



## Sexual and asexual propagation of *Rhaphithamnus spinosus* (blue hawthorn), in Andean Patagonia

## Propagación sexual y asexual de *Rhaphithamnus spinosus* (espino azul), en Patagonia Andina

Mari, A. E.\*<sup>1</sup>; Sánchez, G.<sup>1</sup>; Riat, M.<sup>1</sup>; Mateo, M.<sup>1</sup> y Arroyo, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Río Negro - Tecnicatura en Viveros - Viveros II. (UNRN TEVI)

Mitre 630 Bariloche Río Negro - Argentina

\*Autor de correspondencia: anaeugeniamaari@gmail.com

Recibido: 10/05/2022

Aceptado: 17/08/2022

### ABSTRACT

Mari, A. E.; Sánchez, G.; Riat, M.; Mateo, M. y Arroyo, A. (2022). Sexual and asexual propagation of *Rhaphithamnus spinosus* (blue hawthorn), in Andean Patagonia. Horticultura Argentina 41 (106): 124 – 143. <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/2prbmr47>

*Rhaphithamnus spinosus* is an evergreen, thorny shrub with violet flowers and violet colored nucleus fruit; endemic from the north of the Andean Patagonian forest. Previous works indicate that the seeds have a physiological and mechanical dormancy in their fruit. The objective was to evaluate the methods for sexual and asexual propagation of the species. The viability of the seeds was analyzed with a germination and 2,3,5-triphenyltetrazolium tests. Four pre-germination treatments were tested: T1: Cold-wet stratification for 60 days, (T2): Scarification with sandpaper + cold-wet stratification-60 days, T3: Scarification with sandpaper + soak 1000 ppm gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) for 24 hs and T4: Scarification with

sandpaper + soak water / 24 hs as a control in two seed samples. Seeds were sown at 18 °C, with a photoperiod of 12 hours and subsequently sown in a multicell tray. The agamic method consisted in hardwood cuttings that were cut during autumn, and placed in multicell trays, treated with a 1500 ppm indole-3-butyric acid (IBA) solution, with basal heating (20 °C±2) and mist. In sexual propagation, the germination percentages per treatment were: T1: 4.81 %, T2: 6.29 %, T3: 47.78 % and T4: 2.59 %. Growth in height and ramifications were analyzed. Asexual propagation reached 96 % rooting at 90 days, and plants were then transferred to 3 L pots. It is concluded that the application of combined pre-germination treatments improves the germination percentage. These results suggest the possibility for professional propagation and container cultivation.

**Keywords:** native species, seeds, cuttings, multiplication, Verbenaceae.

## RESUMEN

Mari, A. E.; Sánchez, G.; Riat, M.; Mateo, M. y Arroyo, A. (2022). Propagación sexual y asexual de *Rhaphithamnus spinosus* (espino azul), en Patagonia Andina. Horticultura Argentina 41 (106): 124 – 143. <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/2prrbmr47>

*Rhaphithamnus spinosus* es un arbusto siempre verde, espinoso y endémico del norte del Bosque andino patagónico. Posee flores violetas y fruto núcula con recubrimiento carnoso color azul. Los antecedentes indican un letargo fisiológico en las semillas, sin mencionar el letargo mecánico en sus frutos. El objetivo fue evaluar los métodos para la propagación sexual y asexual de la especie. Se evaluó la viabilidad de las semillas mediante test de germinación y 2,3,5-trifeniltetrazolio y se ensayaron 4 tratamientos pregerminativos: T1: Estratificación fría-húmeda-60 días, T2: Escarificación con lija + estratificación fría-húmeda-60 días, T3: Escarificación con lija + remojo ácido giberélico 1000 ppm/ 24 hs y

T4: Escarificación con lija+remojo agua/24 hs como control. Luego, se sembraron a 18 °C con fotoperiodo de 12 hs para posterior repique a bandeja multicelda. Por vía agámica, se realizaron estacas en otoño de madera del año, en bandejas multiceldas, tratadas con solución de ácido indol-3-butírico (IBA) a 1500 ppm, con calefacción basal (20 °C ±2) y humidificación del aire. En la propagación sexual los porcentajes de germinación por tratamiento fueron: T1: 4,81 %, T2: 6,29 %, T3: 47,78 % y T4: 2,59 %. También se analizó el crecimiento en altura y ramificaciones. La propagación asexual arrojó un 96 % de enraizamiento a los 90 días, momento en que se trasvasó a maceta de 3L. Se concluye que las aplicaciones de tratamientos pregerminativos combinados mejoran los porcentajes de germinación. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de propagación y cultivos en contenedor.

**Palabras claves:** especie nativa, semillas, estacas, multiplicación, Verbenaceae.

## 1. Introducción

### 1.1. Características generales de la especie:

El *Rhaphithamnus spinosus* Miers (VERBENACEAE), conocido como “espino azul” o “arrayán macho”, es una especie autóctona del sudoeste de Argentina, sur y centro de Chile y las islas de Chiloé y Juan Fernández (Correa, 1999). Ocupa ambientes húmedos y cerrados de la cordillera de los Bosques andino patagónicos (Múlgura *et al.*, 2022). Crece en el sotobosque de *Nothofagus* y convive con los arrayanes en fondos de valle o cañadones, donde el terreno es anegadizo o con abundante agua y tolera bien la sombra (Ferreira *et al.*, 2020). Es una planta que puede tener forma arbustiva, arbolitos bajos o árboles de hasta 6 m de altura, de follaje perennifolio, con espinas axilares aciculares, largas y rectas. Posee llamativas flores hermafroditas de color violeta campanuladas, apenas zigomorfas, acrescentes en el fruto, gineceo con ovario subgloboso, carpelos 2-loculares con 1 óvulo por lóculo. Fruto núcula indehisciente de 5-5,5 mm de diámetro, globoso, carnoso, de color azul, cubierto por el cáliz acrescente adherido al pericarpo (Correa, 1999) (Figura 1 y Figura 2). Su estado de conservación fue evaluado recientemente para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2018), en la cual figura con estado de preocupación menor.



**Figure 1:** Branch with fruits. Source: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

**Figura 1.** Rama con frutos. Fuente: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.



**Figure 2:** Branch with flowers and fruits. Source: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

**Figura 2.** Rama con flores y frutos. Fuente: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

### 1.2. Marco teórico y antecedente de cultivo:

Las semillas de *Rhaphithamnus spinosus* tienen un letargo fisiológico, razón por la cual la germinación se produce dentro de los 90 días de sembradas con un resultado inferior al 25 % (Figuroa *et al.*, 1996; Figuroa *et al.*, 2004; Rovere 2006). En la experiencia previa en propagación de la especie desarrollada en la Universidad Nacional de Río Negro, se realizó una estratificación fría y húmeda de 40 días, alcanzando un 22 % de germinación a los 120 días desde la siembra y para la propagación agámica a partir de estacas de tallo se obtuvo un 15,38 % de enraizamiento luego de 6 meses (García, 2012).

Con relación a la aplicación de tratamientos pregerminativos, la estratificación fría y húmeda rompe la latencia mediante una combinación de cambios fisiológicos en el embrión y los tejidos que lo rodean. Se puede demostrar que el embrión aumenta su potencial de crecimiento, mientras que las cubiertas de semillas (también el endospermo en las angiospermas) se debilitan. Estos cambios activos se producen a través de la activación génica (Mullen *et al.*, 1996; Hartmann & Kester, 2018) y el aumento de la actividad enzimática (Hong & Lee, 2017). Por otro lado, el balance de hormonas endógenas está involucrado directamente en el control del desarrollo, la latencia y la germinación de las semillas. Altas concentraciones de ácido abscísico (ABA) inhiben la biosíntesis de giberelinas (AG<sub>3</sub>) como promotoras del inicio de la actividad enzimática, e impactan directamente en la latencia y en la capacidad de la semilla para germinar (Warpeha & Montgomery, 2016). El agregado de giberelinas exógenas tendría un efecto inhibitorio de la acumulación de ABA en semillas con latencia (Hartmann & Kester, 2018).

En Chile, un estudio de las especies nativas (Di Saco *et al.*, 2018), hace referencia a que la conservación de recursos genéticos forestales se puede desarrollar de manera *in situ*, protegiendo los ecosistemas y todo lo que contienen y complementariamente, se puede realizar de manera *ex situ*, llevando estos recursos desde su lugar de origen a bancos de semillas, rodales de conservación, Arboretum y Jardines Botánicos. La recolección de semillas es una actividad central dentro de la conservación *ex situ*. El objetivo de la producción define la forma y los programas de recolección de semillas. Así, semillas forestales recolectadas con altos estándares podrán ser utilizadas para conservación de diversidad genética, como también para mejoramiento genético, propagación clonal, restauración de hábitat, formación de rodales de conservación o simplemente para forestación comercial u ornamental.

Gran parte de la distribución de *Rhaphitamnus spinosus* se encuentra dentro de los Parques Nacionales de la Cordillera Norte, y fuera de ellos en ecosistemas frágiles afectados por el sobrepastoreo, así como por el uso turístico, situaciones que plantean un interés para su propagación.

El objetivo general de este estudio fue evaluar los métodos para la propagación sexual, asexual por estacas de tallo y el cultivo en maceta de *Rhaphithamnus spinosus* con fines ornamentales y de restauración. Los objetivos específicos fueron: \*Analizar la viabilidad y calidad de las semillas, \*Evaluar la respuesta a la aplicación de tratamientos pregerminativos, \*Determinar la calidad de plantines producidos en bandeja multiceldas, \*Analizar el cultivo en maceta de las plantas obtenidas y \*Evaluar la respuesta de la especie a la propagación por estacas de tallo.

## 2. Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del vivero del Servicio Forestal Andino de la ciudad de San Carlos de Bariloche (41° 08' 31" S, 71° 18' 49" O, 840 msnm) a cargo de la Universidad Nacional de Río Negro donde se realizan las prácticas de la carrera Tecnicatura en Viveros y se trabajó en dos tipos de propagación: sexual por semillas y asexual por estacas de tallo.

### 2.1. Propagación sexual y cultivo en maceta:

Las semillas fueron recolectadas en forma manual en marzo de 2019 de una población ubicada en el Parque Municipal Llao Llao de la ciudad de San Carlos de Bariloche (41° 08' 31" S, 71° 18' 49" O, 840 msnm).

### 2.1.1. Limpieza, calidad y viabilidad de las semillas:

Para la limpieza se probaron dos métodos: uno de ellos consistió en dejar secar las pulpas antes de quitarlas del fruto. En el otro método se pusieron en remojo y se frotaron en tamiz de 2 mm para despegar las pulpas y finalmente se pasaron a un recipiente con agua para que por decantación se separen. Después se dejaron secar sobre papel y se almacenaron en bolsas de papel a temperatura ambiente (20 °C).

Para calcular pureza se realizó el pesaje de los lotes completos con balanza de precisión con 3 repeticiones. Se estableció el número de semillas por gramo, el peso de 100 semillas, de impurezas y por cálculo se llegó al peso de 1.000 semillas, según normas de la International Seed Testing Association (ISTA, 2019). Se realizó el reconocimiento con lupa binocular de las estructuras de frutos y semillas, según las descripciones botánicas de la especie (Correa, 1999). La viabilidad se evaluó con el test de germinación y el test del 2,3,5-trifeniltetrazolio. Para realizar el primero, se separaron aleatoriamente 3 submuestras de 25 semillas, se desinfectaron con una solución al 5 % de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo de 55 mg/Cl.L<sup>-1</sup>, se dispusieron en cajas de Petri humedecidas al 90 % con fungicida de acción preventiva por contacto N--(triclorometiltio) ciclohex-4 en - 1,2-dicarboximida (2 gL<sup>-1</sup>) y se ubicaron en una sala de cultivo con temperaturas de 20 °C ±2, en estanterías con iluminación artificial con fotoperiodo de 12 horas luz día regulado con temporizador. El criterio para determinar semilla germinada fue a partir de la ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula (ISTA, 2019). Los conteos se realizaron semanalmente durante 45 días.

Para el Test del 2,3,5-trifeniltetrazolio se separaron aleatoriamente 20 núculas y se preacondicionaron en remojo durante 24 hs. Se reconocieron las estructuras seminales en observaciones bajo lupa binocular, evaluando las posibles opciones para realizar los cortes para observar la tinción. Se realizó un corte longitudinal a ambos lados de la núcula. Se preparó una dilución de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1 % p/v de la solución madre siempre protegida de la luz (pH 6.5 a 7). Se cubrió el fondo de una caja de Petri con la solución de 2,3,5-trifeniltetrazolio, se sumergieron las núculas, se cubrió y se incubó en estufa a 30 °C durante 24 hs. Una vez cumplido el plazo se enjuagó con abundante agua y se almacenó en heladera a 6 °C ±1 hasta realizar la observación bajo lupa binocular.

### 2.1.2. Tratamientos pregerminativos:

A partir de los antecedentes de cultivo consultados y del reconocimiento de las estructuras del fruto, se definió el diseño del ensayo y los tratamientos pregerminativos. Se efectuaron escarificaciones del pericarpio leñoso. Se tomó un n = 90, con un diseño aleatorizado de 3 repeticiones cada uno. Todos los tratamientos se realizaron escalonadamente para unificar la fecha de siembra, como se indica en la Tabla 1.

Las estratificaciones se realizaron en cajas de Petri con vermiculita, se mezcló para homogeneizar el sustrato y se humedece a un 90 % con fungicida de acción preventiva por contacto N--(triclorometiltio) ciclohex- 4 en- 1,2- dicarboximida (2 g.L<sup>-1</sup>) y se ubicaron en heladera a 4/6 °C ±1 tapadas y con papel film. Para la aplicación de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) se utilizaron pastillas de “Giberelina ka”, fitorregulador, tabletas solubles (ST) de 1 g con una concentración de 10 g de ácido giberélico y 100 g de inertes c.s.p.” y se disolvió en 100 cm<sup>3</sup> de agua para obtener una concentración de 1000 ppm y se dejaron en remojo durante 24 hs. Luego del remojo se enjuagó previo a la siembra.

**Table 1:** Design of the sexual propagation test: Treatment (T), Moist-chilling stratification in a refrigerator at 4/6 °C (EFH), mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper (ESC) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) 1,000 PPM for 24 hours and soak in water for another 24 hours (CONTROL).

**Tabla 1.** Diseño del ensayo de propagación sexual: Tratamiento (T), estratificación frío húmeda en heladera a 4/6 °C (EFH), escarificación por 4 minutos con lija de papel de granulometría 220 (ESC) y ácido giberélico 1.000 ppm por 24 horas (AG) y remojo en agua por 24 horas más (CONTROL). A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Tratamiento	Descripción	Objetivo
T1	EFH 60 días	Romper el letargo
T2	ESC con lija + EFH 60 días	Lograr imbibición de la semilla y romper el letargo.
T3	ESC con lija + AG <sub>3</sub> 1000/24 hs	Romper el letargo
T4	CONTROL Remojo 24 hs + ESC con lija	Lograr imbibición de la semilla.

### 2.1.3. Siembra, repique/trasvase:

La siembra se realizó al voleo en 3 almácigos por repetición con un sustrato 2:1 de turba *Sphagnum spp.* (Origen Tierra del Fuego - pH 4,2) y perlita. El pH de la turba se corrigió a valores neutros con la incorporación de 240 g de óxido de calcio por bolsa de turba (120 dm<sup>3</sup>). Se midió el pH a los 7 días de la corrección, con una relación 1 + 5 v/v, (Barbaro *et al.*, 2019) utilizando para ello un peachímetro portátil (Hanna Instruments Co.). Los almácigos se ubicaron en una sala de cultivo a una temperatura de 20 °C ±2, en estanterías con iluminación artificial con fotoperiodo de 12 horas luz - día regulado con temporizador. El riego se realizó en forma manual según requerimiento de la germinación. Se consideró la emergencia de los cotiledones como criterio de semillas germinadas (Rao *et al.*, 2014). Se evaluó poder germinativo (PG) a la fecha de realización de los repiques.

El repique se realizó en bandeja multicelda de 72 cavidades de 55 cm<sup>3</sup>, utilizando el mismo sustrato empleado para la siembra, definiendo como criterio de desarrollo de las plántulas que tuvieran al menos de 2 a 4 nomófilos y manteniendo el diseño aleatorizado por tratamiento y repetición. Las bandejas se ubicaron dentro de un invernadero, sobre mesadas con calefacción basal, con temperatura del sustrato entre 7 °C y 15 °C controlada con termostato y sistema de riego por microaspersión con una frecuencia de 3 días a la semana durante 20 minutos. Para la etapa de establecimiento del cultivo, la nutrición se realizó en forma manual una vez por semana utilizando fertilizante soluble en agua Hakaphos® violeta 13-40-13 con micronutrientes, con una concentración de 1 g.L<sup>-1</sup>. Se monitoreó la respuesta de las plántulas a la fertilización observando la presencia de algún síntoma de deficiencia o exceso, considerando que Diehl (2006), indica que muchas plántulas de especies arbóreas de la Región andino patagónica parecen ser sensibles a dosis

altas de fósforo y potasio y la aplicación de dosis más equilibradas en relación al nitrógeno suele ser beneficiosa para los primeros estadios de crecimiento.

Al momento del trasplante a maceta, se evaluó calidad del plantín con relación al desarrollo del sistema radical, considerando que la formación de un cepellón compacto, la calidad, cantidad y ubicación de las raíces darán una idea del control de las variables ambientales, del riego y de la nutrición del cultivo (Styer & Koransky, 2000). También se analizaron los porcentajes de supervivencia y las variables de crecimiento: altura de plantas y cantidad de tallos por tratamiento pregerminativo, tomando como referencia una regla milimetrada.

El trasplante se realizó a maceta soplada n° 14 de 1,5 L, con sustrato compuesto de compost de biosólido, pinocha y perlita en proporción 2:2:1 respectivamente. Las plantas se ubicaron en el exterior sobre membrana geotextil con una sombra natural de árboles en la franja del mediodía con un sistema de riego por microaspersión, con una frecuencia de 30 minutos 3 días a la semana, en los meses de alta evapotranspiración del cultivo (de diciembre a mayo). La fertilización se realizó con fertilizante de liberación controlada Osmocote plus® - 3M (NPK 16-8-12) con una dosis incorporada al sustrato de 1.5 g.L<sup>-1</sup>.

#### 2.1.4. Análisis estadístico:

Los ajustes de los modelos propuestos se realizaron con el programa de análisis de datos InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Las medias de altura de planta y del hipocótilo se compararon mediante Análisis de la Varianza ( $p < 0,05$ ), con un modelo unifactorial que supone independencia y normalidad de los errores y varianzas homogéneas entre tratamientos. El modelo ajustado para comparar las medias de porcentaje de germinación también fue un análisis de la varianza a una vía de clasificación pero que consideró varianzas diferentes entre tratamientos (mejor modelo). La prueba de lo supuesto se realizó mediante diagramas de dispersión de los residuales vs los valores predichos y la selección del mejor modelo se realizó por el criterio de Akaike (Arroyo & Balzarini, 2007). Cuando correspondió se realizó la comparación de medias con el Test de Tukey. Para comparar el número de ramificaciones se contabilizó el número de plantas que presentaron: ninguna, o alguna ramificación en cada tratamiento, no se pudo realizar una prueba chi-cuadrado de independencia dado que muy pocas plantas mostraron ramificaciones.

#### 2.2. Propagación asexual y cultivo en maceta:

La recolección de material vegetal se realizó en mayo de 2019 en el Lago Roca (41° 21' 59" S, 71° 46' 21" O, 761 msnm), mientras que la colecta de las varas de chupones y ramas bajas las cuales se mantienen envueltas en telas húmedas y bolsas de nylon para su traslado. Luego se mantuvieron en heladera a 4/6 °C ±1 por 3 días. Se prepararon 24 estacas de *Rhaphithamnus spinosus*, con 3 entrenudos y con 2 hojas superiores (2 nudos plantados respetando la polaridad y una sola de las estacas fue con un solo nudo por falta de material), se desinfectaron con agua clorada al 5 % y se enjuagaron. En la base se les colocó una solución 1500 ppm de ácido indol-3-butírico (AIB) y luego se plantaron en bandejas forestales de 350 cm<sup>3</sup> por cavidad, con un sustrato compuesto por perlita y turba *Sphagnum spp.* (Origen Tierra del Fuego - pH 4,2) en una proporción 2:1. El pH de la turba se corrigió a valores neutros con la incorporación de 240 g de óxido de calcio por bolsa de turba (120 dm<sup>3</sup>). Se midió pH a los 7 días de la corrección, con una relación 1+5 v/v, (Barbaro *et al.*, 2011), utilizando para ello un peachímetro portátil (Hanna Instruments Co.). Las estacas se colocaron en cama para enraizamiento con calentamiento basal, con micro túnel, media sombra (50 %), con temperatura del sustrato en un rango entre los 20 °C y 22 °C controlada con termostato, se suministró humedad con sistema de riego por microaspersión con 4 riegos de 1 minuto de duración,

con una frecuencia de riego de 3 días a la semana. Una vez que se observó enraizamiento, las bandejas multiceldas se ubican en el invernadero sobre mesadas calefaccionadas sin micro túnel, con una temperatura de sustrato en un rango entre 15 °C y 20 °C, regulada por termostato y sistema de riego por microaspersión, con una frecuencia de 15 minutos 3 días a la semana. Para la etapa de desarrollo del sistema radical, la nutrición se realizó en forma manual una vez por semana, utilizando fertilizante soluble en agua Hakaphos® violeta (NPK 13-40-13 con micronutrientes), con una concentración de 1 g.L<sup>-1</sup>.

El cultivo en bandeja multiceldas se llevó a cabo durante el invierno, hasta lograr la formación de cepellón. La calidad del plantín al momento del trasplante a maceta se evaluó con relación al desarrollo del sistema radical, considerando un cepellón compacto, calidad, cantidad y ubicación de las raíces.

El trasplante se realizó a maceta soplada de 3 L, con sustrato compuesto de compost de biosólido, pinocha y perlita en proporción 2:2:1 respectivamente. Las plantas se ubicaron en el exterior sobre membrana geotextil, con un sistema de riego por microaspersión, con una frecuencia de 30 minutos 3 días a la semana, en los meses de alta evapotranspiración del cultivo (de diciembre a mayo). La fertilización se realizó con fertilizante de liberación controlada Osmocote plus® - 3M (NPK 16-8-12) con una dosis de 1.5 g.L<sup>-1</sup> por maceta incorporado al sustrato.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Propagación sexual:

##### 3.1.1. Limpieza, calidad y viabilidad de las semillas:

En cuanto a la limpieza de las semillas, la pulpa de los frutos se despegó con mayor facilidad utilizando el método de remojo y frotado en tamices (Figura 3).



**Figure 3:** Cleaning of seeds by soaking, sieves and decantation method.

**Figura 3.** Limpieza de semillas en remojo, tamices y método de decantación. A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Con el método de limpieza utilizado se obtuvo un alto grado de pureza ya que posee un pericarpio fácil de limpiar y contar. Las variables de calidad de semillas se encuentran descritas en la Tabla 2.

**Table 2:** Results of purity percentages and variables analyzed for seed quality. Results were obtained by cleaning, soaking, sieving and decanting.

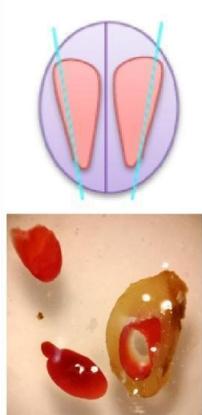
**Tabla 2.** Resultados de porcentajes de pureza y variables analizadas para calidad de semillas obtenida con el método de limpieza por remojo, tamices y decantación. A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Pureza	Impurezas	Peso de 1000 semillas	Semillas por gramo
99,8 %	0,2 %	18,62 g	52 semillas ± 2

Luego de la observación detallada de los frutos bajo la lupa binocular (aumento 40x), se observó la presencia de un pericarpio leñoso con tabique central y cada lóculo alojando una semilla, por lo tanto, cada núcula cuenta con dos semillas. Entre los parámetros de calidad, la prueba de corte arrojó que el 70 % tenían una de las 2 semillas vanas. En cuanto a la viabilidad, el test de germinación sin tratamientos previos no proporcionó resultados y luego de 2 meses se lo dio por finalizado, mientras que el test del 2,3,5-trifeniltetrazolio mostró un porcentaje de tinción del 95 % para el embrión y los cotiledones, como se muestra en la Tabla 3. Esta diferencia entre los resultados de viabilidad indica que la especie tiene algún tipo de letargo como se indica en los antecedentes de cultivo (Figuerola *et al.*, 1996, Rovere, 2006 y García, 2012).

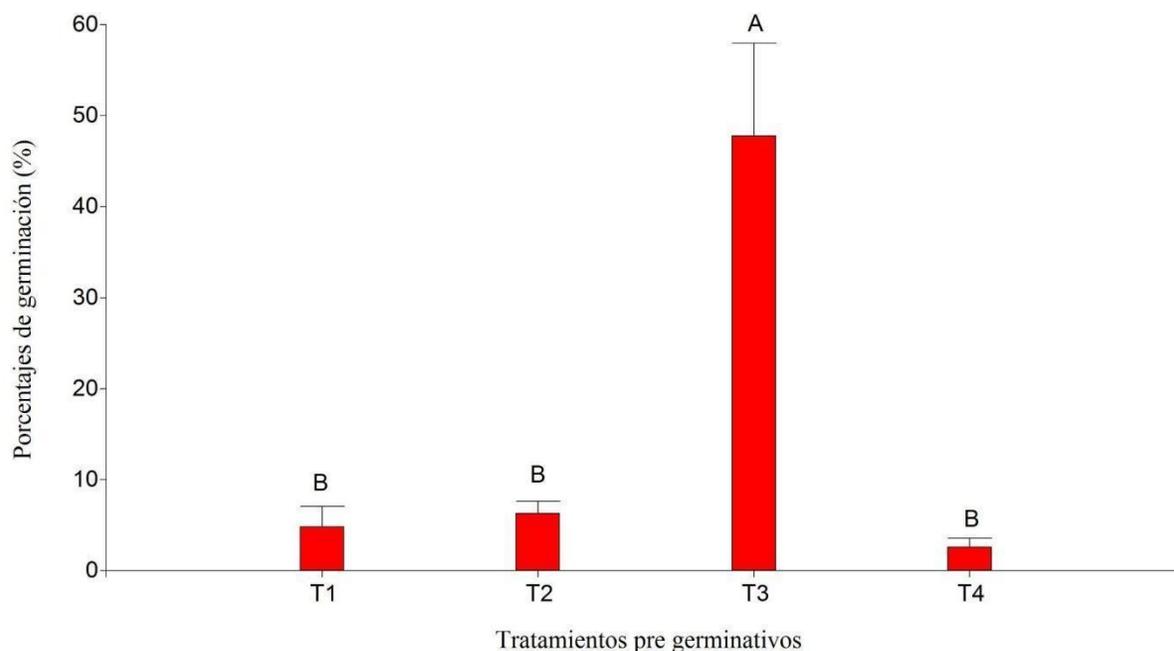
**Table 3:** Viability results by 2,3,5- triphenyltetrazolium test.

**Tabla 3.** Resultados de viabilidad por test del 2,3,5-trifeniltetrazolio. A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Características de la especie	Frutos (tamaño natural) y núculas (40x)	Corte longitudinal y transversal de núculas (40x)	Esquema de corte para la tinción con 2,3,5-trifeniltetrazolio (40x)	Porcentaje de tinción (40x)
<p><i>Rhaphithamnus spinosus</i> (Miers)</p> <p>Fruto drupáceo color violeta con 2 núculas, con 2 semillas exendospermas separadas por un tabique central.</p>				<p>95%</p> 

### 3.1.2. Germinación, repique y/o trasvase:

Con respecto a la respuesta a la aplicación de tratamientos pregerminativos, para el poder germinativo a los 60 días (PG60) los porcentajes de germinación de *Rhaphithamnus spinosus* se registraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p=0,0091$ ). Los valores medios fueron: T1= 4,81 %, T2= 6,29 %, T3= 47,78 % y T4= 2,59 %, siendo la media del T3 significativamente mayor a la de los otros tres tratamientos (Figura 4).



**Figure 4:** Germination percentage of *Rhaphithamnus spinosus* at the transplant date for each pregermination treatment, T1: Moist-chilling stratification for 60 days (EFH 60), T2: mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper (ESC) + (EFH 60), T3: (ESC) + 1,000 PPM gibberellic acid for 24 hours (AG<sub>3</sub>) and T4: soaking in water for 24 hours plus mechanical scarification (CONTROL). Different letters indicate significant differences (Tukey's test for  $p < 0.05$ ).

**Figura 4.** Porcentaje de germinación de *Rhaphithamnus spinosus* a la fecha del trasplante por cada tratamiento pregerminativo, T1: Estratificación fría y húmeda por 60 días (EFH 60), T2: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 (ESC) + (EFH 60), T3: (ESC) + ácido giberélico 1.000 PPM por 24 horas (AG<sub>3</sub>) y T4: Remojo en agua por 24 horas más escarificación (CONTROL). Letras diferentes indican diferencias significativas. (Test de Tukey para  $p < 0,05$ ).

La escarificación + ácido giberélico (T3) mejoró significativamente el resultado de los tratamientos que rompen el letargo fisiológico citado en los antecedentes consultados (Figuroa *et al.*, 1996; Donoso, 2006; Rovere, 2006). Otros trabajos han demostrado que la adición de giberelinas promovió la actividad enzimática al inhibir el ácido abscísico, rompiendo el letargo de las semillas e incrementando el poder germinativo (Hartmann & Kester, 2018 y Warpeha & Montgomery, 2016).

Entre las observaciones realizadas durante la germinación, cabe destacar como la núcula emergió del sustrato junto a los cotiledones, inhibiendo la germinación de la segunda semilla (Figura 5).

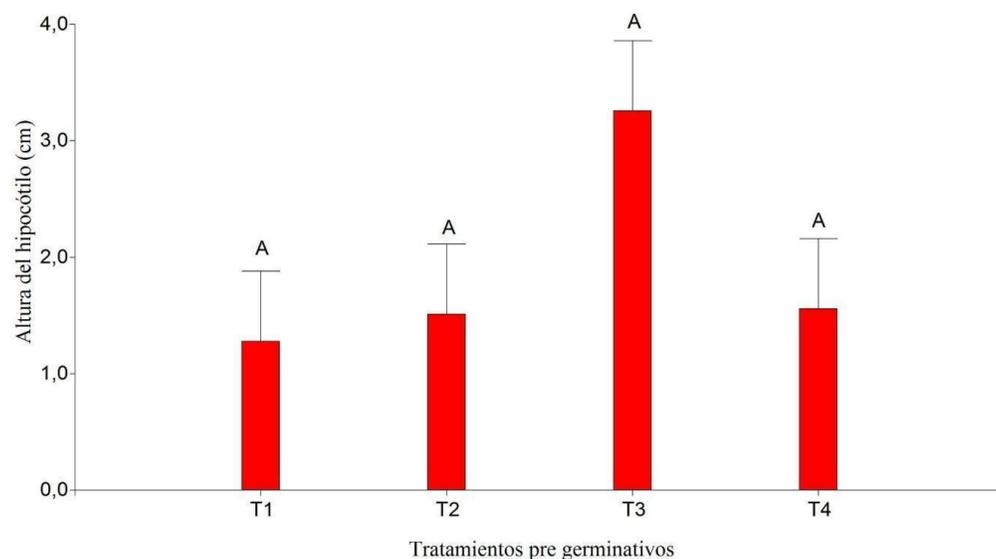


**Figure 5:** Germination T3 (gibberellic acid), nut emerging from the substrate next to the cotyledons and relation of the seedling with the coin.

**Figura 5.** Germinación T3 (ácido giberélico), núcula emergiendo del sustrato junto a los cotiledones (izquierda y centro) y relación del tamaño de la plántula con una moneda (derecha). A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

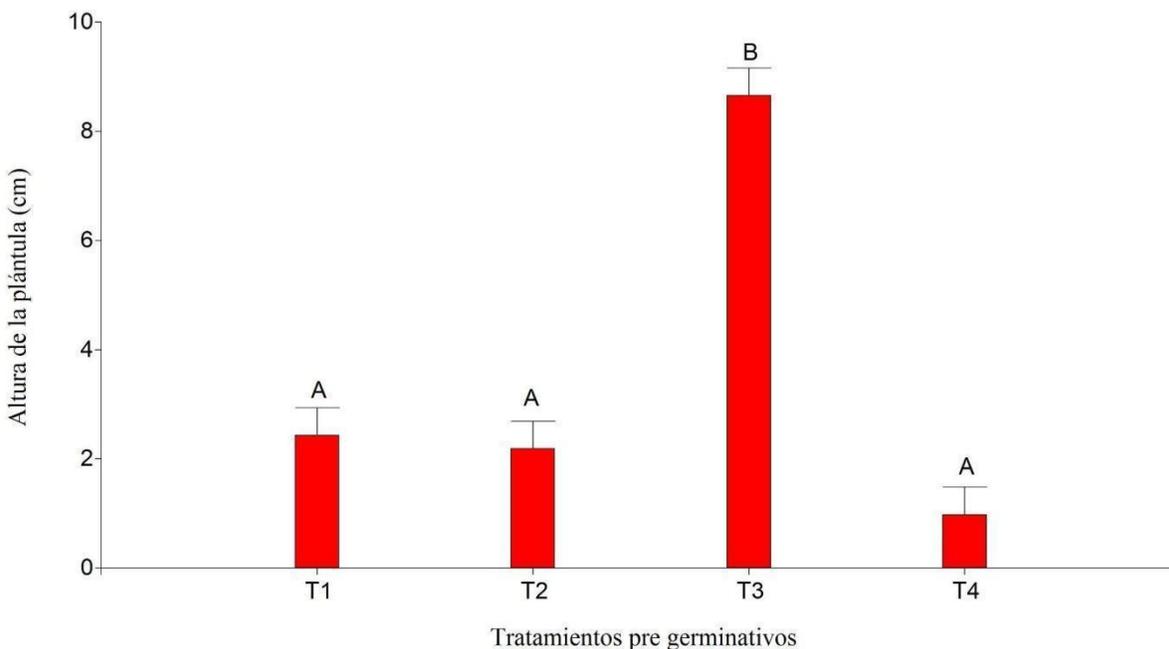
Para la fecha del repique se observó mayor elongación del hipocótilo en las plántulas del T3 con respecto a los demás tratamientos por lo que se decidió evaluar si hubo incidencia de la aplicación de ácido giberélico como fitorregulador del crecimiento, principalmente en la elongación (Warpeha & Montgomery, 2016). Para el parámetro de crecimiento de altura del hipocótilo de *Rhaphithamnus spinosus* no se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1555$ ) entre tratamientos. A pesar que el tratamiento T3 muestra una media relativamente mayor, dada la dispersión entre repeticiones de un mismo tratamiento, dicha diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 6).

Para el parámetro de crecimiento en altura de las plántulas de *Rhaphithamnus spinosus* se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,0001$ ). Se obtuvo para el T1 una media de 2,43 cm, para T2 de 2,19 cm y para T4 de 0,98 cm, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Mientras que el T3 registró una media de 8,66 cm siendo estadísticamente mayor a la media de los otros tres tratamientos (Figura 7). Al comparar los tratamientos (T1 y T3), se observa una mejor respuesta de crecimiento en altura para el T3 con ácido giberélico (Figuras 8 y 9).



**Figure 6:** Height of the hypocotyl of *Rhaphithamnus spinosus* at the transplant date after pregermination treatments, T1: Moist-chilling stratification for 60 days (EFH 60), T2: mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper (ESC) + (EFH 60), T3: mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper + gibberellic acid 1,000 PPM for 24 hours (ESC + AG<sub>3</sub>) and T4: soaking in water for 24 hours plus mechanical scarification (CONTROL). Different letters indicate significant differences (Tukey's test for  $p < 0.05$ ).

**Figura 6.** Altura del hipocótilo de *Rhaphithamnus spinosus* a la fecha del trasplante por tratamientos pregerminativos realizados, T1: Estratificación fría y húmeda por 60 días (EFH 60), T2: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 (ESC) + (EFH 60), T3: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 + ácido giberélico 1.000 PPM por 24 horas (ESC + AG<sub>3</sub>) y T4: Remojo en agua por 24 horas más escarificación (CONTROL). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 7:** Height of the *Rhaphithamnus spinosus* seedling at the transplant date after pregermination treatments, T1: Moist-chilling stratification for 60 days (EFH 60), T2: mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper (ESC) + (EFH 60), T3: mechanical scarification for 4 min by rubbing with 220 granulometry sandpaper + gibberellic acid 1,000 PPM for 24 hours (ESC + AG<sub>3</sub>) and T4: soaking in water for 24 hours plus mechanical scarification (CONTROL). Different letters indicate significant differences. (Tukey's test for  $p < 0.05$ ).

**Figura 7.** Altura de la plántula de *Rhaphithamnus spinosus* a la fecha del trasplante por tratamientos pregerminativos realizados, T1: Estratificación fría y húmeda por 60 días (EFH 60), T2: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 (ESC) + (EFH 60), T3: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 + ácido giberélico 1.000 PPM por 24 horas (ESC + AG<sub>3</sub>) y T4: Remojo en agua por 24 horas más escarificación (CONTROL). Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey para  $p < 0,05$ ).



**Figure 8:** Measurement of seedling height and hypocotyl height - T1 (EFH 60) - R3 - Plant n°1 (left).

**Figura 8.** Mediciones de la altura de la plántula y altura al hipocótilo - T1 (EFH 60) - R3 - Planta n° 1 (izquierda). A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

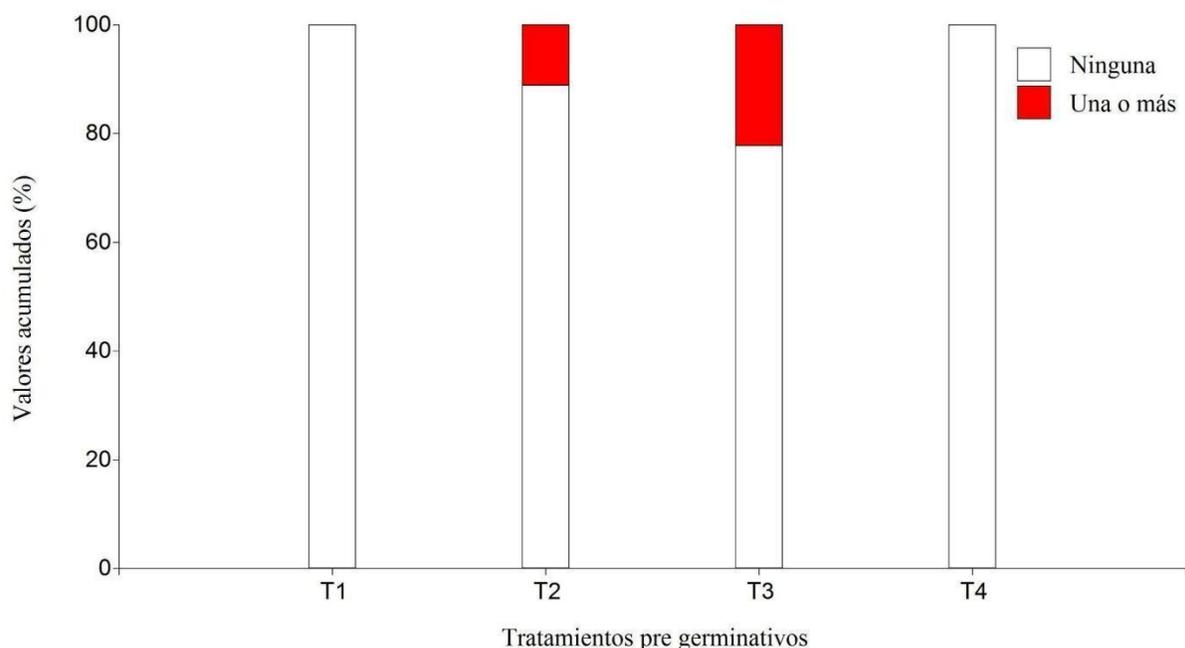


**Figure 9:** Measurement of seedling height and hypocotyl height - T3 (gibberellic acid) R2 - Plant n° 1 (left).

**Figura 9.** Medición de la altura de la plántula y altura al hipocótilo - T3 (ácido giberélico) R2 - Planta n° 1 (izquierda). A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Para el parámetro de ramificaciones laterales de *Rhaphithamnus spinosus* los tratamientos T1 y T4 no mostraron ramificaciones en ninguna de las plántulas evaluadas. En el tratamiento T2 hubo una

planta de las 9 (11,1%) que presentó 6 ramificaciones, mientras que el T3 hubo 2 plantas (2 de 9= 22,2%) que presentaron sólo una ramificación (Figura 10).



**Figure 10:** Percentage of plants without lateral branches (white) or with some lateral branch (one or more) (red) for the 4 pregermination treatments evaluated in *Rhaphithamnus spinosus* seedlings. T1: Cold and humid stratification for 60 days (EFH 60), T2: Scarification for 4 min with 220 grit sandpaper (ESC) + (EFH 60), T3: Scarification for 4 min with 220 grit sandpaper + Gibberellic acid 1,000 PPM for 24 hours (ESC + AG<sub>3</sub>) and T4: Soaking in water for 24 hours plus scarification (CONTROL).

**Figura 10.** Porcentaje de plantas sin ramificaciones laterales (blanco) o con alguna ramificación lateral (una o más) (rojo) para los 4 tratamientos pregerminativos evaluados en plántulas de *Rhaphithamnus spinosus*. T1: Estratificación fría y húmeda por 60 días (EFH 60), T2: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 (ESC) + (EFH 60), T3: Escarificación por 4 min con lija de papel de granulometría 220 + ácido giberélico 1.000 PPM por 24 horas (ESC + AG<sub>3</sub>) y T4: Remojo en agua por 24 horas más escarificación (CONTROL).

Al momento de concluir el estudio, se pudo determinar cuál fue la duración de cada etapa de cultivo en relación al tratamiento pregerminativo realizado como se observa en la Tabla 4. Se puede inferir que el uso de ácido giberélico (T3) produjo la germinación en medio mes, acortando la etapa de cultivo en almácigo y el repique en comparación con los 5 meses requeridos para los restantes tratamientos realizados. Esto demuestra que la especie tiene buena respuesta a la aplicación exógena de giberelina que, como hacen referencia Warpeha & Montgomery (2016), promueve el inicio de la actividad enzimática, interviniendo en la ruptura del letargo y en la capacidad de la semilla para germinar, la cual tendría un efecto inhibitor de la acumulación de ABA en semillas con latencia. En cuanto a la supervivencia de las plántulas, fue exitosa con tan solo 4 plantas

muertas durante todo el ciclo de cultivo (Figura 11).

**Table 4:** Duration of the crop stages in relation to the pregermination treatments applied. (T1), Moist-chilling stratification for 60 days (EFH 60), (T2) mechanical scarification with sandpaper + Moist-chilling stratification for 60 days, (T3) Mechanical scarification with sandpaper + soaking gibberellic acid-1000 ppm/24h and (T4) CONTROL Mechanical scarification with sandpaper + soaking water/24 hs.

**Tabla 4.** Duración de las etapas del cultivo en relación con los tratamientos pregerminativos aplicados. (T1), Estratificación fría-húmeda-60 días, (T2) Escarificación con lija + Estratificación fría-húmeda-60 días, (T3) Escarificación con lija + remojo ácido giberélico-1000 ppm/24 hs y (T4) CONTROL Escarificación con lija + remojo agua/24 hs. A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Tratamiento	Germinación	Repique	Trasvase
T1	4.5 meses	5 meses	9 meses
T2	4 meses	5 meses	9 meses
T3	0.5 meses	2 meses	5 meses
T4	5 meses	5 meses	9 meses



**Figure 11:** *Rhaphithamnus spinosus* plants obtained from sexual propagation in 14 cm pots. Source: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

**Figura 11.** Plantas de *Rhaphithamnus spinosus* obtenidas por vía sexual trasvasadas a macetas de 14 cm. A.E. Fuente: Mari, Argentina, 2019/2020.

### 3.2. Propagación asexual:

Las estacas analizadas tuvieron una respuesta al enraizamiento del 96 %, desarrollando sus primeras raíces en los dos primeros meses. Al tercer mes, ya contaban con un sistema radical consolidado, en ese momento se las retiró de las instalaciones con neblina, se las mantuvo con calefacción basal (Figuras 12 y 13).



**Figure 12:** Preparation of plant material (A) and rhizogenesis process of stem cuttings at the beginning (B), in one month time (C) and at the end of the trial (D).

**Figura 12.** Preparación del material vegetal (A) y proceso de rizogénesis de las estacas de tallo en el inicio (B), al mes (C) y al cierre del ensayo (D). A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.



**Figure 13:** *Rhaphithamnus spinosus* cuttings in the greenhouse on heated benches (A) and plants by asexual propagation in 3 L pots (B). Source: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

**Figura 13:** Estacas de *Rhaphithamnus spinosus* en el invernadero en mesadas calefaccionadas (izquierda) y plantas obtenidas por vía asexual en macetas de 3 L (derecha). A y B. Fuente: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.



**Figure 14:** *Rhaphithamnus spinosus* plants by asexual propagation in flower. (A y B). Source: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

**Figura 14:** Plantas de *Rhaphithamnus spinosus* por vía asexual en flor. A y B. Fuente: A.E. Mari, Argentina, 2019/2020.

Las estacas demostraron una excelente respuesta a la rizogénesis en 3 meses, alcanzando la parte basal de la celda sin armar cepellón de raíces fibrosas; y manifestaron buena supervivencia en bandeja forestal con fertilización. Luego de cuatro meses se las envasó en maceta de 3 L con sistema de fertilización de liberación lenta en el sustrato. El establecimiento fue del 100 % de las estacas trasvasadas (Figura 13) y florecieron al año de enraizadas (Figura 14).

#### 4. Conclusiones

A través de los parámetros analizados en el presente estudio se puede deducir que para la propagación sexual, la limpieza más efectiva y rápida de los pericarpios se logra con los frutos en fresco y empleando el método de remojo y frotado en tamices, obteniendo un porcentaje alto de pureza del lote. Las semillas de *Rhaphithamnus spinosus* son viables, y existen evidencias de la presencia de dos tipos de latencia, una fisiológica y otra mecánica. Con respecto a la respuesta a la aplicación de tratamientos pregerminativos, el tratamiento T3: escarificación por 4 min con lija de papel + ácido giberélico 1.000 PPM por 24 horas (ESC + AG<sub>3</sub>) proporcionó los mejores resultados de germinación, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos pregerminativos realizados. El tratamiento T4: remojo en agua por 24 horas más escarificación (CONTROL) tuvo los valores más bajos de germinación, evidenciando que la especie requiere tratamientos pregerminativos para superar la latencia y germinar exitosamente.

En cuanto a la aplicación de ácido giberélico, la concentración utilizada no tuvo incidencias en el incremento de la elongación del hipocótilo con respecto a los demás tratamientos, no observándose pérdidas de la calidad de las plántulas y en el desarrollo posterior del cultivo.

Para la propagación asexual, las estacas de madera del año sin lignificar y colectadas en otoño demostraron excelente respuesta al tratamiento aplicado, obteniendo altos porcentajes de rizogénesis a los 3 meses, constituyéndose en un método potencialmente utilizable en viveros al

acortar los tiempos de producción, evitando la etapa juvenil de las plantas y logrando floración en el primer año de cultivo.

Los resultados son promisorios en cuanto a la propagación y cultivo en maceta de *Rhaphithamnus spinosus*. Será posible seguir avanzando en optimizar los métodos de propagación, en la evaluación de la aplicación de otros tratamientos pregerminativos, en la identificación de los manejos ambientales en el invernadero más propicios para la especie y de los programas de fertilización eficientes en distintas etapas de cultivo. También se podrán desarrollar futuros protocolos de cultivo en viveros y verificar la generalización de los protocolos a semillas o estacas de otras procedencias y fechas de recolección.

## 5. Conflicto de intereses

Los autores declaran que este trabajo no presenta conflicto de intereses.

## 5. Bibliografía

- Arroyo, A & Balzarini, M. (2007). Modelos de covarianza residual heterocedásticos para mapeo de loci de caracteres cuantitativos. Actas de la Academia Nacional de Ciencias. ISBN 0325-7533 Tomo XIII: 129-140. Córdoba, Argentina.
- Barbaro, L.A.; Karlanian, M.A.; Rizzo, P. & Riera, N. (2019). Caracterización de diferentes compost para su uso comercial como componentes de sustratos. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia 35(2):126-136. Consultado en mayo de 2019. URL <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chjaasc/v35n2/0719-3890-chjaasc-00309.pdf>
- Correa, M.N. (1999). Flora Patagónica. Dicotyledoneae gamopétalas (Ericaceae a Calyceraceae), Buenos Aires, Colección científica del INTA. Tomo VIII Parte VI, p. 192-193.
- Diehl, P. (2006). Indicadores de conservación de nitrógeno y fósforo en especies arbóreas de la región Andino Patagónica. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Comahue. CRUB. 213 p.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Di Sacco, A.; Way, M.; León Lobos, P. & Suarez Ballesteros, C.I. (2018). Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres. V1.2. Royal Botanic Gardens Kew.
- Donoso, C. (2006). Floración, fructificación y semillación. En: Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. p. 21-28. (Donoso Zegers C. Ed).
- Ferreira, M. & Puntieri, J. (2020). Guía de identificación de flores de los bosques andino-patagónicos. 1ra edición. Buenos Aires, Artemisa. p. 23.
- Figueroa, J. & Jaksic, F. (2004). Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile Central. Revista chilena de Historia Natural 77:201-215.
- Figueroa, J.; Armesto, J. & Hernández, J. (1996). Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile.

- Revista chilena de Historia Natural 69:243-251.
- García, A. (2012). *Rhaphithamnus spinosus*. Espino azul. Trabajo Práctico integrador. Cátedra Viveros II. Tecnicatura en Viveros. Universidad Nacional de Río Negro.
- Hartmann, H.T. & Kester, D.T. (2018). Principles of Propagation by Cuttings. In: Plant Propagation Principles and Practices. 9th Edition. p. 295. (Hartmann Kester Davies Geneve Eds.).
- Hong, P. N. & Lee, C. (2017). Roles of Pectin Methylesterases and Pectin Methylesterase Inhibitors in Plant Physiology. Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences. March 2017. 1-17. Consultado en mayo de 2019. URL [www.jales.org/articles/xml/A9KO/](http://www.jales.org/articles/xml/A9KO/)
- Múlgura, M.E.; O'Leary, N. & Rotman, A.D. (2019). Flora Argentina. (A.M. Anton & F.O. Zuloaga. directores), Consultado en mayo de 2019. URL <http://www.floraargentina.edu.ar/>
- Mullen, R.T.; King, J. E. & Gifford, D. J. (1996). Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification germination and post-germinative growth. Physiol. Plant. 97:545-53.
- Rao, N.K.; Hanson, J.; Dulloo, M. E.; Ghosh, K.; Nowell, D. & Larinde, M. (2014). Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioersivity International, Rome, Italy. Consultado en mayo de 2019. URL <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/2945>
- Rovere, A. (2006). Cultivo de Plantas Nativas Patagónicas. Editorial Caleuche. [https://desdelapatagonia.uncoma.edu.ar/](https://desdelapatagonia.uncoma.edu.ar/index.php/cultivo-de-plantas-nativas-patagonicas-arboles-y-arbustos-enrique-belocopitow-1926-2007/)
- index.php/cultivo-de-plantas-nativas-patagonicas-arboles-y-arbustos-enrique-belocopitow-1926-2007/
- Styer, R.C. & Koransky, D. (2000). Controlling the root to shoot ratio. In Growers Talks on Plugs 3. Chapter 3. 106 pp. (Ball Publishing 2000 Ed.).
- The International Seed Testing Association ISTA. (2019). International Rules for Seed Testing, Chapter 7, i-7-6 (14). Consultado en mayo de 2019. URL <https://www.agri.gov.il/download/files/ISTA%20accreditation%20in%20details%206.2016.pdf>
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales. (2018). «The IUCN Red List of Threatened Species: *Rhaphithamnus spinosus*. Consultado en mayo de 2019. URL [www.iucnredlist.org/species/131404833/135697964](http://www.iucnredlist.org/species/131404833/135697964).
- Warpeha, K.M. & Montgomery, B.L. (2016). Light and Hormone Interactions in the Seed-to-Seedling Transition. Environmental and Experimental Botany. 121: 56-65. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847215000878>
- Zhang, Y.J.; Kuhns, L.; Lynch, J.P. & Brown, K.M. (2002). Buffered Phosphorus Fertilizer Improves Growth and Drought Tolerance of Woody Landscape Plants. Journal of Environmental Horticulture 20 4: 214-219. Consultado en julio de 2021. URL <https://doi.org/10.24266/0738-2898-20.4.214>.
- Horticultura Argentina es licenciado bajo Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 2.5 Argentina.