología y comportamientos como una forma de adaptación a la disponibilidad de semillas por un período relativamente corto y a la variabilidad en la producción (vecería) (Crawley, 2000).

Entre las variables climáticas, la temperatura, humedad relativa y precipitaciones, inciden en la producción de semillas, condicionando la actividad de los seminófagos (Arroyo-Rodriguez y Mandujano, 2006).

En el orden Coleóptera toma particular importancia la familia *Bruchidae* que involucra especies seminófagas como se refleja en los trabajos realizados en *Prosopis* spp. por Mazzuferi (2000) y por Diodato y Carabajal de Belluomini (2006). Otra familia de coleópteros relacionada con la predación de semillas y frutos es *Anobiidae*. Rojas-Rousse *et al.* (2009) determinaron la presencia de *Anobiidae* (sección *Tricorynus*) infestando semillas y vainas de *Acacia caven* (Molina) Molina. Por otra parte, Oppert *et al.* (2002) describen la infestación de anobidos en semillas, granos y alimentos almacenados.

El deterioro causado a las semillas por insectos, depende del grado de daño producido al embrión y a los cotiledones (Or y Ward, 2003; Mazzuferi y Conles, 2013). En *Prosopis*, Pallares (2007) observó que los estados juveniles de los insectos que infestan las semillas consumen proporciones importantes de los cotiledones, por lo tanto el efecto sobre la viabilidad es muy grande. En *Mimosa aculeaticarpa* Benth, Pavón *et al.* (2011) establecieron que la infestación por brúquidos disminuyó la germinación en un 90-100%, debido al daño provocado al embrión y al alto consumo de tejidos internos de las semillas.

En *Ruprechtia apetala* no se han encontrado antecedentes sobre los agentes causales que pueden afectar la calidad sanitaria de las semillas. En estudios preliminares sobre la estructura del fruto, la presencia de orificios de emergencia de insectos conlleva al planteamiento de los siguientes objetivos:

- Identificar las especies de insectos que infestan las semillas.
- Estimar el porcentaje de infestación.
- Relacionar la infestación de los insectos con el daño a las estructuras seminales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las unidades de dispersión de *Ruprechtia apetala* se colectaron de árboles de tres localidades de la provincia de Córdoba, Argentina, en el mes de diciembre del año 2013 y se conformaron tres *poles* de frutos: El primero, proveniente de la localidad de **Luyaba** - Valle de Traslasierra (Lat. 32° 20'S- Long. 65° 30'O - Altitud: 688 m s.n.m. Temp. media anual: 17,1°C. Precipitaciones anuales: 613 mm); el segundo de la localidad de **La Calera** (Lat. 31° 20'S- Long. oeste: 64° 20'O - Altitud: 470 m s.n.m. Temp. media anual: 17,3°C. Precipitaciones anuales: 695 mm) y el tercero de **Capilla del Monte** (Lat. 31° 52'S - Long. 64° 33'O - Altitud: 984 m s.n.m. Temp. media anual: 14,7°C. Precipitaciones anuales: 641 mm). Los frutos fueron secados al aire y conservados en bolsas de papel a temperatura ambiente.

Identificación de las especies de insectos que infestan las semillas

Para la obtención de los insectos adultos se procedió a colocar los aquenios sin sépalos, en recipientes que fueron ubicados en la cámara de cría del Laboratorio de Zoología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y $\pm 65\%$ de humedad relativa. El material se observó cada 48 horas. La identificación fue realizada por la Ing. Agr. Mgter. Vilma Mazzuferi, empleando claves taxonómicas y por comparación con material de referencia del Museo de La Plata y Bernardino Rivadavia de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

Estimación de los porcentajes de infestación

Para evaluar la incidencia se tomaron tres repeticiones de 100 aquenios cada una, de cada *pool* que se analizó por separado. Los aquenios fueron observados bajo lupa binocular y separados en sanos e infestados (aquellos que mostraban orificio de emergencia de insectos adultos). Se estableció el porcentaje de frutos infestados en cada población.

Relación de la infestación de los insectos con el daño a las estructuras seminales

Con el fin de evaluar la viabilidad de los aquenios infestados, se realizó un ensayo de germinación con aquellos que presentaban orificio de salida. Se emplearon tres repeticiones de 20 aquenios cada una, de cada *pool* por separado. El ensayo se realizó entre papel (rollos) humedecido con agua destilada, previa desinfección de los aquenios con hipoclorito de sodio 5 % durante 5 min. Los rollos fueron mantenidos en cámaras de germinación reguladas a 25 °C constante con fotoperiodo de 16 h de oscuridad y 8 h de luz durante 17 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las especies de insectos que infestan las semillas

La identificación de los insectos emergidos (Fig. 4.1) permitió establecer que pertenecen a la familia *Anobiidae* y por sus características morfológicas se encuentran en la subfamilia *Dorcatominae*, sección *Tricorynus*, de acuerdo a la clasificación de Español (1979). Este autor señala que *Tricorynus* fue aislada por White (1965) como una subfamilia. Por otra parte, Ceruti *et al.* (2010) mencionan que los miembros del género *Tricorynus* fueron previamente incluidos en el género *Catorama* Guerin-Meneville en 1850. De acuerdo a White (1965) el nombre *Catorama* fue usado por más de 100 años, sin embargo fue sinonimizado con la antigua denominación *Tricorynus* que le había asignado Watherhouse en 1849.

Ceruti *et al.* (2010) señalan la falta de antecedentes respecto al comportamiento y asociaciones bióticas entre las especies de *Tricorynus*.



Fig. 4.1. Insecto adulto emergido de los frutos de *R. apetala*. A: Vista lateral; B: Cara dorsal; C: Cara ventral.

Los insectos de la sección *Tricorynus* son mencionados en diversas publicaciones por causar daños en libros, cueros, productos almacenados y muebles (White, 1974; Allemand *et al.*, 2008). Rojas-Rousseet *al.* (2009) observaron que anobidos de la sección *Tricorynus* permanecían un largo tiempo en vainas de *A. caven* destruyendo por completo los mesocarpos.

Estimación de los porcentajes de infestación

En la Fig. 4.2 puede observarse la diferencia entre un fruto aparentemente sano, sin presencia de orificio de emergencia de insecto adulto (A) y otro con presencia de orificio de salida de insectos adultos (B).



Fig. 4.2. Aquenios de *R. apetala*. A: Aparentemente sanos; B: Con orificio de salida.

La Fig. 4.3 muestra los porcentajes de infestación en frutos de *R. apetala* en las localidades de Capilla del Monte, La Calera y Luyaba.

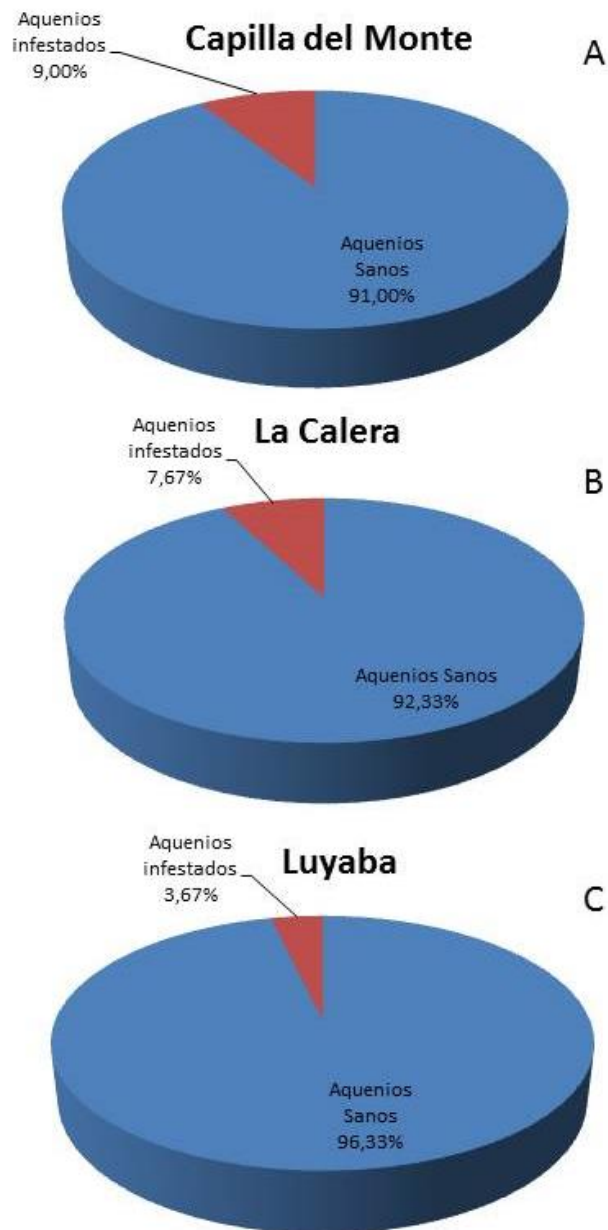


Fig. 4.3. Infestación (%) en acuenios de *R. apetala*. A: Localidad de Capilla del Monte; B: Localidad de La Calera; C: Localidad de Luyaba.

Los niveles de infestación obtenidos fueron 9,0%, 7,7%, 3,7% correspondientes a Capilla del Monte, La Calera y Luyaba, respectivamente. Diferentes razones podrían ocasionar estas variaciones en los porcentajes de infestación de las diferentes localidades, entre ellas, las condiciones climáticas y de sitio donde se encuentran los árboles.

Cuenca Castillo (2014) describió una relación entre los niveles de predación y la humedad relativa presente en fragmentos de bosque mesófilo. En épocas más húmedas la disponibilidad de semillas es mayor que en épocas de sequía, condicionando indirectamente esta variable climática la acción de los insectos. Sin embargo, las localidades analizadas no presentan condiciones climáticas tan diferentes en lo relativo a las temperaturas medias ni a las precipitaciones anuales, que justifiquen la diferencia en la incidencia de infestación.

La condición de sitio es otra de las causas que puede influir en el grado de infestación. Córdoba *et al.* (2000) señalan que árboles de *Prosopis aff. flexuosa* que crecen en una condición de sitio más empobrecida, en relación a suelo descubierto, porcentaje de gramíneas anuales, biomasa herbácea y densidad arbórea, son más propensos a la infestación de *Torneutes pallidipennis*.

Relación de la infestación de los insectos con el daño a las estructuras seminales

El ensayo de germinación realizado con frutos que presentaban orificio de salida de los insectos demostró que la infestación afectó negativamente el proceso de germinación, ya que en todos los pools analizados esta fue nula.

Si bien los porcentajes de infestación encontrados fueron relativamente bajos, los insectos al alimentarse del embrión y del endosperma amiláceo, causan efectos negativos sobre la reproducción de *R. apetala*, ya que limitan el suministro de las semillas y evitan la germinación. La Fig. 4.4 muestra el daño producido por los insectos en las estructuras seminales.

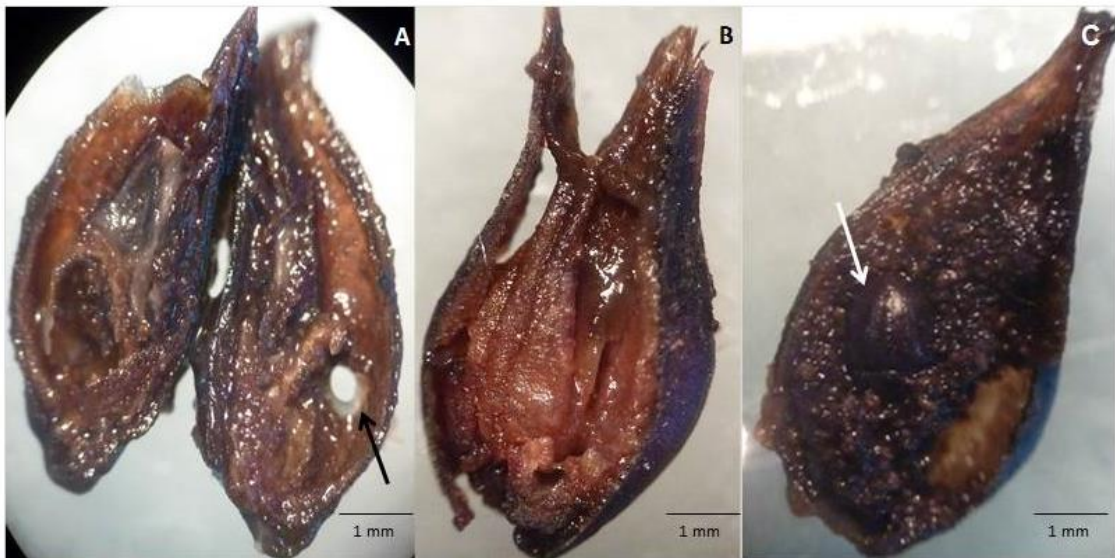


Fig. 4.4. Daños provocados por *Tricorynus* en las estructuras seminales. A: Interior de semilla dañado, la flecha indica el orificio de salida del insecto adulto; B: Semilla completamente comida, ausencia de embrión y endosperma; C: Insecto alojado dentro de la semilla (flecha).

Este impacto de los insectos seminófagos en semillas de plantas nativas también ha sido mencionado por otros autores en diversas especies vegetales. Harms y Dalling (2000) describieron que el ataque por brúquidos provocó que los endocarpos de *Attalea butyracea* (Mutis ex L.F.) Wess.Boer.no germinaran. Havely (1974) en un ensayo con semillas de *Acacia* spp. infestadas por brúquidos, observó que germinaron sólo entre un 1 y 6%, a diferencia de lo que ocurría con semillas sanas con porcentajes de germinación entre un 25 y 68%.

Pavón *et al.* (2011) describieron que un 27% de semillas de *Mimosa aculeaticarpa* var. *Biuncifera* (Benth.) Barneby infestadas por brúquidos no lograron germinar. Resultados similares fueron observados para el género *Prosopis*, donde las larvas de brúquidos consumen las estructuras seminales afectando marcadamente la viabilidad (Pallares, 2007; Mazzuferi y Conles, 2013).

CONCLUSIONES

- ✓ La incidencia de infestación de anóbidos es baja en semillas de *R. apetala*.
- ✓ El daño provocado por los insectos en las estructuras seminales impide la germinación.
- ✓ Este trabajo constituye la primera mención de insectos de la familia *Anobiidae*, subfamilia *Dorcatominae*, sección *Tricorynus*, como depredadores de semillas de *R. apetala*.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Abraham de Noir F. y Bravo S. 2014. Frutos de leñosas nativas de Argentina. 1^a ed. - Santiago del Estero. UNSE. 194 pp.
- Aguilar R. and Galetto L. 2004. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia* 138: 513–520.
- Aguilar R., Ashworth L, Galetto L. and Aizen M. A. 2006. Determinants of plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol. Lett.* 9: 968-980.
- Aizen M. 2007. Enfoques en el estudio de la reproducción sexual de las plantas en ambientes alterados: limitaciones y perspectivas. *Ecol. Austral.* 17 (1).
- Akcin T. A. and Akcin A. 2014. Achene micromorphology of seven taxa of achillea L. (Asteraceae) from Turkey. *Bangladesh J. Plant Taxon.* 21(1): 19-25
- Allemand R., De Laclos E., Büche B. and Ponel P. 2008. Anobiidae nouveaux ou méconnus de la faune de France (3^o note) (Coleoptera). *Bull. Soc. Entomol. France* 113: 397-402.
- Allen G. S. 1958. Factors affecting the viability and germination behavior of coniferous seed: Part 1: Cone and seed maturity, *Tsuga heterophylla* (Rafn.) Sarg. *Forestry chronicle* 34 (3): 266-276.
- Alzugaray C., Carnevale N., Salinas A., Moreno L. y Boggio J. 2007a. Calidad de semillas de árboles y arbustos autóctonos de la cuña boscosa santafesina. *Análisis de Semillas* 1: 99-104.
- Alzugaray C., Carnevale N. J., Salinas A. R. y Pioli R. 2007b. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl. y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 142-147.
- Alzugaray C. y Carnevale N. 2009. Libro de semillas de especies leñosas autóctonas. (Chaco Húmedo: cuña boscosa santafesina) Ministerio de Aguas, Servicios Públicos y Medio Ambiente. Santa Fe, Argentina. 112 pp.
- Alzugaray C. y Vesprini J. L. 2012. Fragmentación del bosque chaqueño santafesino y calidad de sámaras de *Schinopsis balansae* Engl. 25^o Reunión Argentina de Ecología, Luján.

- AOSA 1983. Association of Official Seed Analysts. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution N° 32, to the Handbook on Seed Testing. Clark B. E. Mc. Donald M. and Joo K. (eds). 93 pp.
- Arambarri A. M. y Bayón N. 1995. Polygonaceae - Aportes Botánicos de Salta Serie Flora del Valle de Lerma. Vol. 3:1-53.
- Aráoz S. D., Del Longo O. y Karlin O. 2004. Germinación de semillas de *Zizyphus mistol* Grisebach II. Respuestas a diferentes temperaturas y luz. *Multequina* 13: 45-50.
- Aráoz S. D. 2005. Selección de metodologías para la reproducción de *Zizyphus mistol* Grisebach por medio de fruto – semilla. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 81 pp.
- Aráoz S. D. y Del Longo O. 2007. Cómo determinar la duración del Ensayo de germinación? *Revista Análisis de Semillas*. Rosario-Argentina. Tomo 1. Vol. 3:61-63. N°3.
- Arroyo-Rodriguez V. and Mandujano S. 2006. The importance of tropical rain forest fragments to the conservation of plant species diversity in Los Tuxtlas, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15:4159-4179.
- Ashworth L. and Martí L. 2011. Forest fragmentation and seed germination of native plant species from the Chaco Serrano Forest, Argentina. *Biotropica* 43:496-503.
- Atlas de los Bosques Nativos Argentinos. 2003. Proyecto Bosques nativos y áreas protegidas. BIRF 4085 AR. Dirección de Bosques, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. CABA, Argentina.
- Aular J., Dámaso B. y Maciel N. 1994. Influencia de la luz, la profundidad de siembra y el almacenamiento sobre la germinación y emergencia de la parchita. *Agronomía Tropical* 46(1): 73-83.
- Barboza G., Cantero J., Núñez C. y Ariza Espinar L. 2006. Flora medicinal de la provinciade Córdoba (Argentina). Pteridófitas y antófitas silvestres o naturalizadas (1°Ed). Museo Botánico. Córdoba. 1252 pp.
- Barcelló Coll J., Nicolás Rodrogo G., Sabater García B. y Sánchez Tamés, R. 1998. Fisiología Vegetal. Barcelló Coll J., Nicolás Rodrogo G., Sabater García B. y Sánchez Tamés, R. (Eds). 8° Ed. Pirámide, Madrid, 566 pp.
- Baskin C. C. and Baskin J. M. 1998. Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic, San Diego, California, EEUU. 670 pp.
- Baskin C. C. and Baskin J. M. 2001. Some procedures for dormancy break and germination of difficult seeds. *Native Plant Propagation and Restoration Strategies*. Oregon State University Nursery Technology Cooperative and Western Forestry and Conservation Association: 12-13.

- Baskin C. C. and Baskin J. M. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2° Ed. San Diego, California, EEUU. 1586 pp.
- BEA. 2008. Boletín Ecosistemas Argentinos. *Ruprechtia apetala* Wedd. Boletín informativo N° 31. Publicado en internet, disponible en <http://ecosistemasarg.org.ar/boletin-31-ruprechtia-apetala/>. Activo marzo, 2018.
- Cabrera A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 14: 1-2.
- Cagnolo L., Valladares G., Salvo A., Cabido M. and Zak M. 2009. Habitat fragmentation and species loss across three interacting trophic levels: effects of life-history and foodweb traits. *Conserv. Biol.* 23:1167-1175.
- Carpenter N., Ostmar E. and Cornell Y. 1993. The role of light during *Phox durmonnii* Hook germination. *Hort. Science* 28(8): 776 - 778.
- Catalán L. 1992. Laboratory germination conditions for seeds of *Prosopis flexuosa* D.C and *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz. *Seed science and technology* 20: 289-292.
- Ceruti F. C., Lazzari S. M. N. and Neto G. H. R. 2010. *Tricorynus rudepunctatus* (Pic) (Coleoptera: Anobiidae): diagnosis and damage. 10th International Working Conference on Stored Product Protection.
- Cocucci A. E. 1961. Revisión del género *Ruprechtia* (*Polygonaceae*). *Kurtziana* 1: 217–269.
- Córdoba A. A., Mazzuferi V., Coirini R. O. y Casanoves F. 2000. *Torneutes paliidipennis* Reich (Coleoptera: Cerambycidae) en algarrobos negros del Chaco árido de Córdoba. Efecto de la condición de sitio en el grado de infestación. *MULTEQUINA* 9: 99-110.
- Corner E. J. H. 2009. The Seeds of Dicotyledons. Cambridge University Press. New York. 564 pp.
- Craviotto R. M. 2006. Influencia de la condición de viabilidad de la capa de células de aleurona sobre la germinación y vigor de semillas híbridas de maíz (*Zea mays* L.). Tesis Ph.D. Pacific Western University, California, USA. 199 pp.
- Crawley M. J. 2000. Seed predators and plant population dynamics. On Seeds: The ecology of regeneration in plant communities. 2° Ed. Fenner. New York. 416 pp.
- Cronquist A. 1977. Introducción a la Botánica 2° Ed. CECSA, Mexico, 848 pp.
- Cuenca Castillo J. 2014. Efecto de la calidad nutricional y el clima en la dinámica de remoción de semillas por granívoros en fragmentos de bosque mesófilo de montaña del centro del estado de Veracruz, México. Trabajo de experiencia recepcional. Universidad Veracruzana, México. 43 pp.

- D'Agostino A. B., Gurvich D. E., Ferrero M. C., Zeballos S.R. y Funes G. 2012. Requerimientos germinativos de enredaderas características del Chaco Serrano de Córdoba, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 60 (4): 1513-1523.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal (1ªEd.)*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Dardanelli S., Nores M. L. and Nores M. 2006. Minimum area requirements of breeding birds in fragmented wood land of Central Argentina. *Divers. Distrib.* 12: 687-693.
- Del Corral S., Diaz-Napal G. N., Zaragoza M., Carpinella M. C., Ruiz G. and Palacios S. M. 2014. Screening for extracts with insect antifeedant properties in native plants from central Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13 (5): 498-505.
- Del Longo O. T. and Aráoz S. D. 2009. Criteria to determine the duration of the Germination Test for Seeds of 'mistol' (*Ziziphus mistol* Grisebach). *Seed Science and Technology*. ISTA. Vol. 37:507-511.
- Demaio P., Karlin U. y Medina M. (Eds.).2002. *Árboles nativos del centro de Argentina 1º Ed.* L.O.L.A. Córdoba, Argentina. 185 pp.
- Díaz S., Enrico L., Cáceres D., Chebel A., Cingolani A. M., Cuchietti A., Gurvich D., Kopta F., Kopta R., Menna J. M., Navarro J. L., Re G., Tecco P., Urcelay C., Vidallé E. 2011. Propuesta de Franjas Forestales de Caminos para Múltiples Beneficios Ecosistémicos en la Provincia de Córdoba. Contribución del Núcleo DiverSus al manejo integrado de las rutas de la Provincia de Córdoba coordinada por el Foro Ambiental Córdoba. Publicado en internet, disponible en <http://www.nucleodiversus.org/uploads/file/forestaciondecaminos.pdf>. Activo octubre 2017.
- Dimitri M. J. y Orfila E. N. 1985. *Tratado de morfología y sistemática vegetal*. Ed. ACME, Buenos Aires, 499 pp.
- Diodato L. y Carabajal de Belluomini M. 2006. Insectos que inciden en la producción de algarrobo blanco (*Prosopis alba*). II Jornadas Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Publicado en internet. Disponible en [fcf.unse.edu.ar/eventos/2-jornadas-forestales/pdfs/Plagas de algarrobo blanco.pdf](http://fcf.unse.edu.ar/eventos/2-jornadas-forestales/pdfs/Plagas%20de%20algarrobo%20blanco.pdf). Activo Marzo 2018.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez, L., Tablada M. y Robledo C. W. 2013. *InfoStat versión 2013*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Publicado en internet. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>. Activo marzo 2018.
- Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: Su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 31(1):74-85.
- Esau K., Izaguirre P. y Laguardia A. M. 1982. *Anatomía de las plantas con semilla*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 512 pp.

- Español F. 1979. Géneros de *Dorcatominae* de la fauna europea (Col. *Anobiidae*). Nota 92. Misc. Zool. 5: 33-42.
- Evans A. S. and Cabin R. J. 1995. Can Dormancy Affect the Evolution of Post-Germination Traits? The Case of *Lesquerella fendleri*. Ecology 76 (2): 344-356.
- Evert R. F. 2006. Esau Anatomía Vegetal. 3º Ed. Editorial Omega. 614 pp.
- Fahn A. 1974. Plant anatomy. 2º Ed. Ed. Oxford : Pergamon Press. 620pp.
- Fahrig L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 34: 487-515.
- Ferreras A. E. and Galetto L. 2010. From seed production to seedling establishment: Important steps in an invasive process. Acta Oecologica 36: 211-218.
- Ferreras A. E., Funes G. y Galetto L. 2014. Evaluación interanual de las estrategias regenerativas de la especie exótica invasora *Gleditsia triacanthos* en relación a la nativa *Acacia aroma* en el bosque chaqueño serrano de Córdoba (Argentina). Bosque 35(2): 155-162.
- FUNAM. 2004. Fundación para la defensa del ambiente. Los bosques de Cabure Norte no deben ser destruidos. Publicado en internet, disponible en <http://www.funam.org.ar/ccaburen.html>. Activo noviembre 2015.
- Funes G. and Venier P. 2006. Dormancy and germination in three *Acacia* (Fabaceae) species from central Argentina. Seed Science Research 16:77-82.
- Funes G., Díaz S. y Venier P. 2009. La temperatura como principal determinante de la germinación en especies del Chaco Seco de Argentina. Ecología Austral 19: 129-138.
- Furnier R. G. 1997. Métodos para medir la variación genética en plantas. En: Vargas H. J. J., Bermejo V. B. y Ledig T. F. Manejo de Recursos Genéticos Forestales. pp. 13-36.
- Gallo C. V. 2008. Calidad fisiológica y efecto de la presencia de semillas verdes de soja (*Glycine max* (L.) Merr) en lotes destinados a simiente. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 119 pp.
- Gama-Arachchige N. S., Baskin J. M., Geneve R. L. and Baskin C. C. 2013. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. Ann Bot. 2013 Jul; 112(1): 69–84.
- González A. 2017. Hipertextos de Botánica Morfológica. Publicado en Internet, disponible en <https://es.slideshare.net/AnaGonzalez94/tema12esclernquima-hipertextos-de-botnica-morfolgica-wwwbiologiaeduar>. Activo mayo 2017.
- Gordillo S. 2009. Plantas nativas del Cerro Colorado. Provincia de Córdoba. Guía práctica para el reconocimiento de árboles, arbustos, cactáceas, enredaderas, arrosietadas y

epífitas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 28 pp.

Harms K.E. and Dalling J. W. 2000. A bruchid beetle and a viable seedling from a single diaspore of *Attalea butyracea*. *Journal of Tropical Ecology* 16:319–325.

Hartmann H., Kester D. and Davies F. 1990. *Propagation. Principles and practices*. New Jersey. 5° Ed. Prentice-hall. Englewood cliffs. 647 pp.

Havely G. 1974. Effects of gazelles and seed beetles (*Bruchidae*) on germination and establishment of *Acacia* species. *Isr. J. Bot.* 23: 120-126.

Hefler S. M. e Longhi-Wagner H. M. 2008. Análise da morfología do fruto em espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus*–Cyperaceae. *Acta Bot. Bras.* 22(3): 637-651.

Heo K., Cheol Lee K. and Ohnishf O. 2001. Pericarp Anatomy and Character Evolution of *Fagopyrum* (*Polygonaceae*). The proceeding of the 8 th international symposium on buckwheat: 256-260.

Hernández Verdugo S., López España R., Parra Terraza S., Villarreal Romero M. y Osuna Enciso T. 2010. Variación en la germinación entre poblaciones y plantas de chile silvestre. *Agrociencia* 44 (6): 667-677.

Heydeker W. 1977. Stress and seed germination: an agronomic view. In: Khan A.A., ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press: 237-282.

Hong S. P. 1989. *Knorringia* (= *Aconogonon* sect. *Knorringia*), a new genus in the *Polygonaceae*. *Nordic Journal of Botany* 9: 343–357.

Hoyos L., Gavier-Pizarro G. I., Kuemmerle T., Bucher E. H., Radeloff V.C. and Tecco P. A. 2010. Invasion of glossy privet (*Ligustrum lucidum*) and native forest loss in the Sierras Chicas of Córdoba, Argentina. *Biological Invasions* 12: 3261–3275.

ISTA. 1998. *International Seed Testing Association. Tropical and Subtropical Tree and Shrub Seed Handbook*, Switzerland, 204 pp.

ISTA. 2013. *International Seed Testing Association. Handbook on Seedling Evaluation*. 3° Ed., Switzerland.

ISTA. 2014a. *International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing*. Ed. 2014. Switzerland.

ISTA. 2014b. *International Seed Testing Association. Handbook on Pure Seed Definition*. Ed. 2014. Switzerland.

- IUCN - International Union for Conservation of Nature. 2013. Red List of Threatened Species. *Ruprechtia apetala*. Version 2013. Publicado en internet, disponible en www.iucnredlist.org. Activo octubre 2017.
- Jaramillo S. y Baena M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Colombia. 210 p.
- Joseau M. J., Aráoz S. y Hernández R. 2013. La semilla. En: Conservación de recursos forestales nativos de Argentina. El cultivo de plantas leñosas en vivero y a campo. Joseau M. J., Conles M. Y y Verzino G. E (Eds.) (1ªEd). Ed. Brujas. Córdoba. 294 pp.
- Kantachot C. and Chantaranothai P. 2011. Achene Morphology of *Polygonum s.l.* (*Polygonaceae*) in Thailand. *Tropical Natural History* 11(1): 21-28.
- Kanwal D., Abid R. and Qaiser M. 2016. The seed atlas of Pakistan- XIV Polygonaceae. *Pak. j. bot.*, 48(5): 1833-1848.
- Ledig T. F. 1997. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. En: Vargas H.J.J., Bermejo V.B. y Ledig T.F. Manejo de recursos genéticos forestales. pp. 1-22.
- Marino G. D. 2001. Bases conceptuales para el manejo sustentable de los recursos naturales del norte de la provincia de Santa Fe. *Nat. Neotrop.* 32: 73-77.
- Marino G. D., Mas M. V. y Orlandoni M. J. 2008. Morfología y reconocimiento de las principales especies leñosas nativas de la provincia de Santa Fe, Argentina, en el estado de plántula. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 43 (1-2): 67-81.
- Martin A. C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist* 36: 513-660.
- Mattana E., Pritchard H. W., Porceddu M., Stuppy W. H. and Bacchetta G. 2012. Interchangeable effects of gibberellic acid and temperature on embryo growth, seed germination and epicotyl emergence in *Ribes multiflorum* ssp. *Sandalioticum* (*Grossulariaceae*). *Plant Biology*. 14 (1): 77-78.
- Mazuferi V. 1997. Almacenamiento de semillas de *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz: control físico y químico de *Bruchidae* (Coleóptera) que infestan las semillas de *Prosopis chilensis* en almacenamiento y su impacto sobre la calidad. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 85 pp.
- Mazuferi V. 2000. Plagas en *Prosopis*. *Muldequina* 9 (2): 107-117.
- Mazuferi V. y Conles M. 2013. Organismos perjudiciales en viveros de especies leñosas nativas. En: Joseau M. J., Conles M. Y y Verzino G. E. (Eds.). Conservación de los recursos forestales nativos en Argentina: el cultivo de plantas leñosas en vivero y a campo (1ªEd). Ed. Brujas. Córdoba, 294 pp.

- McGarigal K. and Cushman S. A. 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. *Ecological applications* 12(2): 335–345.
- Metcalf C. R. and Chalk L. 1972. *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. (Vol.1-2).* Clarendon Press. Oxford. 806 pp.
- Metcalf C. R. and Chalk L. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons (Vol. 1).* 2° Ed. Clarendon press .Oxford .276 pp.
- Metzger J. D. 1992. Physiological Basis of Achene Dormancy in *Polygonum convolvulus* (Polygonaceae) *American Journal of Botany* 79 (8): 882-886.
- Meyer S. E., Allen P. S. and Beckstead J. 1997. Seed germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. *Oikos* 78: 474-485.
- Montenegro R. 2013. FUNAM - Fundación para la defensa del ambiente. Publicado en internet, disponible en <http://www.clarin.com/sociedad/tardara-anos-recuperar-forestacion.html>. Activo noviembre 2013.
- Munsell Color Company. 2000. *Munsell soil color charts.* Ed. New Windsor.Gretagmacbeth.55 pp.
- Murga Orillo H., Abanto Rodríguez C., Palomino Rosillo L. y Polo Vargas A. R. 2015. Ocurrencia de *Argyrotaenia sphaleropa* Meyrick (1909) (Lepidoptero: Tortricidae) en *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze Britton & Rose (1824). *Scientia Agropecuaria* 6 (4): 329 – 331.
- Neubauer B.F. 1971. The development of the Achene of *Polygonum Pensylvanicum*: Embryo, Endosperm and Pericarp. *American Journal of Botany* 58 (7): 655-664.
- Niembro Rocas, A. 1988. *Semillas de árboles y arbustos. Ontogenia y estructura.* Ed. Limusa. México. 285 pp.
- Nori J., Lescano J., Illoldi-Rangel P., Frutos N., Cabrera M. and Leynaud G. 2013. The conflict between agricultural expansion and priority conservation areas: Making the right decisions before it is too late. *Biological Conservation* 159:507–513.
- Oliveira E. C., Piña Rodrigues F.C.M. y Balistiero Figliola M. 1989. Propostas para a padronizacao de metodologías em analise de sementes forestais. *Revista Brasileira de Sementes* 11(1, 2, 3) 1- 42.
- Oppert B., Hartzler K. and Zuercher M. 2002. Digestive proteinases in *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Bulletin of Entomological Research* 92 (4): 331-336.

- Or K. and Ward D. 2003. Three-way interactions between *Acacia*, large mammalian herbivores and bruchid beetles - a review. *Afr. J. Ecol.* 41:257–265.
- Pais Bosch A., Tecco P., Funes G. y Cabido M. 2012. Efecto de la temperatura en la regeneración de especies leñosas del chaco serrano e implicancia en la distribución actual y potencial de bosques. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47 (3-4): 401-410.
- Pallares E. 2007. Efectos de la depredación por insectos sobre semillas de *Prosopis flexuosa* (Fabaceae, Mimosoideae) y su relación con el consumo por roedores pequeños del desierto del monte. Tesis de Licenciatura en Ciencias Naturales. Universidad del Aconcagua, Mendoza. 40 pp.
- Pavón N.P., Ballato-Santos J. y Pérez-Pérez C. 2011. Germinación y establecimiento de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Fabaceae-Mimosoideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 653-661.
- Pérez F. 2003. Germinación y dormición de semillas. En: *Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento*. Edit. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía: 177-200.
- Perez Perez C. 2007. Germinación de semillas de *Mimosa aculeaticarpa* var. *Biuncifera* (Benth) Barneby (Fabaceae). Tesis de grado, Universidad autonoma del estado de Hidalgo, Mexico. 31 pp.
- Periasamy K. 1962. Studies on seeds with ruminant endosperm. Development of rumination in the Vitaceae. *Proc. Indian Academy of Science B* 56: 13-26.
- Popinigis F. 1974. Qualidades de sementes. Lavoura arrozeira, Porto Alegre. Instituto Rio. Grandese do arroz 282: 14-8.
- Ricardi M. 1996. Morfología de los cotiledones de plántulas de algunas familias o géneros presentes en Venezuela como fuente de caracteres para su determinación. *Plántula* 1: 1-11.
- Rojas-Rousse D, Grille G. and Basso C. 2009. A natural refuge for an *Anobiidae* species (*Tricornus* sp.) in persistent pods of *Acacia caven* (Molina) Molina in Uruguay. *Bol. San. Veg. Plagas* 35: 423-428.
- Romero J. 2005. Métodos para la evaluación de daños en semillas ocasionados por Bruchidos (*Insecta: Coleoptera*) en el campo, con nuevos registros de hospedantes y distribución para el grupo. *Entomología Mexicana* 4:107-111.
- Ronse Decraene L., Hong S.P. and Smets E. 2000. Systematic significance of fruit morphology and anatomy in tribes *Persicarieae* and *Polygoneae* (*Polygonaceae*). *Botanical journal of the Linnean Society*. 134: 301-337.

- Santos G., Zanuncio T., Assis Junior S. y Zanuncio J. 1998. Daños por *Acanthoscelides clitellarius* (Coleoptera: *Bruchidae*), Lepidoptera (*Pyralidae*) y Diptera en semillas de *Piptadenia communis* (*Leguminosae*). *Bosque* 19(2): 23-27.
- Santos T. y Tellería J. L. 2006. Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas* 15 (2): 3-12.
- Schmidt L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seeds. Danida forest seed center, Denmark. 511pp.
- Schütz, W. and G. Rave. 2003. Variation in seed dormancy of the wetland sedge, *Carex elongata*, between populations and individuals in two consecutive years. *Seed Sci. Res.* 13:315-322.
- Soriano D., Orozco-Segovia A., Márquez-Guzmán J. Kitajima K., Gamboa-de Buen A. and Huante P. 2011. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. *Annals of Botany* 107: 939–951.
- Spjut R. W. 1994. A systematic treatment of fruit types. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 70:1-182.
- Tantawy M. E. and Naseri M. M. 2003. A Contribution to the Achene Knowledge of *Rosoideae* (*Rosaceae*) LM and SEM. *International Journal Of Agriculture & Biology* 5 (2): 105–112.
- Tapia A. M., Romero A., Luque V., Allolio P., Nuñez L. y Aybar S. 2012. Diferentes técnicas de ruptura de dormición y absorción de agua en semillas de *Prosopis chilensis*. *Biología en agronomía*. Vol. 2 (2): 7-15.
- Tecco P. A., Gurvich D. E., Díaz S., Pérez-Harguindeguy N. and Cabido M. 2006. Positive interaction between invasive plants: the influence of *Pyracantha angustifolia* on the recruitment of native and exotic woody species. *Austral Ecology* 31: 293-300.
- Torrella S., Ginzburg R. y Dámoli J. 2006. Expansión agropecuaria en el Chaco Argentino: Amenazas para la conservación de la biodiversidad. En: *Panorama de la ecología de paisajes en Argentina y países sudamericanos*. Matteucci S. D. (Ed.) Ed. INTA. Buenos Aires. pp. 53-63.
- Trillo C., Arias Toledo B., Galetto L. and Colantonio S. 2010. Persistence of the Use of Medicinal Plants in Rural Communities of the Western Arid Chaco (Córdoba, Argentina). *The Open Complementary Medicine Journal* 2: 80-89.
- Valfré-Giorello T. A., Ashworth L. y Renison D. 2012. Patrones de germinación de semillas de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (*Euphorbiaceae*), árbol nativo del Chaco Serrano de interés en restauración. *Ecol. austral* 22 (2): 92-100.

- Vázquez Yanes C., Orozco A., Rojas M. Sánchez M. E. y Cervantes V. 1997. Reproducción de las plantas: Semillas y Meristemos. Méjico. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_2.html
- Verga A. 2013. Domesticación de especies forestales nativas. En: Joseau M. J., Conles M. Y. y Verzino G. E. (Eds.). Conservación de los recursos forestales nativos en Argentina: el cultivo de plantas leñosas en vivero y a campo (1ªEd). Ed. Brujas. Córdoba. 294 pp.
- Villagra P. E., Cony M. A., Mantován N. G., Rossi B. E., González Loyarte M. M., Villalba R. y Marone L. 2004. Ecología y manejo de los algarrobales de la Provincia Fitogeográfica del Monte. En: Arturi M.F., Frangi J. L., Goya J. F. (Eds). Ecología y manejo de bosques nativos de Argentina. Presentación multimedia en CD. Editorial Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Villarreal Garza J. A., Rocha Estrada A., Cárdenas-Ávila M. L., Moreno Limón L., González Álvarez M., Vargas López V. 2013. Caracterización morfométrica, viabilidad y germinación de semillas de Mezquite y Huizache en el noreste de México. *Phyton* 82(2): 169-174.
- Viveros Colorado C. 2000. Variación de frutos y semillas entre árboles de una población ruderal de *Guazuma ulmifolia* Lambert (*Sterculiaceae*) Tesis de maestría Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico. 53 pp.
- Volkman L. R. y Suarez R. 2009. Reforestación en el ambiente serrano. Publicado en internet, disponible en <http://www.reforestacion.com.ar/>. Activo Noviembre 2013.
- Voyiatzis D.G. 1992. The pathway of water entry into olive (*Olea europaea*) stones. *Seed Science & Technology*, 20: 715-717.
- Werker E. 1997. *Seed Anatomy*. Ed. Gebrüder Borntraeger. Berlin. 423 pp.
- White R.E. 1965. A revision of the genus *Tricorynus* of North America (Coleoptera: Anobiidae). *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 4: 285-368.
- White R. E. 1974. The Dorcatominae and Tricoryninae of Chile (Col. *Anobiidae*). *Trans. Amer. Ent. Soc.* 100: 191-253.
- Wijngaard H. H. Renzetti S. and Arendt E. K. 2007. Microstructure of Buckwheat and Barley During Malting Observed by Confocal Scanning Laser Microscopy and Scanning Electron Microscopy. *Journal of the Institute of Brewing* 113 (1): 34-41.
- Willan R. 1985. A guide forest seed handling with special reference to the tropics. FAO (Food and Agriculture Organization) Forestry paper 20 (2). Rome, 394 pp.
- Willan R. L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales. Estudio FAO (Food and Agriculture Organization). Montes 20/2. Danida, Roma, 502 pp.

- Woodcock E. F. 1914. Observations on the Development and Germination of the Seed in Certain Polygonaceae. *American Journal of Botany* 1 (9): 454-476.
- Zak M. R., Cabido M. and Hodgson J. G. 2004. Do subtropical seasonal forests in the Gran Chaco, Argentina, have a future? *Biol. Conserv.* 120: 589-598.
- Zarlavsky G. E. 2014. *Histología vegetal: tecnicas simples y complejas*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Botánica. 1 Ed.
- Zhu S. X., Qin H. N. and Shih C. 2006. Achene wall anatomy and surface sculpturing of *Lactuca L.* and related genera (Compositae: *Lactuceae*) with notes on their systematic significance. *J. Integr. Plant Biol.* 48(4): 390-399
- Zobel B. y Talbert J. 1988. *Técnicas de Mejoramiento genético de árboles forestales*. Editorial Limusa, Mexico. 545 pp.
- Zomleffer W. B. 2004. *Guía de las familias de plantas con flor*. Editorial Acribia Madrid, Espana, 456 pp.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis constituye un aporte al conocimiento de la morfo-anatomía de los frutos y semillas de *Ruprechtia apetala*, así como su calidad fisiológica y sanitaria. Cabe destacar que si bien los estudios llevados a cabo en este trabajo se realizaron sobre pocos árboles, se sientan las bases para proseguir trabajos de investigación con una población mayor.

Los estudios morfo-anatómicos del aquenio revelan que el exocarpo posee esclereidas no lignificadas con taninos en el lumen y el mesocarpo con gránulos de almidón. Se confirma la presencia de la capa de aleurona en la semilla, y se descubre la existencia de cristales en el mesófilo de los cotiledones. En el análisis de la función del fruto en el proceso germinativo, se identifican como vías de entrada del agua por el resto de los estilos, y en la semilla, por el episperma. El estudio de las características anatómicas del pericarpo confirman su incidencia en la germinación escalonada.

En lo que concierne a la calidad fisiológica de las semillas, quedan establecidos los requerimientos térmicos y lumínicos, la duración del ensayo, así como las características de las plántulas normales y anormales. La variación observada en los porcentajes de germinación entre los individuos de una misma población en diferentes años de cosecha puede atribuirse a las condiciones ambientales. Esta información obtenida es de gran importancia a los fines de estandarizar pruebas de laboratorio, sugerir un protocolo de trabajo y establecer fechas de siembra según las áreas geográficas donde la especie puede establecerse exitosamente.

En relación a la calidad sanitaria, las semillas presentan infestaciones de insectos de la familia *Anobiidae*, Subfamilia *Dorcatominae*, Serie *Tricorymus*, representando la primera mención de anobidos infestando semillas de esta especie. Si bien el porcentaje de infestación es relativamente bajo en todas las poblaciones, los frutos infestados presentan daños severos en las estructuras seminales afectando la calidad fisiológica, impidiendo su germinación.

DIFUSION DE LOS RESULTADOS

JORNADAS Y CONGRESOS:

✓ 35 JORNADAS ARGENTINAS DE BOTÁNICA:

1. Caracterización morfo-anatómica del fruto y semilla de *Ruprechtia apetala* Wedd (Poligonaceae). Diaz M.S., Molinelli M.L., Mazzuferi V., Aráoz, S.D.
2. Tratamientos pregerminativos sobre semillas de *Ruprechtia apetala* Wedd. (Poligonaceae). Diaz M.S., Molinelli M.L., Mazzuferi V., Aráoz S.D.

✓ XXXII JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA ASOCIACIÓN DE BIOLOGÍA DE TUCUMÁN

1. Germinación de semillas de *Ruprechtia apetala* Weddel en condiciones de laboratorio. Diaz M.S., Maggi M.E., Molinelli M.L., Mazzuferi V., Aráoz S.D.

✓ VI JORNADAS INTEGRADAS DE INVESTIGACION Y EXTENSION DE LA FCA-Iº JORNADA DE ENSEÑANZA EN LAS CIENCIAS AGROPECUARIAS:

1. Primera mención de *Anobiidae* (Coleoptera) infestando semillas de *Ruprechtia apétala* Wedd y cuantificación de su daño. Mazzuferi V., Díaz M.S., Molinelli M.L., Aráoz S.D.

FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION EN CUMPLIMIENTO DE LA FINALIDAD DE ESTA TESIS

La domesticación de especies silvestres implica no solamente la manipulación del recurso genético, sino también el desarrollo de tecnologías de cultivo, manejo y la generación de información sobre sus aplicaciones y aprovechamiento. El presente trabajo contribuiría a brindar información básica que puede ser utilizada en programas de conservación y mejoramiento de la especie.

La evaluación sanitaria de lotes obtenidos en otras localidades, permitiría conocer si existen otras familias de insectos infestando a estas semillas.

Un aspecto poco estudiado de *R. apetala* es su comportamiento durante el almacenamiento, por lo que se podrían realizar ensayos de tolerancia a desecación y viabilidad en el tiempo, considerando diferentes condiciones de guardado.

Un comparación más exhaustiva sobre la morfo-anatomía del fruto y semilla de otras especies del genero permitirían profundizar en la explicación de los procesos germinativos dispares que se observan entre especies.

Por otra parte, destacando la importancia de la conservación de la flora nativa, estos estudios podrían ser replicados en otras especies autóctonas.