



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL

**EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO (GA₃) Y TIEMPO
DE REMOJO SOBRE LA GERMINACION DE SEMILLAS
DE BOLDO (*Peumus boldus* MOL.)**

C1244



MARCELO RODRIGUEZ CRESPILLO

Tesis para optar al grado de:
LICENCIADO EN CIENCIAS FORESTALES

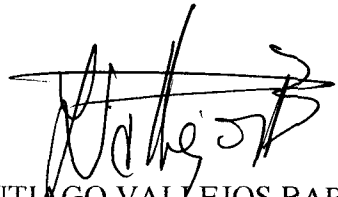
Profesor Guía: MARISOL MUÑOZ VILLAGRA

TALCA - CHILE
1997

UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL

El alumno Señor MARCELO RODRIGUEZ CRESPILLO ha realizado la tesis: "EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO (GA_3) Y TIEMPO DE REMOJO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE BOLDO (*Peumus boldus* Mol.)", como uno de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Ciencias Forestales, con la profesora Señorita Marisol Muñoz Villagra, como Profesora Guía.

La comisión de Calificación constituida por los profesores Señores: Marisol Muñoz Villagra, Darío Aedo Ortiz y Ursula María Doll, evaluó con un 6,5 (Seis coma cinco), como nota promedio.



OSCAR SANTIAGO VALLEJOS BARRA
DIRECTOR ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

TALCA-CHILE
1997

*Agradezco a todos los que
hicieron posible mi formación
profesional.*

INDICE

	pag.
RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
3.1 Antecedentes generales sobre el boldo y sus semillas.....	4
3.2 Aspectos generales de la propagación por semillas.....	7
3.2.1 Germinación de semillas.....	7
3.2.2 Factores externos necesarios para la germinación.....	8
3.2.3 Factores internos que causan latencia.....	10
3.2.3.1 Latencia de cubiertas.....	11
3.2.3.2 Latencia embrionaria.....	12
3.2.3.3 Latencia fisiológica o interna.....	12
3.2.3.4 Latencia combinada.....	13
3.2.4 Tratamientos utilizados para superar latencia en semillas.....	14

3.2.4.1 Tratamientos para superar latencia impuesta por cubiertas de la semilla.....	14
3.2.4.2 Tratamientos para superar latencia impuesta por el embrión de la semilla.....	15
3.2.4.3 Tratamientos para superar latencia combinada de semillas.....	16
3.3 Reproducción de boldo.....	17
3.3.1 Propagación sexuada.....	17
3.3.2 Propagación asexuada.....	20
3.4 Antecedentes de las giberelinas.....	20
3.4.1 Ensayos de germinación con remojo en ácido giberélico.....	22
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Ubicación del ensayo.....	24
4.2 Semillas.....	25
4.3 Bandejas.....	26
4.4 Sustrato.....	26
4.5 Regulador de crecimiento.....	27
4.6 Tratamientos.....	27
4.7 Cuidados culturales.....	28
4.8 Variables evaluadas.....	29

4.9 Diseño estadístico.....	30
5. PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	32
5.1 Capacidad germinativa.....	32
5.2 Valor máximo.....	37
5.3 Energía germinativa.....	41
5.4 Valor de germinación.....	42
5.5 Sobrevivencia.....	44
6. DISCUSION DE RESULTADOS.....	48
7. CONCLUSIONES.....	56
8. BIBLIOGRAFIA.....	58
9. APENDICES.....	64

INDICE DE CUADROS

	pag.
Cuadro N°1.- Tratamientos ensayados.....	27
Cuadro N°2.- Inicio de germinación y días después de la siembra.....	34
Cuadro N°3.- Análisis de varianza para la capacidad germinativa.....	35
Cuadro N°4.- Resultados del test de Duncan para la capacidad germinativa.....	36
Cuadro N°5.- Valores máximos promedios por tratamiento.....	37
Cuadro N°6.- Análisis de varianza para los valores máximos.....	38
Cuadro N°7.- Resultados del test de Duncan para los valores máximos.....	40
Cuadro N°8.- Resultados de energía germinativa (%), período de energía (días) y test de Duncan.....	41
Cuadro N°9.- Análisis de varianza para los valores de germinación....	42
Cuadro N°10.- Valor de germinación para los distintos tratamientos..	43
Cuadro N°11.- Número total de semillas germinadas, plantas sobrevivientes y porcentaje de sobrevivencia por tratamiento.....	44
Cuadro N°12.- Análisis de varianza para la sobrevivencia.....	46
Cuadro N°13.- Resultados del test de Duncan para la sobrevivencia promedio por tratamiento.....	46

Cuadro N°14.- Antecedentes de germinación en boldo.....	49
Cuadro N°15.- Promedio de temperaturas máximas y mínimas ambientales, del lugar del ensayo.....	51
Cuadro N°16.- Período de energía (días).....	53

INDICE DE FIGURAS

	pag.
Fig. N°1.- Semillas de boldo cubiertas con endocarpio, visualizando formación de cotiledones.....	6
Fig. N°2.- Lugar físico de establecimiento del ensayo.....	24
Fig. N°3.- Semillas cubiertas por endocarpio utilizadas en el ensayo...	25
Fig. N°4.- Distribución espacial de los tratamientos y bloques.....	31
Fig. N°5.- Capacidad germinativa (%) para los distintos tratamientos	33
Fig. N°6.- Capacidad germinativa promedio por tratamiento.....	35
Fig. N°7.- Valores máximos (V.M.), energía germinativa (%) y período de energía (días) para los distintos tratamientos.....	39
Fig. N°8.- Sobrevivencia (%) promedio por tratamiento.....	45
Fig. N°9.- Germinación acumulada (%) mensual para los tratamientos.....	52
Fig. N°10.- Planta de boldo representativa del mejor tratamiento pregerminativo del ensayo.....	55

RESUMEN

Se estudió el efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico GA3 en la germinación de semillas de boldo (*Peumus boldus* Mol.). Estas se sometieron a distintas concentraciones de este regulador de crecimiento (0, 10, 15 y 20 g/l) y tiempos de remojo (0, 24, 48 y 72 hr) en la solución.

Las semillas se recolectaron del sector de Pencahue, VII Región y se sembraron en almacigueras con arena como sustrato, estableciendo el ensayo en un invernadero de la escuela de Ingeniería Forestal de la Universidad de Talca.

Los valores de capacidad germinativa más altos se obtuvieron con los tratamientos 2 (10 g/l * 48 hr) y 1 (10 g/l * 24 hr) , con 26,2 y 15,1% respectivamente, en un tiempo de 218 y 197 días. El tratamiento 2 resultó ser el más adecuado como tratamiento pregerminativo, ya que fue significativamente superior al resto en capacidad germinativa, energía germinativa (26,2%) y valor máximo (0,129).

No presentaron respuestas los tratamientos pregerminativos en concentración de 15 y 20 g/l, independiente de los tiempos de remojo ensayados.

El período de inmersión de 72 horas no presentó resultados de germinación, independiente de las concentraciones de GA3 usadas.

El tratamiento control (sin aplicación de GA3) presentó un escaso 2,4% de capacidad germinativa después de 218 días. Al comparar estos resultados con los obtenidos por el tratamiento 2 (10 g/l * 48 hr), se podría asegurar que es recomendable la aplicación exógena de ácido giberélico, considerando la economía en tiempo y buenos resultados obtenidos en capacidad germinativa, sobrevivencia, valores máximos y energía germinativa.

SUMMARY

Studies have been done about the effect of the application of giberelic acid in the birth of boldo (*Peumus boldus* Mol.) seeds. These were put under different concentrations of this regulator of the growth (0, 10, 15 and 20 g/l) and watering times were (0, 24, 48 and 72 hours) in the solution.

The seeds were picked up in the area of Pencahue, 7 th. Region and sown in seedbed with sand as a sustrat, establishing the essay in a garden house in the Forest Engineering School of the Talca of University.

The highest of the germinative capacity were got with treatments 2 (10 g/l * 48 hrs) and 1 (10 g/l * 24 hrs), with 26,2 and 15,1% respectively, the time length was 218 and 197 days. The treatment 2 became the most appropriate as a pregerminative treatment, because it was significantly superior to the rest according to germinative capacity, germinative energy (26,2 %) and maximum value (0,129).

No answer were observed in the pregerminative treatment with concentration 15 and 20 g/l, not taking into consideration the watering times used.

72 hours period under water, didn't show any germinative result, not taking into consideration the GA3 concentrations used.

Control treatment (with no application of GA3) showed a little 2,4% germinative capacity after 218 days. When comparing these results with the was obtained in treatment 2 (10 g/l * 48 hrs) we can be quite sure that external giberelic acid application is recommended, considering the economy in time and good results obtained in germinative capacity, survival, maximum values and germinative energy.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace 2 ó 3 décadas, diferentes organismos e instituciones del Estado han realizado múltiples esfuerzos orientados a la forestación de zonas áridas y semiáridas del país, reuniendo bastante información y experiencia. Una de las especies forestales capaz de desarrollarse en estas zonas es el *Peumus boldus* Mol. (boldo), (HOMANN, 1969). Por ello, una reforestación con boldo y otras especies permitiría una recuperación de estas áreas, pudiendo obtenerse un aprovechamiento racional de estos recursos.

Otro aspecto a considerar es que el boldo, junto con espino (*Acacia caven*), y quillay (*Quillaja saponaria*), constituyen desde el punto de vista económico-comercial, las principales especies nativas que se desarrollan en la zona mediterránea de Chile central (AGUIRRE e INFANTE, 1988).

Las hojas de boldo permiten la extracción de boldina (2,6 -Dihidroxi-3,5 - dimetoxiaporfina), producto que es altamente requerido por la industria farmacéutica para la elaboración de medicamentos y la industria de alimentos para la preparación de bebidas e infusiones (GALVEZ, 1990).

La germinación de semillas de boldo en forma natural es relativamente escasa, por características propias de la semillas. Un complejo problema de latencia no permite una inmediata germinación de las semillas. Al sembrar semillas sin tratamiento pregerminativo, la germinación demora entre uno a dos años, lo que dificulta y atrasa la producción de plantas en vivero.

Por lo expresado anteriormente, es de gran importancia realizar tratamientos a las semillas, que permitan mejores resultados para la obtención de plántulas, asegurando la preservación de la especie, una adecuada utilización en zonas áridas y semiáridas de nuestro recurso suelo, sumado a una ganancia económica obtenida de los bosques nativos.

El presente proyecto está dirigido a mejorar los resultados obtenidos al aplicar un tratamiento pregerminativo en la semilla de boldo, remojo en ácido giberélico (GA3) (10 g/l) durante 24 horas (MUÑOZ, 1986), con el cual se logró 38.3% de germinación en 8 meses.

Para esto se determinará qué efecto sobre la germinación de boldo tiene la aplicación exógena de (GA3) en distintas concentraciones (Factor A) y tiempos de inmersión (Factor B) en la solución. Probando las siguientes hipótesis:

1) $H_0: A_0=A_1=A_2=A_3=0$;

las distintas concentraciones no tienen efecto sobre la germinación.

H_1 : al menos una A_i distinta de cero.

2) $H_0: B_0=B_1=B_2=B_3=0$;

los distintos tiempos de inmersión no tienen efecto sobre la germinación.

H_1 : al menos un B_i distinto de cero.

3) $H_0: AB_0=AB_1...=AB_9=0$;

las distintas interacciones (tratamientos) entre los factores no tienen efecto sobre la germinación.

H_1 : al menos un AB_i distinto de cero.

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido giberélico (GA3) y tiempo de remojo, sobre la germinación de semillas de boldo (*Peumus boldus* Mol).

2.2.- Objetivos específicos

↗ Identificar, de las concentraciones a ensayar, cuál es la más adecuada para la germinación.

↘ Identificar, de los tiempos de remojo a ensayar, cuál es el más adecuado para la germinación

De la interacción de las distintas concentraciones y tiempos de remojo a ensayar, determinar cual es la más adecuada para la germinación.

✂ Verificar si la aplicación de ácido giberélico, aumenta y/o acelera la germinación de semillas de *Peumus boldus* Mol.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.- Antecedentes generales sobre el boldo y sus semillas

Es un árbol endémico de Chile, crece en diversas condiciones y se adecúa a largos períodos de sequía, mezclándose muchas veces con otras especies semi-xerófitas de Chile central. En quebradas más o menos húmedas, se asocia principalmente con avellano (*Gevuina avellana*), arrayán (*Luma apiculata*), pelú (*Sophora microphylla*) y naranjillo (*Citronella mucronata*), todos componentes del bosque que se encuentra en faldeos cordilleranos hasta los mil metros de altura (RODRÍGUEZ, 1987).

El boldo pertenece a la familia Monimiaceae y al género Peumus Pers., del cual es su único representante. Esta especie presenta una amplia distribución que cubre la zona centro-sur del país. Su límite norte se encuentra en los 30° Latitud Sur (Bahía de Tongoy, IV Región). De allí se desplaza por la cordillera de la Costa hacia el sur y lentamente amplía su distribución hacia la precordillera andina. Aquí su límite norte es 33-34° Latitud Sur (Santiago, Región Metropolitana). Hacia el sur crece en ambas cordilleras y en el Valle Central hasta la latitud del río Damas en Osorno (X Región) (41° Latitud Sur). La región de mayor frecuencia del boldo son las provincias centrales entre Curicó (VII Región) y Bío-Bío (VIII Región) (KANNEGIESSER, 1987).

En su distribución norte el hábitat preferido por el boldo son las laderas de exposición norte, lugares de poca humedad, sitios pedregosos y suelos de textura gruesa (HOMANN y MATTE, 1967). Tiene bajos requerimientos de precipitaciones, especialmente si está en valles y quebradas subsiste con 200 mm/año, además de la presencia de neblinas costeras (HOMANN, 1969).

HOFFMANN (1981), describe el boldo como un arbusto o árbol pequeño, siempreverde, frondoso, con una copa esférica y de follaje denso. Su corto tronco, hasta 1 m desde el suelo, está cubierto por una corteza gris-parda, delgada que se va haciendo más rugosa y agrietada a medida que el árbol

envejece. La copa de éste se compone por abundantes ramas cilíndricas y ramillas en las que se encuentran las hojas dispuestas en forma opuesta. Las hojas, son laminadas coriáceas, perennes, de pecíolo corto, elípticas a oblongas, de borde entero, revolutas cuando crecen al sol y planas en la sombra, brillantes, ásperas y aromáticas. La cara superior es de color verdeoscuro, cubierta densamente de glándulas que contienen aceites esenciales, y pelos estrellados rígidos y con la nervadura profundamente hundida. El envés es de color más claro, pubescente con pelos fasciculados rígidos y de nervadura muy marcada (KANNEGIESSER, 1987).

El boldo es una especie dioica, con flores unisexuales de color blanco-amarillento, dispuestas de 5 a 12 en inflorescencias en racimos terminales o axilares. Las flores masculinas o estaminadas presentan numerosos estambres, los que en la flor femenina, pistilada y más pequeña, están representadas por escamas nectaríferas (KANNEGIESSER, 1987).

Florece entre junio-agosto. Sus frutos maduran entre diciembre-enero y corresponde a drupas carnosas y jugosas de gusto agradable, con estructura oval de 5-7 mm de largo y color amarillo verdoso cuando madura. Los frutos son comestibles (HOFFMANN, 1981).

La regeneración de boldo es, en su mayoría, vegetativa, es decir, está compuesta por retoños de tocones explotados. Esto por una parte se debe a la intervención que han sufrido estos bosques, ya sea, tala para despejar tierras destinándolas a la agricultura (LABBE, 1989); como también la corta para la producción de leña y carbón (DONOSO, 1990). El despeje de bosques también ha sido necesario para la construcción de caminos y el establecimiento de áreas urbanas. Más recientemente, la producción de madera para celulosa ha significado el reemplazo de los bosques nativos por plantaciones de especies exóticas (varios autores; citados por LABBE, 1989), y por otro lado, se debe al bajo porcentaje de germinación de las semillas de boldo en forma natural.

Las semillas de esta especie presentan latencia combinada. Existen varios factores que se suman para dar como resultado una latencia profunda. El balance en el sistema promotor- inhibidor (Giberelinas (GAs)-Acido abscisico (ABA)) es el aspecto más importante en la germinación de boldo. El ácido giberélico (GA3) parece estar en cantidad adecuada cuando la semilla está

recién cosechada, pero luego durante su almacenamiento parece disminuir y entonces sólo se logrará germinación con la aplicación exógena de este promotor, o bien con una prolongada estratificación. Otros factores que, en menor proporción, contribuyen a la latencia de esta especie son: cierta resistencia mecánica al crecimiento del embrión por parte del endocarpio y escaso desarrollo morfológico del embrión (MUÑOZ, 1986).

Las cubiertas de estas semillas, siendo permeables al agua, retrasan la llegada de ésta al embrión. Semillas con testa dañada germinaron *in vitro* en un 70%, comparando con el 42% de aquellas a las que solamente se les extrajo el endocarpio (MUÑOZ, 1986).

La forma de las semillas es globosa ovoide, con un diámetro promedio de 6-7 mm (ver figura N°1). La producción de semillas es abundante, facilitándose su recolección. El número de semillas por kg es aproximadamente de 6000 (HOMANN y MATTE, 1967).

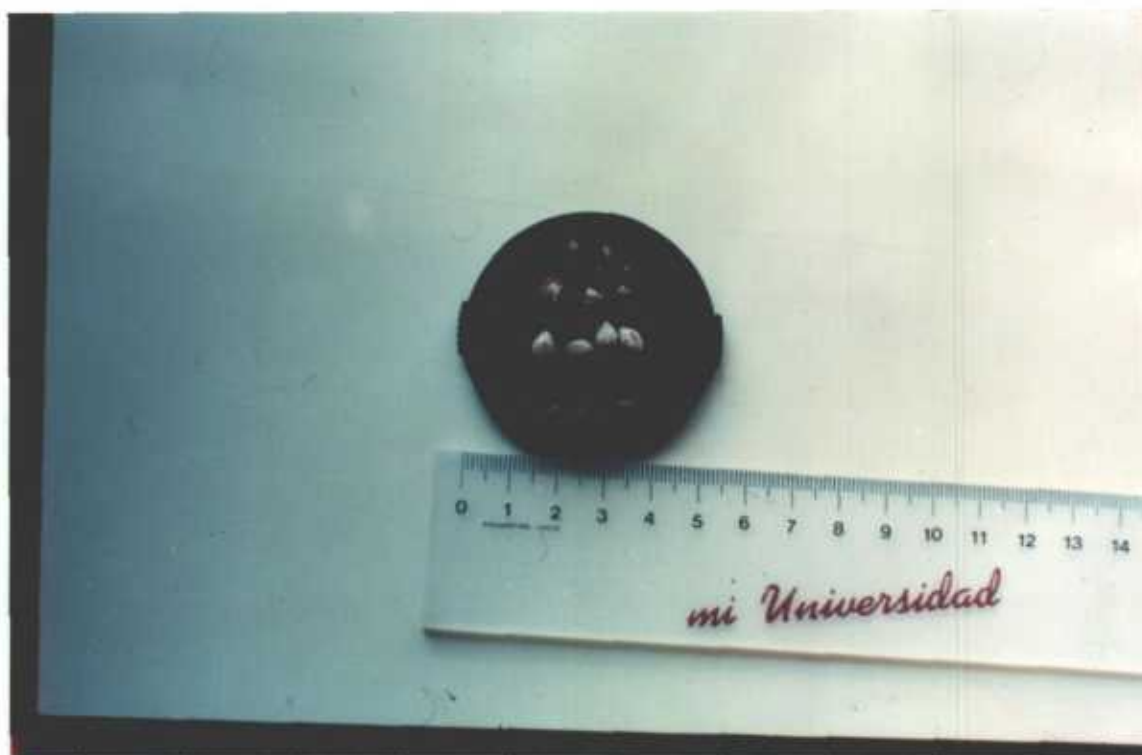


Fig. N° 1.- Se observa de abajo hacia arriba, frutos de boldo, semillas cubiertas con endocarpio, semillas con endocarpio partido, embriones y perisperma.

3.2 .- Aspectos generales de la propagación por semillas

3.2.1 Germinación de semillas

Al estudiar la fisiología de la germinación, se considera como germinada toda semilla en la que la radícula ha emergido tras romper las cubiertas; ello es debido al brusco cambio que sufre el metabolismo interno de la semilla en tal momento. Pero en los ensayos de germinación se cuentan como semillas germinadas aquéllas que producen plántulas, capaces de dar lugar a plantas normales en condiciones favorables de cultivo (BESNIER, 1989).

Según Mc Donough (1977), citado por MUÑOZ (1986), el proceso germinativo ocurre en cuatro fases:

- 1.- Imbibición, que es la toma de agua, principalmente por los componentes proteicos de la semilla.
- 2.- Hidratación y activación de los mecanismos sintéticos e informales (ácidos nucleicos y enzimas).
- 3.- Crecimiento y división celular.
- 4.- Germinación propiamente tal.

Según BESNIER, (1989) esta primera fase, denominada imbibición, está relacionada con la diferencia de potencial hídrico existente entre la semilla y el sustrato húmedo en el que éstas se encuentran. Constituye un fenómeno puramente físico que tiene también lugar en semillas muertas o aletargadas y va acompañado por un desprendimiento de calor.

Después de la imbibición, para que continúe la germinación, los complejos compuestos insolubles de reserva deben ser digeridos enzimáticamente para formar materias solubles más simples y trasladados a las regiones de crecimiento donde son asimilados para proveer energía para el crecimiento o para su conversión en nuevo material celular (HARTMANN y KESTER, 1981)

ROSS y SALISBURY, (1994), señalan que después de la formación o activación enzimática, se produce el alargamiento de células de la radícula seguida por la protusión radicular de la testa de la semilla y el subsecuente crecimiento de la plántula.

Se debe considerar que para que se produzca la germinación, es necesario cumplir con tres requisitos básicos. Primero: la semilla debe ser viable; esto es, el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar. Segundo: la semilla debe ser puesta en condiciones ambientales favorables, siendo los factores esenciales, disponibilidad de agua, temperatura adecuada y provisión de oxígeno. Tercero: cuando las condiciones ambientales externas son favorables, deben superarse las condiciones internas que provocan latencia de semillas e impiden la germinación (HARTMANN y KESTER, 1981).

3.2.2 Factores externos necesarios para la germinación.

a. Exigencia de luz para la germinación

De las condiciones externas (factores ambientales) que impiden la germinación BIDWELL (1990), señala que la exigencia de luz para la germinación de muchas semillas es, presuntamente, un mecanismo que impide la germinación de semillas pequeñas enterradas muy profundamente, tanto que agotarían sus reservas antes de alcanzar la superficie y poder ser autótrofas. Pero no todas las semillas requieren luz para germinar; algunas no son afectadas y unas pocas son inhibidas por la luz.

b. El agua

Los procesos fisiológicos de las células vivas se producen principalmente en medio acuoso, y no habrá germinación si la semilla no puede absorber agua del ambiente. Aunque las semillas para germinar necesitan cierta cantidad de agua libre en el sustrato, un exceso de agua puede llegar a disminuir o detener la germinación en el caso de semillas muy sensibles al agua. Esto no sólo porque se establece una limitada difusión de oxígeno, si no que también se puede ver favorecido el desarrollo de múltiples poblaciones de microorganismos en el tegumento, los que a su vez podrían competir con el embrión por el oxígeno disponible (MALDONADO, 1990).

Los dos factores más importantes que afectan la absorción de agua por las semillas son: la naturaleza de las semillas y sus cubiertas; y la cantidad de agua disponible en el medio circundante, que puede afectar tanto al porcentaje de germinación como a la energía germinativa (HARTMANN y KESTER, 1981).

c. La temperatura

La temperatura es tal vez el factor ambiental de mayor importancia en la regulación del proceso de germinación y posterior crecimiento de la plántula. La germinación sólo se produce dentro de unos límites de temperatura bastante reducidos (entre 20 y 30 °C), aunque estos valores varían ampliamente según las diferentes especies y procedencias. El efecto desfavorable se produce por sobre el límite máximo de temperaturas en las últimas fases de la germinación, debido a la coagulación de sus proteínas y enzimas de la plántula. La temperatura además ejerce un marcado efecto sobre la velocidad de entrada de agua en la semilla: la absorción de agua es tanto más rápida cuanto más alta es la temperatura (JAMES, 1976).

d. El oxígeno

HARTMANN y KESTER (1981), señalan que el efecto de una provisión reducida de oxígeno sobre la germinación puede ser importante. Si su cantidad es limitada, puede retardar o inhibir completamente la germinación. En almácigos con drenaje deficiente, después de una lluvia copiosa o un riego excesivo, la provisión de oxígeno puede disminuirse debido a que los espacios porosos del medio de germinación están llenos de agua en lugar de aire. Además se debe considerar que todas las semillas viables respiran, para lo cual es necesario una adecuada provisión de oxígeno. En las semillas que no están germinando, la respiración es baja y se necesita poco oxígeno, durante la germinación la respiración aumenta y se utiliza considerablemente más oxígeno.

3.2.3. Factores internos que causan latencia.

La latencia de las semillas es un factor biológico determinante, ya que retarda la germinación hasta que las condiciones del medio sean favorables para el desarrollo de las plantas WEAVER (1976).

Los factores internos que provocan latencia se pueden clasificar en: latencia provocada por las cubiertas de la semilla (influencia de algunas cubiertas de la semilla sobre el embrión), latencia embrionaria (condiciones existentes dentro del embrión), latencia causada por un inhibidor (inhibición química causada por sustancias específicas de alguna parte de la semilla o del fruto) y latencia combinada (provocada por dos o más tipos de latencia) (HARTMANN y KESTER, 1981).

3.2.3.1.- Latencia de cubiertas

a. Cubiertas impermeables de semillas

Las semillas duras, con cubiertas impermeables, no pueden germinar mientras se mantenga tal impermeabilidad al agua, al oxígeno o ambas, ya que es el primer requisito para la iniciación de la germinación. Además la impermeabilidad de la semilla es un impedimento a la salida de inhibidores desde el embrión, o bien la cubierta puede aportar inhibidores al embrión (BESNIER, 1989).

b. Cubiertas o integumentos de semillas mecánicamente resistentes a la expansión del embrión

En la mayoría de las semillas, una vez que se ha absorbido el agua, la presión que ejerce el embrión en expansión durante la germinación, es suficiente para romper la cubierta de las semillas. Sin embargo, las cubiertas pueden ofrecer resistencia mecánica al embrión. Es probable que ésta no sea la única causa que determina la latencia de estas semillas, pero puede ser un factor que retarda la germinación de las semillas con cubiertas duras, con endocarpios, o con pericarpios endurecidos (HARTMANN y KESTER, 1981).

c. Cubiertas de las semillas que restringen el intercambio gaseoso al embrión

Según BIDWELL (1990), la cubierta de algunas semillas es casi impermeable a la difusión de gases, lo que provocaría que el embrión se mantiene en condición de letargo por falta de oxígeno. Este oxígeno puede ser necesario para las reacciones en el rompimiento de los inhibidores que causan letargo o para la síntesis de promotores de crecimiento que lo rompen. Otra posibilidad es que la cubierta pueda impedir que salga al exterior un inhibidor difusible.

3.2.3.2.-Latencia embrionaria

a. Embriones morfológicamente inmaduros

Es importante señalar que la inmadurez morfológica del embrión es una de las causas de latencia embrionaria en las semillas, suele encontrarse en especies y géneros aislados de diversas familias; por otra parte, algunas veces sólo se presenta en semillas producidas en muy altas latitudes. Todo esto hace pensar, que este fenómeno se debe a un mecanismo de adaptación de las especies (BESNIER, 1989).

b. Embriones rudimentarios

La otra causa de latencia embrionaria son los embriones rudimentarios. Muchas especies de plantas tienen semillas en las que los embriones no se desarrollan tan rápidamente como los tejidos contiguos, de modo que cuando las semillas se desprenden de la planta madre, los embriones están todavía imperfectamente desarrollados. En algunas especies, las semillas maduras contienen embriones que apenas han cumplido la etapa del huevo fertilizado, mientras que en otras especies el desarrollo de los embriones es casi completo en el momento en que maduran las semillas. La germinación de tales semillas está necesariamente impedida, hasta que se completa la formación del embrión (ANDERSON et al., 1972).

3.2.3.3.- Latencia fisiológica o interna

a. Presencia de inhibidores de la germinación

HARTMANN y KESTER (1981), señalan que los inhibidores son otra causa que produce latencia en semillas. Las sustancias que inhiben la germinación pueden ser extraídas de una diversidad de partes de la planta, incluyendo raíces, bulbos, savia de la hoja, frutos y semillas, en el caso de las semillas con letargo interno, las sustancias inhibidoras que actúan sobre la germinación pueden estar en la testa, en el endosperma, o en el propio embrión, presentando además distintos grados de letargo. Alguno de los inhibidores de la germinación que ocurren naturalmente, han sido identificados como sustancias químicas específicas: amoníaco, etileno, aceites esenciales, alcaloides, ácidos parascorbico y otros, pero las principales sustancias que intervienen en forma endógena en la latencia, son por un lado las giberelinas como promotores y ácido abscísico como inhibidor.

3.2.3.4.-Latencia combinada

a. La combinación de dos o más tipos de latencia

Existe un grupo de semillas en que la latencia es impuesta tanto por las cubiertas de las semillas, como por el embrión, cuando esto ocurre se habla de latencia combinada. Por ejemplo en *Prunus armeniaca* (damasco) la latencia depende principalmente de la membrana endospermal y del cuesco (endocarpio). Sin embargo, también es posible que sustancias inhibidoras cumplan un rol esencial en la latencia, particularmente el ácido hidrocianico, que se ha encontrado en la testa de muchos frutales (Nikolaeva, 1969; citado por MUÑOZ, 1986)

Después de haber mencionado las causas que provocan latencia en semillas es importante señalar que para distinguir entre los dos factores (internos y externos) que impiden la germinación, los fisiólogos han utilizado dos términos: **quiescencia**, que es la condición de una semilla que no

puede germinar sólo porque no dispone de condiciones externas adecuadas, y **latencia**, que es la condición de una semilla que no puede germinar por condiciones internas, aún cuando las condiciones externas sean favorables (ROSS y SALISBURY, 1994).

3.2.4 Tratamientos utilizados para superar latencia en semillas

Muchas clases de semillas, aparentemente maduras, fracasan en la germinación, aún en el caso de ser favorables todos los factores ambientales. En tales semillas, la reanudación del crecimiento por el embrión está detenido por condiciones existentes en las mismas semillas. Es por esto que para obtener un alto porcentaje de germinación, se deben someter estas a un tratamiento pregerminativo, el cual depende del tipo de latencia que presenten (ANDERSON et al., 1972).

3.2.4.1 Tratamientos para superar latencia impuesta por cubiertas de la semilla

La escarificación es cualquier proceso de rompimiento, raspado o alteración mecánica de la cubierta de las semillas para hacerlas permeables al agua o los gases (HARTMANN Y KESTER, 1981).

ANDERSON et al. (1972), sugieren que siempre que el letargo provenga de cualquier causa vinculada a los tegumentos seminales, puede ser interrumpido por escarificación. La escarificación mecánica causa la ruptura o debilitamiento de los tegumentos, lo suficiente como para permitir la germinación, sin embargo, es esencial que el método no lesione al embrión. En condiciones naturales, la latencia de tales semillas se rompe por el lento deterioro de las cubiertas seminales, debido a la acción alternada de heladas y deshielos.

Otro tipo de escarificación es la química, muy utilizada en laboratorio, cuando es necesario, se puede utilizar alcohol u otros solventes de grasas (que disuelven los materiales cerosos que a veces bloquean la entrada de agua) o ácidos concentrados (ROSS y SALISBURY, 1994). El ácido sulfúrico es ampliamente utilizado, en forma concentrada para estos fines, lográndose buenos resultados a nivel de la cubierta (COPELAND y McDONALD, 1985)

El remojo a temperaturas que varían entre 75 y 100 °C, se emplea en semillas con cubiertas duras y/o impermeables. El remojo en agua a temperatura ambiente se emplea para eliminar o remover inhibidores presentes en la cubierta (CABELLO, 1987).

3.2.4.2 Tratamientos para superar latencia impuesta por el embrión de la semilla

Los propósitos de la estratificación a bajas temperaturas son obtener la postmaduración de los embriones latentes y modificar las cubiertas de las semillas. Esta estratificación consiste en someter las semillas a temperaturas de 0° a 10° C, con adecuada humedad y aireación por un período de tiempo previo a la germinación. Este tratamiento es efectivo para obtener una germinación pronta y uniforme de muchas semillas de árboles y arbustos leñosos que tienen embriones latentes. Sin este tratamiento, las semillas de estas especies, en particular, germinan despacio e irregularmente (HARTMANN y KESTER, 1981).

La estratificación fría, provoca una disminución en los niveles de ácido abscísico (ABA), lo que ayuda en el proceso de germinación, aunque esta disminución también se puede lograr con remojo en agua de la semilla a temperatura ambiente (BEWLEY y BLACK, 1985).

Aunque generalmente, la estratificación se asocia con la aplicación de frío húmedo (estratificación fría) imitando las condiciones naturales a que se encuentran sometidas las semillas, luego de ser dispersas, también se emplea como tratamiento pregerminativo la aplicación de temperaturas altas en sustrato húmedo (estratificación cálida) (CABELLO, 1987). Cuando la latencia se relaciona con un bajo desarrollo morfológico del embrión, ésta es superada con tratamiento húmedo a temperaturas altas (Nikolaeva, 1969: citado por MUÑOZ, 1986)

Experimentos con hormonas exógenas han demostrado que la dormancia de muchas semillas puede ser superada mediante la aplicación de giberelinas, citoquininas y etileno (BARCELO et al., 1983)

BALDINI (1992), señala que la aplicación de giberelinas a las semillas modifica su cuadro hormonal y permite su pronta germinación; con este tratamiento aplicado a algunas drupáceas, ha sido posible eliminar la post-maduración y obtener un crecimiento más rápido de la plántula.

Existen algunos métodos aplicables a semillas recién cosechadas para romper la latencia, como son: el almacenamiento en seco (el objetivo es postmadurar ciertas semillas que recién cosechadas están latentes); las temperaturas especiales o combinación de temperaturas (el propósito es mantener ciertas temperaturas para estimular la germinación) y el remojo en una solución de Nitrato de Potasio, el cual estimula la germinación de muchas semillas latentes recién cosechadas (HARTMANN Y KESTER, 1981).

3.2.4.3 Tratamientos para superar latencia combinada de semillas

El objetivo es combinar dos o más tratamientos pregerminativos para superar la latencia impuesta tanto por las cubiertas de las semillas como por el embrión (HARTMANN y KESTER, 1981)

Gordon y Rowe (1982); citados por MUÑOZ (1986), señalan que para *Crataegus monogyna*, que presenta latencia profunda a causa de la testa, es necesario aplicar 8 semanas de estratificación cálida, para debilitar la testa y luego 8 - 12 semanas de estratificación fría para superar la latencia embrionaria.

MUÑOZ (1986), señala que las semillas de boldo presentan latencia combinada, el balance en el sistema promotor-inhibidor (GA-ABA) es el aspecto más importante a considerar, por eso es necesario para lograr germinación la aplicación exógena del promotor (GA3), o bien una prolongada estratificación. Otros factores que en menor grado contribuyen a la latencia de esta especie son: resistencia mecánica del endocarpio al crecimiento del embrión y escaso desarrollo morfológico de éste.

3.3.- Reproducción del boldo

3.3.1 Propagación sexuada

La reproducción de boldo comienza a ser estudiada por HOMANN en 1969, éste realizó distintos tratamientos pregerminativos a los frutos, que posteriormente sembró en vivero e invernadero, consistentes en: estratificación fría-seca a 3 ± 1 °C, durante 3 semanas; escarificación mecánica, lijando el endocarpio hasta el endosperma, sin dañar el embrión; y por último eliminación de cubierta carnosa (epicarpio y mesocarpio). La mayor germinación (19%), la obtuvo de semillas estratificadas (3 semanas a 3 ± 1 °C) sembradas en el vivero, un año después de la iniciación del ensayo.

Donoso y Cabello (1978); citados por BOTTI y CABELLO (1990), efectuaron un ensayo de germinación en semillas de boldo, por período de 30 días, consistente en: régimen de 16 horas a 20 °C en oscuridad y 8 horas a 30 °C con luz, colocando las semillas en papel filtro húmedo. Los resultados obtenidos fueron negativos, obteniendo 0% de capacidad germinativa.

Posteriormente Mancinelli et al., (1982); citados por MUÑOZ (1986), analizaron la germinación de boldo durante tres temporadas consecutivas de fructificación, 1976-1977, 1977-1978, 1978-1979, por medio de la siembra de frutos colectados periódicamente entre Diciembre y Abril. Independiente de la fecha de recolección, la germinación solo ocurrió entre Invierno-Primavera. La tasa de germinación aumentó progresivamente hasta alcanzar una máxima y luego fue seguida de una fuerte inhibición producida por latencia. Se observaron tasas de germinación muy variables desde 1.25 hasta 100%. La tasa de germinación de 100% se obtuvo después de dos años. Sin embargo, durante el primer año los porcentajes variaron desde 0 hasta 89%.

Rodríguez et al., (1983); citados por KANNEGIESSER (1987), realizaron diversas investigaciones con el objeto de conocer más detalles sobre la semilla de boldo y acerca de los factores que afectan su germinación. En sus conclusiones señala que el pericarpio del fruto, al igual que la hoja, contienen terpineol y eugenol, ambos aceites esenciales que probablemente presenten un efecto inhibidor de la germinación.

MUÑOZ (1986) aplicó los siguientes tratamientos pregerminativos: remojo en agua hirviendo por 3 minutos; remojo en ácido sulfúrico por 40 y 90 minutos; remojo en peróxido de hidrógeno por 24 y 96 horas y remojo en ácido giberélico por 24 horas con concentraciones de 1, 5 y 10 g/l. En este caso los mejores porcentajes de germinación se obtuvieron con el remojo en ácido giberélico siendo mayores a medida que se aumento la concentración. Después de 8 meses en vivero se lograron valores de germinación de 38,3% con 10 g/l, 26,3% con 5 g/l y 11% con 1 g/l. Es probable que estos valores de germinación se puedan aumentar si se aplican concentraciones mayores de GA3 y/o períodos de remojo más prolongados .

MUÑOZ (1986), realizó diversos ensayos *in vitro*, en el primero se cultivaron semillas recién cosechadas en medio Heller con y sin GA3 (1 mg/l) exógeno, aparentemente contradiciendo la teoría propuesta del balance GA-ABA, ya que sólo se obtuvieron respuestas débiles de germinación. Sin embargo, se puede suponer que el ácido giberélico permitió el inicio de esta germinación, pero luego la composición de este medio nutritivo no fue capaz de sustentar el desarrollo posterior de estas plántulas. Los resultados de los otros ensayos realizados, donde se utilizó semilla almacenada y que lograron porcentajes de germinación usando embriones desnudos y embriones con endosperma, indican que al estar el tejido en contacto directo con un medio nutritivo, el embrión no necesita de GA3 para iniciar la activación de enzimas hidrolíticas que degraden el endosperma y los embriones germinan utilizando directamente el medio nutritivo.

Además MUÑOZ (1986), demostró que semillas cosechadas entre diciembre y febrero en el fundo Tantehue, ubicado a 30 km al suroeste de Melipilla, y sembradas inmediatamente, inician su germinación, en promedio, después de tres meses. Las semillas colectadas en diciembre entregaron mejores resultados de capacidad germinativa (44%) y energía germinativa (43.7% en 251 días).

BOTTI y CABELLO (1990), estudiaron la anatomía y desarrollo de la semilla de boldo y contribuyeron con nuevos antecedentes al conocimiento de la especie. Particularmente en lo que a reproducción sexuada se refiere, dentro de algunas de sus conclusiones señalan que a comienzos de diciembre el embrión presenta dos cotiledones diferenciados con un inicio de organización en el ápice radicular y en el brote; el endosperma ha comenzado a acumular sustancias de reserva y el endocarpio se presenta sumamente lignificado y duro. El proceso de maduración del fruto y la semilla continúan hasta febrero. A su vez, la mayor parte del volumen de la semilla madura corresponde al endosperma y perisperma, encontrándose el embrión incompletamente desarrollado. Finalmente señalan que el endocarpio constituye, probablemente, una barrera física que retrasa el proceso de germinación y el perisperma y testa podrían corresponder a barreras de tipo fisiológicas en este proceso.

3.3.2 Propagación asexual

La propagación asexual es la reproducción por medio de partes vegetativas de la planta, tales como raíces, ramas u hojas. En muchas plantas esto es posible debido a que las partes vegetativas separadas tienen la capacidad de regenerar, bien sea un nuevo sistema radicular, un nuevo sistema de ramas o ambos. La propagación asexual no implica cambios en la constitución genética de la nueva planta (HARTMANN y KESTER, 1981).

La regeneración natural de boldo es, en su mayoría, vegetativa, es decir, está compuesta por retoños de tocones explotados. Esto se debe al bajo porcentaje de germinación de las semillas (KANNEGIESSER, 1987). La brotación de los tocones de boldo es muy abundante, la mayoría de estos ejemplares han estado sometido a una intensa explotación; sin embargo, han vuelto a brotar, desarrollándose en formaciones de monte bajo, en grandes cantidades y con un crecimiento relativamente rápido (HOMANN y MATTE, 1967).

Actualmente dentro de las líneas de investigación del proyecto "Variabilidad de los compuestos activos en boldo (*Peumus boldus* Mol.) y factores que la afectan" se estudian métodos de multiplicación vegetativa, para permitir la clonación de individuos o poblaciones de interés.

3.4.- Antecedentes de las giberelinas

DAVIES (1987), señala que las giberelinas, potentes reguladores del crecimiento, son producidas como un subproducto metabólico del hongo *Gibberella fujikuroi*, que produce en el arroz un crecimiento excesivo de tallos y brotes. La primera demostración de su existencia y potencia fue dada por John W. Mitchell (1950), quién investigó hormonas vegetales de alta potencia de fuentes naturales, encontró que el líquido translúcido de las semillas recién

desarrolladas de frijol (7 a 9 días después de la fecundación) es una fuente extremadamente rica en hormona (giberelina) (MARTH et al, 1962).

ASCON-BIETO y TAYLON (1993), definen a las giberelinas en base a su estructura química, como una amplia familia de diterpenos ácidos cuyo esqueleto básico está constituido por un anillo de *ent*-giberelano. La síntesis de GAs se ha demostrado principalmente en frutos y semillas en desarrollo, y en menor medida en las regiones apicales de los brotes en crecimiento. Las semillas inmaduras de muchos vegetales contienen niveles de giberelinas relativamente elevados y en los tejidos vegetativos suelen ser mucho menores.

Las giberelinas actúan como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo en los vegetales superiores. ASCON-BIETO y TAYLON (1993), mencionan que la función hormonal que se otorga a las giberelinas se apoya en dos premisas básicas:

- a) Son compuestos orgánicos de las plantas.
- b) Su aplicación exógena produce una amplia variedad de respuestas en el desarrollo. La inducción del crecimiento del tallo, es probablemente, el efecto fisiológico más espectacular de las giberelinas.

Las giberelinas pueden causar el inicio de la germinación en semillas que generalmente requieren de estratificación fría (JACOBS, 1979). En los primeros ensayos de germinación con aplicación exógena de giberelinas, las semillas de algunas especies no fueron afectadas por la hormona. Ciertas investigaciones posteriores indicaron que la causa era que la sustancia no penetraba las cubiertas de la semilla (WEAVER, 1976).

La hormona más utilizada en ensayos de germinación dentro de las giberelinas, es el ácido giberélico (GA3), con su aplicación en forma exógena se han podido obtener resultados exitosos en la inducción de germinación de muchas semillas en latencia (HERRERA, 1984; POWELL, 1987).

3.4.1 Ensayos de germinación con remojo en ácido giberélico

Después del descubrimiento de las giberelinas, se aplicaron estas hormonas experimentalmente a semillas de varias especies leñosas. Estas pueden causar la inducción de la germinación en semillas que generalmente requerirían de tratamientos pregerminativos.

HILLIGER (1976), fue uno de los primeros investigadores en utilizar aplicación exógena de GA3 a semillas con la testa removida, aplicó distintas concentraciones de hormona 10000, 1000, 100, 10 y 0 ppm a semillas de palto (*Persea americana*), remojándolas durante 24 horas. Después de 60 días logró la germinación más temprana con las tres concentraciones más altas.

El humedecimiento de las semillas de roble (*Nothofagus obliqua*) y rauli (*Nothofagus procera*), en soluciones de 50, 100, 150 y 200 ppm de ácido giberélico durante 24 horas, tuvo un efecto altamente significativo en la tasa y porcentaje de germinación. Las semillas de roble germinaron entre los 8 y 14 días y las de raulí entre los 6 y 10 días, mientras que el testigo demoró 28 días en germinar (SHAFIQ, 1981).

Para semillas de roble (*Nothofagus obliqua*) resulta positiva la inmersión en solución de giberelina, a 0,025 g/l durante 15 ó 30 horas, alcanzando un porcentaje de germinación de 46%, aproximadamente mayor en 12% al testigo (34.66%). Los tratamientos con reguladores resultan ventajosos si se considera la economía en tiempo y su fácil aplicación en relación con algunos tratamientos tradicionales. (ROCUANT, 1983).

HERRERA (1984), en base a los resultados obtenidos por Krarup (1970), investigó el efecto del ácido giberélico en semillas de espárragos, sometidas a distintas temperaturas de germinación, concluye que el efecto de la hormona existiría en temperaturas inhibitorias de 35 °C, aumentando la germinación a medida que se incrementa la dosis de la hormona.

MUÑOZ (1986), concluye que para boldo una vez que la semilla ha madurado completamente se consigue la germinación, solamente con la aplicación exógena de ácido giberélico, y el porcentaje obtenido depende de la concentración de este promotor. Lo demuestra con su experiencia realizada, donde obtuvo 38,3%, 26,3% y 11% de germinación con concentraciones de 10, 5 y 1 g/l de GA3 respectivamente.

MARTÍNEZ et al. (1994), señalan que al analizar el efecto de ácido giberélico en la germinación de las semillas de coigue de magallanes (*Nothofagus betuloides*) se encontraron respuestas significativamente diferentes según el tiempo de inmersión de las semillas y la concentración de la solución del ácido giberélico, no incidiendo el tipo de semilla. La aplicación de ácido giberélico en concentración de 1 g/l favoreció la capacidad germinativa (21.94%) con respecto al testigo (16.25%), mientras que un tiempo de inmersión de 12 horas (24.55%) fue más favorable que un tiempo de 24 horas (15.22%) .

4.- METODOLOGÍA

4.1- Ubicación del Ensayo.

El ensayo se estableció el día 24 de Abril de 1996, en un invernadero de la escuela de Ingeniería Forestal de la Universidad de Talca, VII Región. El invernadero está confeccionado con tubos de PVC, forrado con polietileno para permitir una menor oscilación térmica en relación a los cubiertos por vidrio, pero proporcionando un buen aislamiento. Consta de una luminosidad adecuada, ventilación y sistema de riego programado, lo que permitió un óptimo control de las condiciones ambientales para la germinación. Las platabandas se encuentran en altura (aproximadamente 1 metro) donde se ubicaron las almacigueras, ver Figura N° 2.



Fig. N° 2.- Lugar físico de establecimiento del ensayo.

4.2- Semillas.

Se utilizaron semillas de boldo cubiertas por endocarpio (Figura N° 3). Su procedencia es del sector de Pencahue, ubicado aproximadamente a 15 Km. al Oeste de Talca, VII Región.

Los frutos fueron colectados en enero de 1996 desde los árboles, para luego ser procesadas en el laboratorio de la Universidad de Talca donde se maceraron por 3 - 4 días para quitarles la pulpa, luego se dejaron secar por 3 - 4 días a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenados, dentro de bolsas de plástico selladas, a temperatura de 4° C hasta el momento de su utilización, periodo que duró 4 meses.



Fig. N°3.- Semillas cubiertas por endocarpio utilizadas en el ensayo.

4.3- Bandejas.

Se utilizaron 6 almacigueras de poliestireno expandido de 286 cavidades cada una, el volumen de sustrato por celdilla es de 10 cm³, éstas poseen un orificio de drenaje en el fondo para permitir la salida de exceso de agua por riego. Según el fabricante, el uso de estas bandejas permite obtener plantulas más vigorosas y sanas, produciendo en definitiva un estado de desarrollo y de cosecha más uniforme y un mayor rendimiento.

Las bandejas fueron bañadas con un producto comercial (Resipol Cu) a base de sales de cobre, de tal forma que se produzca una poda química de raíces. Este compuesto tiene sales de cobre que mantienen las raíces en estado de latencia, pero al ser plantadas, éstas se reactivan rápidamente y reanudan su crecimiento.

4.4- Sustrato.

El sustrato utilizado fue arena, éste mantiene las condiciones de humedad y aireación necesarias para una germinación adecuada. Además es uno de los sustratos recomendados en las reglas internacionales para ensayos de semillas.

La arena se esterilizó a 100 °C durante 1 hora en una estufa de los laboratorios de la Escuela de Ingeniería Forestal.

4.5- Regulador de crecimiento.

La hormona utilizada como regulador de crecimiento corresponde al ácido giberélico (GA3). Esta hormona se preparó en una solución hidroalcohólica, para la cual se utilizó agua destilada y alcohol de 95° (recomendado para obtener una mejor disolución). Esta solución se aplicó en distintas dosis y tiempos de remojo a las semillas.

4.6- Tratamientos.

Los tratamientos ensayados (ver cuadro N°1) se obtuvieron de la combinatoria de los factores:

A: Concentración del promotor de germinación.

B: Horas de remojo en la solución.

Cuadro N° 1.- Tratamientos ensayados.

A \ B	24 horas	48 horas	72 horas
10 (g/l)	T1	T2	T3
15 (g/l)	T4	T5	T6
20 (g/l)	T7	T8	T9

A los tratamientos anteriores se agregó un testigo o control, cuyo único tratamiento fué remojo en agua durante 24 horas, éste se aplicó para detectar las semillas de mala calidad, a través del test de flote.

4.7- Cuidados culturales

Los cuidados consistieron en aplicaciones preventivas contra caracoles y babosas, fungicidas y riegos, los cuales se detallan a continuación.

Al inicio de la germinación se aplicó Mesurol (4-metiltio-3,5-xilil-metil carbamato), producto químico que atrae gasterópodos para alimentarse de los gránulos, los cuales le provocan la muerte en un corto período.

Aplicación de fungicidas: Se realizaron aplicaciones preventivas del fungicida Captan (N-((triclorometil)-Tio(-4ciclohexano 1,2 Dicarboximida))) en dosis de 1 g/l cada 15 días, este fungicida orgánico se caracteriza por su amplio espectro de acción sobre hongos patógenos. Además se revisó periódicamente el estado fitosanitario del ensayo para detectar cualquier ataque y corregirlo inmediatamente.

Riego : El riego se realizó con sistema de microaspersores controlados mediante un programador. La frecuencia e intensidad de riego fue determinada de acuerdo a los requerimientos diarios relacionados con las condiciones climáticas, para esto se realizaban 2 visitas diarias al ensayo, donde también se revisaban las temperaturas ambientales y del sustrato.

4.8- Variables evaluadas.

A continuación se describe cada una de las variables evaluadas:

- Capacidad germinativa: es el cociente correspondiente a la cantidad de semillas germinadas al finalizar el ensayo, en base al número total de semillas ensayadas, la capacidad germinativa se expresa como porcentaje.
- Sobrevivencia: es el porcentaje de plántulas vivas al término del ensayo, en relación al número total de semillas germinadas.

Además se midieron tres variables que miden el vigor o velocidad de la germinación.

- Valor máximo: corresponde al máximo cociente que se obtiene al dividir el porcentaje de germinación acumulado en cualquier día, por el número de días necesarios para obtener dicho porcentaje.
- Valor de germinación: se obtiene del producto entre el valor máximo y la media diaria de germinación.
- Energía germinativa: es el número de semillas germinadas hasta que la tasa de germinación toma el valor máximo en relación al número total de semillas de la muestra, se expresa en porcentaje.

4.9- Diseño Estadístico.

El diseño estadístico utilizado fue un muestreo en bloques completamente al azar (ver figura N°4). Para esto se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento. Como se vió en el punto 4.6 de este capítulo, de la combinatoria de los dos factores se obtuvieron 9 tratamientos más el testigo, con un total de 42 semillas por unidad muestral, lo que hace un total de 420 semillas por bloque, o sea 1.260 semillas en el ensayo, además se sembró una hilera borde para determinar algún ataque de agentes patógenos.

Previo al análisis de los datos porcentuales se procedió a la transformación a grados de los valores, usando la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Arcsen } \sqrt{X / 100}$$

donde:

X = Valores en porcentaje

Y = Valores transformados a grados

La transformación a grados de los valores porcentuales, se debe a que los datos basados en conteos expresados como porcentaje, deben someterse a la transformación angular o arcoseno, ya que tales datos poseen una distribución binomial, en vez de una distribución normal (LITTLE y JACKSON, 1976).

Los valores promedios por tratamiento, para cada una de las variables mencionadas anteriormente, fueron sometidos a análisis de varianza para detectar diferencias significativas entre ellos con $\alpha=5\%$. Cuando existió diferencia entre tratamientos se usó el test de Duncan como test de comparación de medias.

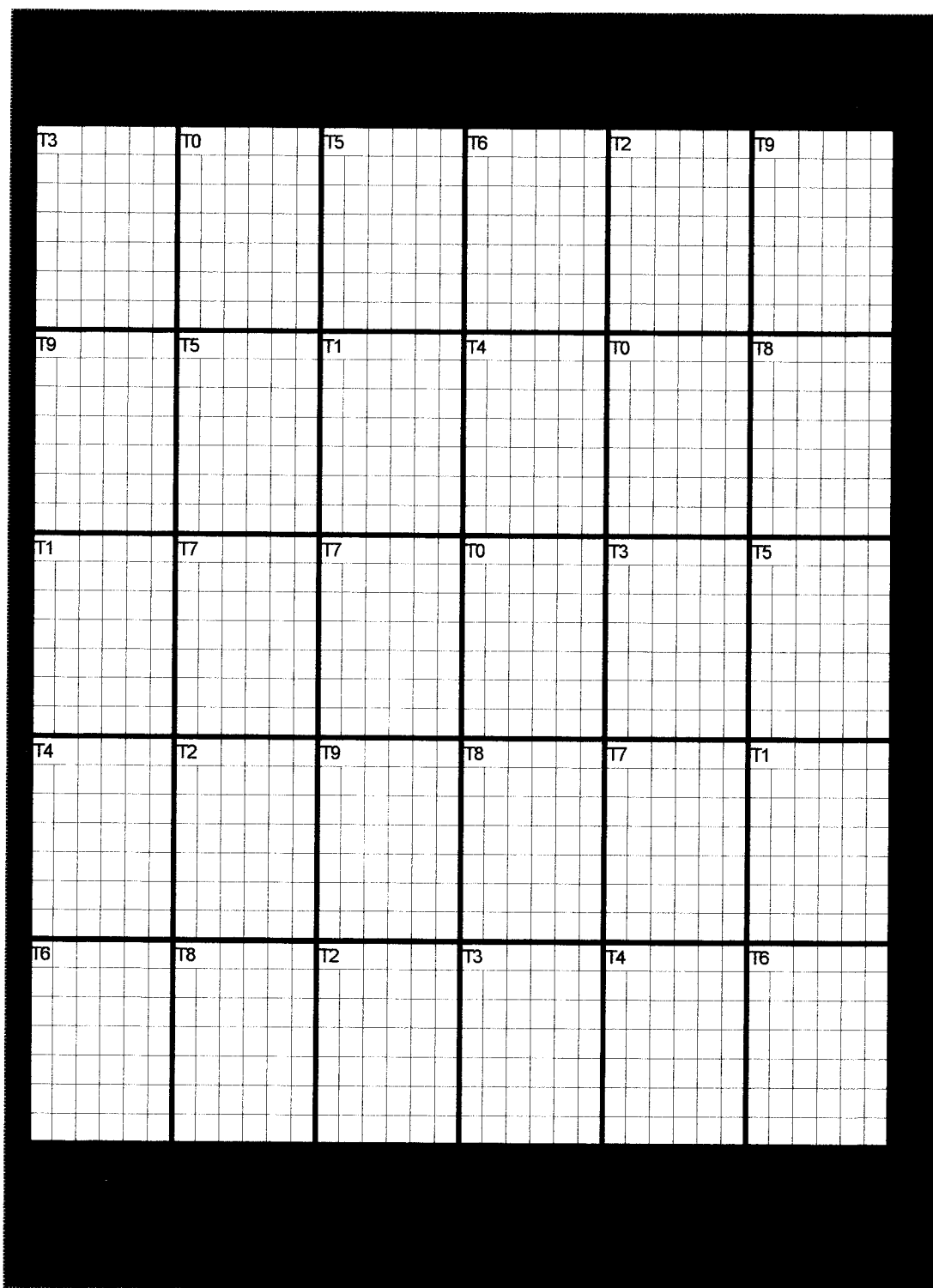


Fig. N° 4.: Distribución espacial de los tratamientos y bloques.

5. PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

En el presente capítulo se exponen los resultados y se analizan brevemente, un estudio más extenso se realizará en el siguiente capítulo número seis.

5.1 Capacidad germinativa

Se realizó un control diario para poder determinar con exactitud el día de inicio de la germinación de las semillas. Se esperaba aproximadamente un periodo de 4 meses antes de la germinación, en base al estudio de MUÑOZ (1986), lo cual no resultó lejano de la realidad, ya que la germinación se inició a los 4 meses y 5 días.

Considerando la fecha de establecimiento del ensayo (24 Abril) y la fecha de inicio de la germinación (28 Agosto), la evaluación de la capacidad germinativa se inició a los 125 días después de realizada la siembra, concluyendo el día 11 de Diciembre de 1996 que corresponde al día 230 después de establecido el ensayo.

Como se visualiza en la Fig. N° 5, de los diez tratamientos ensayados presentaron germinación solo los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T5 con 2,4; 15,1; 26,2; 0,8 y 0,8% respectivamente. En el cuadro N° 2 se observa que el inicio de la germinación se registra el día 28 de Agosto con el tratamiento N°1 (T1) que corresponde a remojo en ácido giberélico en dosis de 10 g/l durante 24 horas, luego el siguiente tratamiento en presentar germinación es el tratamiento 2 consistente en remojo en ácido giberélico durante 48 horas en dosis de 10 g/l.

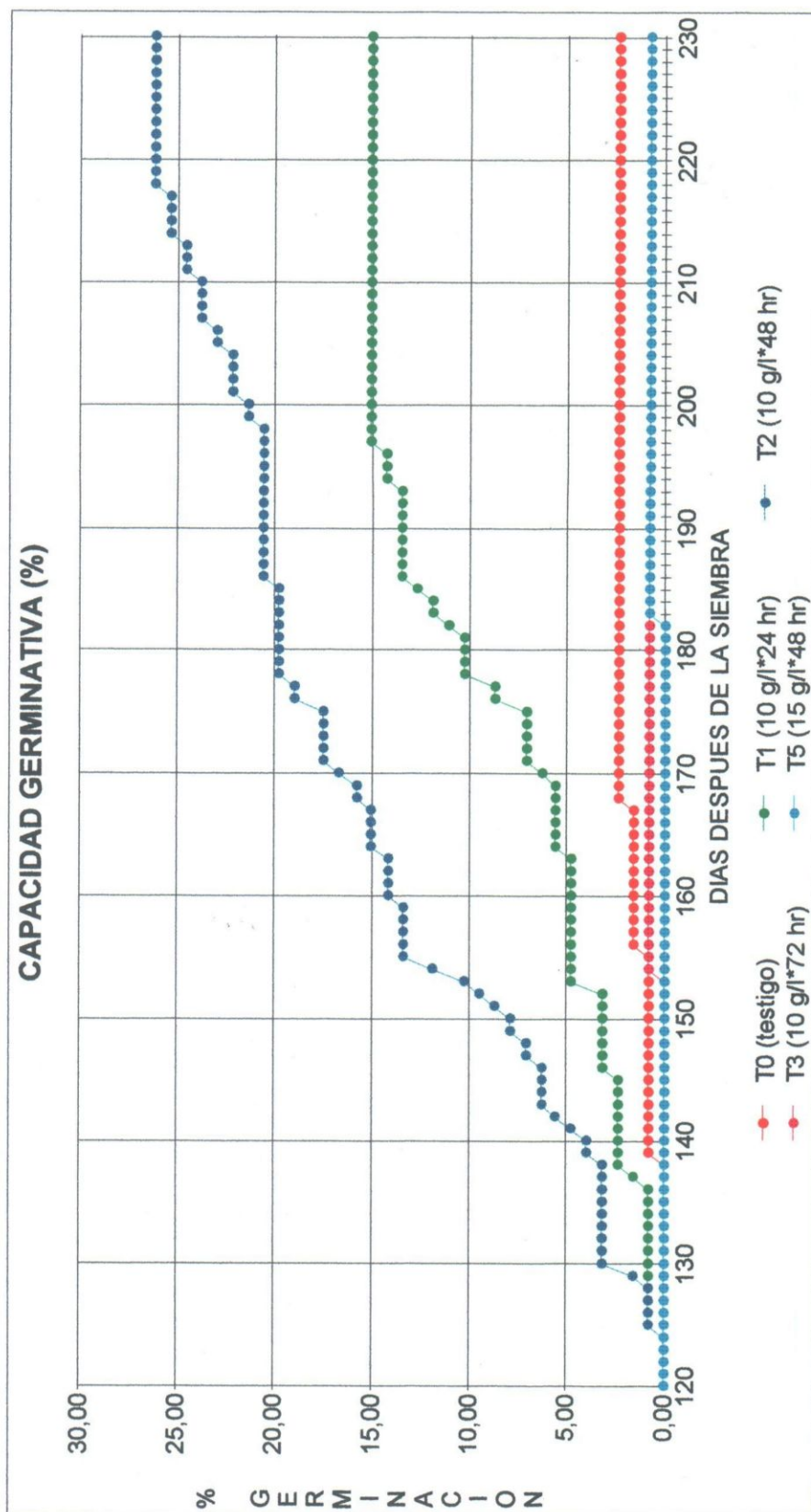


Fig. N° 5: Capacidad germinativa (%) para los distintos tratamientos

Cuadro N° 2: Inicio de germinación y días después de la siembra para los distintos tratamientos.

TRATAMIENTO	Inicio germinación	Días después de la siembra
T0 (testigo)	11- Septiembre - 1996	139
T1 (10 g/l*24 hr)	28- Agosto - 1996	125
T2 (10 g/l*48 hr)	31- Agosto - 1996	128
T3 (10 g/l*72 hr)	26- Septiembre - 1996	154
T4 (15 g/l*24 hr)	No presentó	No presentó
T5 (15 g/l*48 hr)	25- Octubre - 1996	183
T6 (15 g/l*72 hr)	No presentó	No presentó
T7 (20 g/l*24 hr)	No presentó	No presentó
T8 (20 g/l*48 hr)	No presentó	No presentó
T9 (20 g/l*72 hr)	No presentó	No presentó

En la Figura N° 6 se muestra la capacidad germinativa promedio para los distintos tratamientos, destacándose claramente los tratamientos T2 (10 g/l *48hr) y T1 (10 g/l *24hr) con las mayores capacidades germinativas.

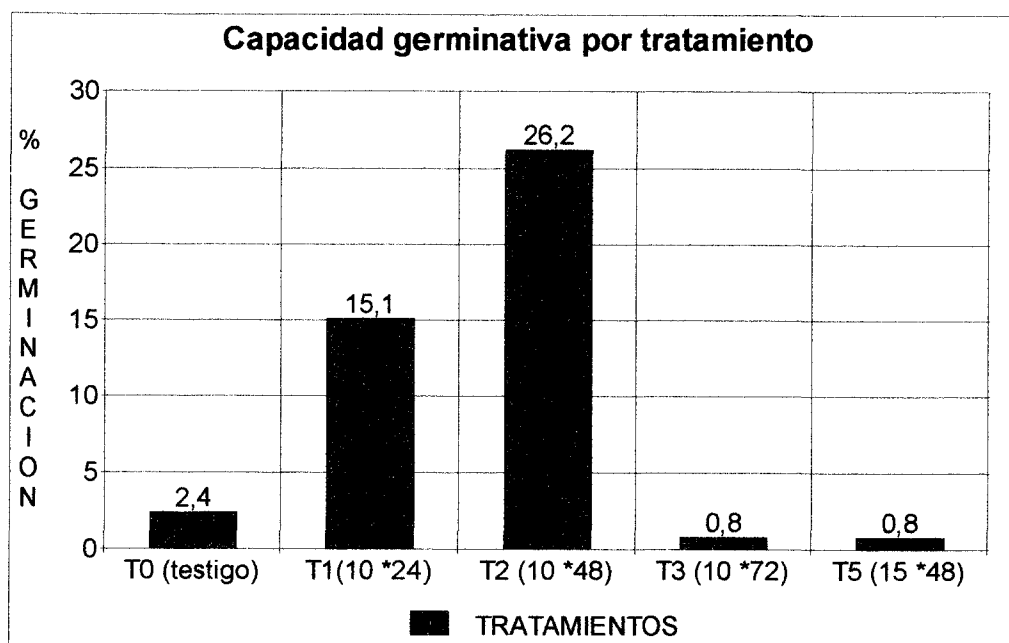


Fig. N°6: Capacidad germinativa promedio por tratamiento.

El análisis de varianza indica que para la variable capacidad germinativa existen diferencias significativas al nivel 0,05 entre los tratamientos (Cuadro N°3).

Cuadro N° 3: Análisis de varianza para la capacidad germinativa.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	MEDIA DE CUADRADOS	F calc.	F (0,05)	Pr > F
Entre Tratamientos	3302,48	10	330,24	36,33*	2,38	0,0001
A: Concentración	2023,93	2	1011,55	111,2*	3,52	0,0001
B: Tiempo	486,38	2	243,19	26,75*	3,52	0,0001
C: Bloque	31,05	1	31,05	3,41	4,38	0,0804
AB	761,16	4	190,29	20,93*	2,9	0,0001
Error	172,71	19	9,09			
Total	3475,19	29				

Como se observa en el cuadro N° 4 no existen diferencias significativas entre los tratamientos que no presentaron germinación (T4, T6, T7, T8 y T9) con los tratamientos T3 y T5 que obtuvieron un porcentaje de germinación de 0,8% cada uno; y estos últimos no presentan diferencias significativas con el testigo (T0). Se debe destacar del siguiente cuadro, que los tratamientos con mayor capacidad germinativa (T2 y T1) son significativamente superiores al resto de los tratamientos; existiendo además diferencia significativa entre ellos, por lo tanto, se concluye que el tratamiento 2 (10g/l *48 hr) es el más recomendable en base a la capacidad germinativa obtenida.

Cuadro N° 4: Resultados del test de Duncan para la capacidad germinativa

TRATAMIENTOS	CAPACIDAD GERMINATIVA (%)	GRUPOS HOMOLOGOS (*)
T2 (10 g/l *48hr)	26,2	a
T1 (10 g/l *24hr)	15,1	b
T0 (testigo)	2,4	c
T3 (10 g/l *72hr)	0,8	cd
T5 (15 g/l *48hr)	0,8	cd
T4 (15 g/l *24hr)	0	d
T6 (15 g/l *72hr)	0	d
T7 (20 g/l *24hr)	0	d
T8 (20 g/l *48hr)	0	d
T9 (20 g/l *72hr)	0	d

(*) letras minúsculas iguales no indican diferencia significativa al nivel 0.05.

5.2 Valor máximo

En el cuadro N° 5 se presentan los valores máximos promedios para cada tratamiento, indicando el día después de la siembra que se obtuvo esta variable.

Cuadro N° 5 : Valores máximos promedios por tratamiento

TRATAMIENTO	Valor máximo	Día despues de la siembra
T2 (10 gr/l * 48 hrs)	0.129	218
T1 (10 gr/l * 24 hrs)	0.079	197
T0 (testigo)	0.015	168
T3 (10 gr/l * 72 hrs)	0.005	154
T5 (15 gr/l * 48 hrs)	0.004	183
T4 (15 gr/l * 24 hrs)	0	0
T6 (15 gr/l * 72 hrs)	0	0
T7 (20 gr/l * 24 hrs)	0	0
T8 (20 gr/l * 72 hrs)	0	0
T9 (20 gr/l * 72 hrs)	0	0

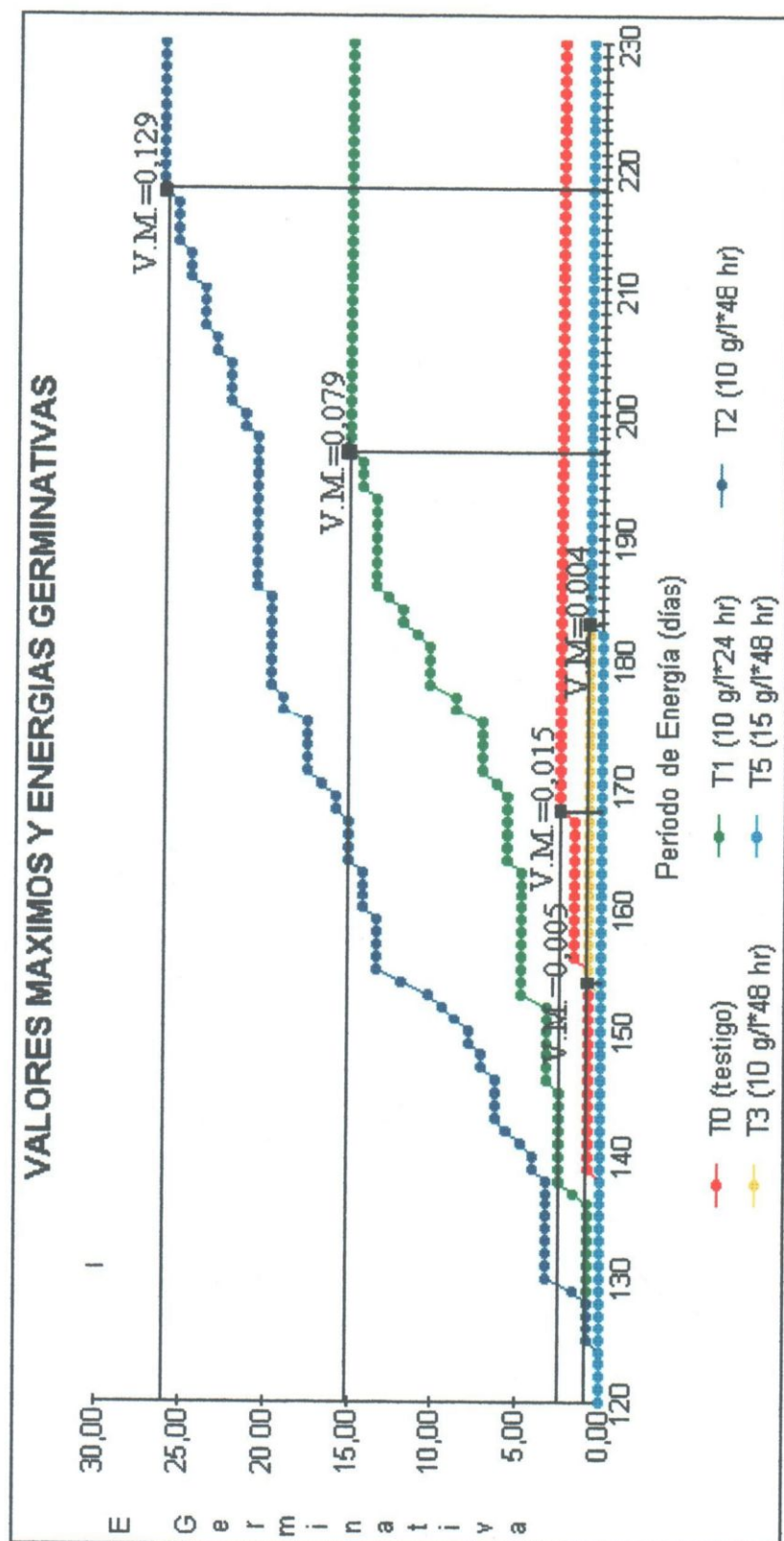
Los valores máximos tienen una estrecha relación con la capacidad germinativa. Es importante señalar que al aumentar la cantidad de hormona se podría producir un efecto dañino a la semilla, observación que se confirma al visualizar los tratamientos T4, T5, T6, T7, T8 y T9, en los cuales la concentración de hormona se aumento hasta 20 g/l y solo uno de estos tratamientos presentó germinación.

En la figura N° 7 se visualiza que hay una tendencia a aumentar en valor numérico a medida que el tiempo de remojo en la solución se prolonga, lo que se observa claramente en los tratamientos T2 y T1. Esto podría indicar que la velocidad de respuesta es mayor a medida que el período de remojo aumenta, posiblemente el ácido giberélico ingrese en mayor cantidad a la semilla cuando el tiempo de inmersión es mayor. Sin embargo, este efecto positivo se visualiza hasta ciertos rangos, ya que el tratamiento 3 (10 g/l*72 hr) en el que se aumentó el tiempo de remojo, disminuyó su valor máximo, por lo tanto, el valor máximo aumenta hasta ciertos rangos, en este caso tal vez se encuentre entre 48 y 72 horas de remojo.

El análisis de varianza con un nivel de confianza de 95% indica que para esta variable existen diferencias significativas entre los tratamientos y que hay interacción entre ellos (ver Cuadro N° 6).

Cuadro N° 6: Análisis de varianza para los valores máximos.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	MEDIA DE CUADRADOS	F calc.	F (0,05)	Pr > F
Entre Tratamientos	0,054	10	0,0054	55,79*	2,38	0,0001
A: Concentración	0,03	2	0,015	155,0*	3,52	0,0001
B: Tiempo	0,0083	2	0,0041	43,33*	3,52	0,0001
C: Bloque	0,00009	1	0,00009	1,00	4,38	0,3299
AB	0,0152	4	0,0038	20,93*	2,9	0,0001
Error	0,0018	19	0,000096			
Total	0,0558	29				



Al aplicar el test de rangos múltiples Duncan, se identificó la igualdad y desigualdad de medias (Cuadro N° 7).

Cuadro N° 7: Resultados del test de Duncan para los valores máximos

TRATAMIENTOS	VALOR MAXIMO	GRUPOS HOMOLOGOS (*)
T2 (10 g/l *48hr)	0,129	a
T1 (10 g/l *24hr)	0,079	b
TO (testigo)	0,015	c
T3 (10 g/l *72hr)	0,005	c
T5 (15 g/l *48hr)	0,004	c
T4 (15 g/l *24hr)	0	c
T6 (15 g/l *72hr)	0	c
T7 (20 g/l *24hr)	0	c
T8 (20 g/l *48hr)	0	c
T9 (20 g/l *72hr)	0	c

(*) letras minúsculas iguales no indican diferencia significativa al nivel 0.05.

Como se observa en el cuadro N° 7 el test de Duncan para los valores máximos nos entrega tres grupos homólogos, el tratamiento dos (**grupo homólogo a**) presenta diferencia de medias con todos los tratamientos, siendo este significativamente superior al resto, entonces se podría deducir que este tratamiento presenta los mejores resultados considerando que es el mayor valor numérico; el segundo grupo homólogo corresponde al tratamiento uno (**b**) el cual presenta desigualdad de medias con todos los tratamientos; y por último el grupo **c** que presenta valores cero y otros valores que estadísticamente no presentan diferencia significativa al nivel 0,05. con el cero

5.3 Energía germinativa

En el cuadro N° 8 se presentan los resultados de energía germinativa (%) y período de energía en días, estos resultados son idénticos a los obtenidos en la capacidad germinativa y valores máximos, donde el tratamiento 2 presenta un mayor valor de energía germinativa 26,2% en un período de 7 meses aproximadamente, al compararlo con el tratamiento 1, que es el que presenta el segundo valor más alto. Se puede visualizar que éste presenta un período de energía menor 197 días pero a su vez presenta 11,1% de germinación menos, por lo tanto, para una especie de difícil reproducción como el boldo, es más importante al momento de decidir por un tratamiento pregerminativo el parámetro de energía germinativa (%) que el período de energía (días).

Cuadro N° 8: Resultados de energía germinativa (%) , período de energía (días) y test de Duncan.

TRATAMIENTO	ENERGIA GERMINATIVA (%)	PERIODO DE ENERGIA (DIAS)	GRUPOS HOMOLOGOS (*)
T2 (10 g/l *48 hr)	26,2	218	a
T1 (10 g/l *24 hr)	15,1	197	b
T0 (Testigo)	2,4	168	c
T3 (10 g/l *72 hr)	0,8	154	cd
T5 (15 g/l *48 hr)	0,8	183	cd
T4 (15 g/l *24 hr)	0	0	d
T6 (15 g/l *72 hr)	0	0	d
T7 (20 g/l *24 hr)	0	0	d
T8 (20 g/l *48 hr)	0	0	d
T9 (20 g/l *72 hr)	0	0	d

(*) letras minúsculas iguales no indican diferencia significativa al nivel 0.05.

En ensayos donde la germinación es lenta y escasa, generalmente el valor máximo se obtiene cuando se ha logrado el mayor número de semillas germinadas, por esta razón las variables de energía y capacidad germinativa presentan los mismos resultados para este ensayo, ver Figura N°7.

El análisis de varianza por consecuencia para la energía germinativa es idéntico al obtenido por la capacidad germinativa ver cuadro N° 3.

5.4 Valor de germinación

El análisis de varianza con un nivel de confianza de 95% indicó que para el valor de germinación existe desigualdad de medias entre los tratamientos y que hay interacción entre los factores analizados (Cuadro N° 9).

Cuadro N° 9: Análisis de varianza para los valores de germinación.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	MEDIA DE CUADRADOS	F calc.	F (0,05)	Pr > F
Entre Tratamientos	13,93	10	1,39	34,09*	2,38	0,0001
A: Concentración	8,59	2	4,29	105,3*	3,52	0,0001
B: Tiempo	2,03	2	1,01	24,85*	3,52	0,0001
C: Bloque	0,14	1	0,14	3,58	4,38	0,074
AB	3,15	4	0,78	19,31*	2,9	0,0001
Error	0,77	19	0,04			
Total	14,71	29				

En el cuadro N° 10, se destaca que el mayor valor de germinación lo presentó el tratamiento 2 (10 g/l *48 hr) con un valor de 0,01446. De los valores obtenidos llama la atención lo pequeños que son numéricamente, se debe tener en cuenta que para ensayos en que el periodo de germinación es prolongado y la cantidad de semillas germinadas es escasa, los valores obtenidos deben ser bajos.

Al aplicar el test de rangos múltiples Duncan nos identificó la igualdad y desigualdad de medias entre los tratamientos estudiados, los tratamientos dos y uno presentan diferencias significativas con el resto incluso entre ellos (ver cuadro N° 10).

Cuadro N° 10: Valor de germinación para los distintos tratamientos

TRATAMIENTO	VALOR DE GERMINACION	GRUPOS HOMOLOGOS (*)
T2 (10 g/l *48 hr)	0,014446	a
T1 (10 g/l *24 hr)	0,005305	b
TO (testigo)	0,000157	c
T3 (10 g/l *72 hr)	0,000019	cd
T5 (15 g/l *48 hr)	0,000016	cd
T4 (15 g/l *24 hr)	0	d
T6 (15 g/l *72 hr)	0	d
T7 (20 g/l *24 hr)	0	d
T8 (20 g/l *48 hr)	0	d
T9 (20 g/l *72 hr)	0	d

(*) letras minúsculas iguales no indican diferencia significativa al nivel 0.05.

5.5 Sobrevivencia

Como se observa en el cuadro N° 11, de los cinco tratamientos que presentaron germinación (T0, T1, T2, T3, T5), cuatro de ellos presentan altos valores de sobrevivencia. Sin embargo, este valor debe relacionarse con el número de semillas germinadas. Por ejemplo, aunque el tratamiento N°5 presentó 100% de sobrevivencia, este valor corresponde a solamente una semilla germinada y por lo tanto no es representativo del tratamiento. El análisis posterior (ANDEVA), se realiza con la sobrevivencia promedio por tratamiento (Figura N° 8).

Cuadro N° 11: Número total de semillas germinadas, plantas sobrevivientes y porcentaje de sobrevivencia

TRATAMIENTO	SEMILLAS GERMINADAS	Plantas vivas al 10 / 12 / 96	% SOBREVIVENCIA
T0 (Testigo)	3	2	66
T1 (10 g/l *24 hr)	19	13	68
T2 (10 g/l *48 hr)	33	20	61
T3 (10 g/l *72 hr)	1	0	0
T4 (15 g/l *24 hr)	0	0	0
T5 (15 g/l *48 hr)	1	1	100
T6 (15 g/l *72 hr)	0	0	0
T7 (20 g/l *24 hr)	0	0	0
T8 (20 g/l *48 hr)	0	0	0
T9 (20 g/l *72 hr)	0	0	0

Al visualizar la figura N° 8 se puede estimar una sobrevivencia promedio cercana al 65%, en los tratamientos T0, T1, y T2, éstos son los que presentan el mayor número de semillas germinadas, por lo tanto el valor de la variable sobrevivencia es más representativa que para el caso de los tratamientos T3 y T5, en los cuales solo germinó una semilla por tratamiento.

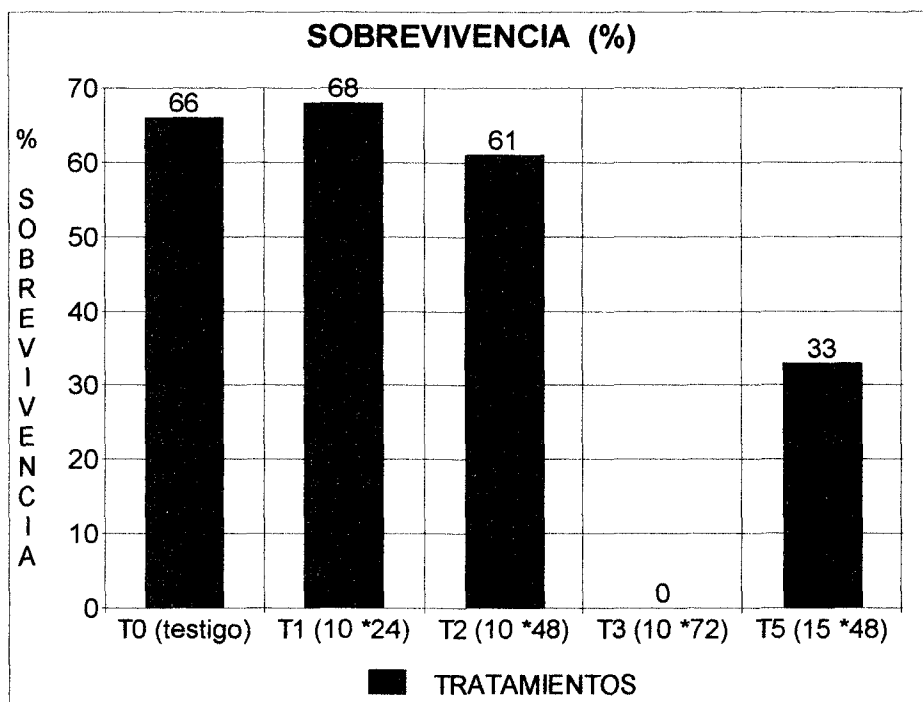


Fig. N° 8: Sobrevivencia (%) promedio por tratamientos

El análisis de varianza con un nivel de confianza de 95% indica que para la variable sobrevivencia existen diferencias significativas de medias entre los tratamientos ver cuadro N° 12.

Cuadro N° 12: Análisis de varianza para la sobrevivencia.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	MEDIA DE CUADRADOS	F calc.	F (0,05)	Pr > F
Entre Tratamientos	17275,34	10	1727,53	3,85*	2,38	0,0001
A: Concentración	8548,3	2	2849,43	6,36*	3,52	0,0057
B: Tiempo	3445,97	2	1722,98	3,84*	3,52	0,0396
C: Bloque	1087,51	1	1087,51	2,43	4,38	0,1358
AB	4193,54	4	2,34	2,34	2,9	0,0922
Error	8516,51	19	448,23			
Total	25791,86	29				

Al aplicar el test de rangos múltiples de Duncan se identificó la igualdad y desigualdad para los tratamientos ensayados (Cuadro N° 13).

Cuadro N° 13: Resultados del test de Duncan para la sobrevivencia promedio por tratamiento

TRATAMIENTOS	SOBREVIVENCIA (%)	GRUPOS HOMOLOGOS (*)
TO (testigo)	66	a
T1 (10 g/l *24hr)	68	a
T2 (10 g/l *48hr)	61	a
T3 (10 g/l *72hr)	0	b
T4 (15 g/l *24hr)	0	b
T5 (15 g/l *48hr)	33	ab
T6 (15 g/l *72hr)	0	b
T7 (20 g/l *24hr)	0	b
T8 (20 g/l *48hr)	0	b
T9 (20 g/l *72hr)	0	b

(*) letras minúsculas iguales no indican diferencia significativa al nivel 0.05.

El test de Duncan nos indica dos grupos homólogos; entre estos existe desigualdad de medias estadísticamente significativa al nivel 0,05, el tratamiento número cinco (**ab**) no presenta desigualdad de medias con ningún tratamiento, se puede suponer que no muestra diferencia con los demás tratamientos debido a que la cantidad de semillas germinadas es solo una, y por lo tanto dos de sus tres replicas presenta sobrevivencia cero, lo que provocaría la igualdad estadística de medias con el grupo homólogo **b**.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis de varianza para la capacidad germinativa indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel de confianza de 95%. El test de rangos múltiples Duncan indica diferencia de medias entre los tratamientos destacándose T2, por lo tanto se propone como tratamiento pregerminativo para boldo un remojo en ácido giberélico a una concentración de 10 g/l durante 48 horas, ya que con este tratamiento y para las condiciones descritas en este ensayo, es posible obtener 26,2% de germinación en 7 meses.

Presentaron germinación los tratamientos donde se aplicó ácido giberélico en concentraciones de 10 y 15 gr/l (T1, T2, T3, T5), destacándose los tratamientos T2 y T1 con 26,2 y 15,1% de germinación respectivamente. De los tiempos de remojo ensayados se destaca el de 48 horas debido a que presentó germinación en dos de los tres tiempos de inmersión estudiados (T2 y T5). Por los resultados antes mencionados se ratifica que la aplicación exógena de GA3 aumenta la capacidad germinativa del boldo; confirmando lo expresado por MUÑOZ (1986), "solo se logrará germinación con aplicación exógena de este promotor o bien con una prolongada estratificación".

Se descarta la aplicación del GA3 en concentraciones de 20 gr/l, debido a que con ningún tiempo de remojo estudiado se observó germinación (T7, T8 y T9). La razón que podría explicar esta ausencia de germinación, es que al momento de la preparación de la solución se requiere mayor cantidad de alcohol para diluir la hormona, lo que podría estar dañando la semilla.

Con la concentración de 15 g/l se consiguió solamente 0,8% de germinación, valor que es significativamente igual que 0%, ratificándose lo expresado por BESNIER (1989), quién establece que las soluciones de giberelinas van desde un 0,2 hasta 10 gr/l, dependiendo del grado de latencia y tipo de semilla. Por lo tanto, también se recomienda excluir esta concentración para futuros estudios.

Los resultados conseguidos en esta investigación muestran un aumento del porcentaje de germinación, así como también una disminución del tiempo de respuesta con respecto a los resultados obtenidos por Homann. Se observa una diferencia entre el estudio de Muñoz y esta tesis, pero el tiempo requerido por este ensayo es menor en 2 meses aproximadamente. La procedencia de las semillas pudo ser un factor importante en la diferencia de capacidad germinativa, ver cuadro N° 14.

Cuadro N° 14: Antecedentes de germinación en boldo

AUTOR	TRATAMIENTO	CAPACIDAD GERMINATIVA (%)	PERIODO DE ENERGIA (MESES)
HOMANN 1968	Almacenaje tres semanas a 3° C	19,00	12
MUÑOZ 1986	Remojo en GA3 (10g/l*24hr)	38,3	8,5
RODRIGUEZ 1997	Remojo en GA3 (10g/l*48hr)	26,20	7

Los tratamientos con reguladores resultan ventajosos si se considera la economía en tiempo y aumento de la capacidades germinativas obtenidas.

Se confirma que el boldo presenta una latencia, que estaría dada por un desbalance en el sistema promotor-inhibidor, una resistencia mecánica al crecimiento del embrión por parte del endocarpio y un escaso desarrollo morfológico del embrión.

Algunos factores que podrían influir en la capacidad germinativa en ensayos de germinación de boldo, basandose en lo observado en este ensayo son: Calidad de las semillas, Sustrato, Profundidad de siembra, almacigueras y Temperatura.

La calidad del material experimental utilizado (semillas) puede influir en los resultados de capacidad germinativa, debido a que la recolección de semillas se realiza aleatoriamente de distintos individuos en terreno, luego se procesan en laboratorio para su posterior almacenaje. Para investigaciones futuras se recomienda una preselección de las semillas al momento de almacenaje y previo al remojo en la solución, ya sea por características de tamaño y calidad. Además es recomendable un estudio fitosanitario y de viabilidad de las semillas, para este ensayo se realizó el test de flotación, el que presentó buenos resultados ya que fueron muy pocas las semillas que se encontraban a flote antes de la siembra.

El sustrato es un factor de mucha importancia en ensayos de germinación, dado que debe permitir una adecuada disponibilidad de agua y oxígeno a la semilla. Para este estudio el sustrato pareció cumplir con estas condiciones, confirmando así lo señalado por WILLAN (1991), la arena se prefiere como sustrato para especies arbóreas que tienen un período de germinación largo.

Un factor que pudo haber influenciado los resultados de capacidad germinativa en este ensayo fue la profundidad de siembra, como lo recomienda las reglas internacionales para ensayos de semilla ISTA (1976), la profundidad de siembra debe ser 1,5 el diámetro de la semilla, al momento de sembrar se pretendió la profundidad recomendada, pero al realizar los primeros riegos esta aumentó debido a la compactación que sufrió el sustrato, entonces para futuras investigaciones se sugiere disminuir esta profundidad al momento de sembrar.

Pudo haber influenciado en los resultados de capacidad germinativa el tipo de almacigueras utilizadas, éstas podrían presentar un obstáculo a la semilla al momento de germinar, la razón de este impedimento es que al efectuar los primeros riegos, las semillas descienden y posteriormente se hinchan, por lo tanto el espacio físico no es el óptimo para semillas epigeas, entonces la semilla realiza gastos energéticos en factores distintos a la germinación.

Para futuras investigaciones de germinación para esta especie se recomienda utilizar almacigueras que permitan mayor espacio físico para realizar el repique.

Una estrecha relación entre el aumento de la capacidad germinativa con el rango de temperaturas (20-30°C) es señalado por JAMES (1967), en este caso específico la germinación aumentó cuando las temperaturas máximas y mínimas ambientales se encontraban en un rango de 20 a 30° C (Cuadro N° 15).

Cuadro N° 15: Promedio de temperaturas máximas y mínimas ambientales, del lugar de ensayo.

MES	T° MAXIMA	T° MÍNIMA	CAPACIDAD GERMINATIVA (%) Para Tratamiento N° 2
Agosto	16	5	0,8
Septiembre	20	6	12,6
Octubre	24	8	7,2
Noviembre	29,5	10	5,6
Diciembre	35	13	0

El inicio de la germinación se observó a fines de Agosto y primeros días de Septiembre, pero los tratamientos 2 y 1, que son los que presentaron mayores capacidades germinativas, obtienen el mayor número de semillas germinadas entre la última semana de Septiembre y el mes de Octubre, con lo cual se confirma lo señalado por Mancinelli et al., 1982; citados por MUÑOZ (1986), "independiente de la fecha de recolección, la germinación solo ocurre entre Invierno-Primavera" (Figura N°9).



Fig. N°9: Germinación acumulada (%) mensual para los tratamientos.

En relación a la variable valor máximo, el análisis de varianza indica diferencias entre los tratamientos, con un 95% de confianza, y a su vez el test de Duncan presenta diferencia de medias, destacándose el tratamiento 2 (10 g/l * 48 hr), lo que estaría confirmando los resultados obtenidos de capacidad germinativa, los valores son muy pequeños numéricamente, debido a la baja capacidad germinativa y lo prolongado del estudio en tiempo, pero no impide comparar los tratamientos. Por los resultados obtenidos de esta variable se descartarían los tratamientos pregerminativos correspondientes a remojo en ácido giberélico en concentraciones de 15 y 20 g/l independiente del tiempo en remojo de la solución.

Al observar el cuadro N° 16 se podría señalar que el tratamiento que demora más días en alcanzar su mayor capacidad germinativa es el Tratamiento 2. Se debe considerar que este tratamiento obtiene el número más alto de semillas germinadas. Esto significa que para una especie como el boldo que presenta grandes problemas de reproducción, esperar veinte días para lograr 11,1% más de germinación se justifica en gran medida, y se recomendaría utilizar como parámetro el porcentaje de germinación logrado y no la cantidad de días necesarios para alcanzar esta germinación. Se debe recordar que el análisis estadístico para esta variable es idéntico a la de capacidad germinativa, por lo tanto se confirma T2 como mejor tratamiento pregerminativo.

Cuadro N° 16: Período de energía (días)

TRATAMIENTO	PERIODO DE ENERGIA (DIAS)
T0 (Testigo)	168
T1 (10 g/l *24 hr)	197
T2 (10 g/l *48 hr)	218
T3 (10 g/l *72 hr)	154
T4 (15 g/l *24 hr)	0
T5 (15 g/l *48 hr)	183
T6 (15 g/l *72 hr)	0
T7 (20 g/l *24 hr)	0
T8 (20 g/l *48 hr)	0
T9 (20 g/l *72 hr)	0

Tanto el valor de germinación como el valor máximo presentan diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, el test de Duncan estableció diferencia de medias, identifica el tratamiento número dos como el más adecuado como futuro tratamiento pregerminativo para la especie.

La sobrevivencia obtenida en base principalmente a los tratamientos T0, T1 y T2, donde se obtuvo la mayor cantidad de semillas germinadas es aproximadamente de 66%. Para ensayos de germinación en especies con escasa reproducción se recomienda extremar los cuidados culturales desde el momento del repique en adelante.

Uno de los factores que pudo haber influenciado en el porcentaje de sobrevivencia fueron las condiciones climáticas durante el repique, como lo señala HARDEE (1955), éste debe efectuarse en días húmedos; por las características de altas temperaturas y escaso contenido de humedad en los meses de Octubre y Noviembre, fue prácticamente imposible realizar los repiques con las condiciones adecuadas lo cual pudo haber influido en los porcentajes de sobrevivencia obtenidos.

El tipo de almaciguera utilizado en el ensayo pudo ser otro factor que influenció la sobrevivencia, debido al escaso espacio físico de las cavidades (10 cm³ c/u), imposibilitaba efectuar el repique en forma adecuada, ya que al encontrarse la semilla en el fondo de la cavidad era muy complicado sacar la planta sin causarle algún daño al tallo o sistema radicular.

Un último factor que influenció la sobrevivencia fue el ataque de gasterópodos después de efectuado el repique, ya que el invernadero donde se llevaron las plantas presentaba un gran número de caracoles que acabaron con los cotiledones de algunas plántulas, a pesar de haber realizado aplicaciones con mesurol.

En la figura N° 10, se muestra el tipo de planta obtenida con el mejor tratamiento pregerminativo T2 (remojo en ácido giberélico en concentración de 10 g/l durante 48 horas), la planta tiene cinco meses desde su germinación y como se puede observar presenta una altura de 20 cm.



Fig. N° 10: Planta de boldo representativa del mejor tratamiento pregerminativo del ensayo

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este ensayo, es posible obtener las siguientes conclusiones:

Para las semillas de boldo, resulta positiva la inmersión en solución de giberelina (GA3), en dosis de 10 gr/l durante 24 ó 48 horas, siendo significativamente mejor un tiempo de 48 horas.

De las concentraciones ensayadas, la aplicación exógena de GA3 en dosis de 10 gr/l, resulta ser la más adecuada para la germinación de semillas de boldo.

La aplicación exógena de ácido giberélico en dosis de 15 y 20 gr/l, independientes del tiempo de remojo ensayado, resulta dañino para la semilla, ya que no presentan respuesta de germinación.

De los tiempos de remojo ensayados, la inmersión de 48 horas en la solución, dentro de los rangos de concentración probados, es la más adecuada para la germinación.

Se descarta la inmersión en la solución de ácido giberélico durante 72 horas, debido a que ningún tratamiento (T7, T8 y T9) presentó germinación.

De la interacción de las distintas concentraciones y tiempos de remojo ensayados, el tratamiento 2 (10 g/l * 48 hr) resultó ser significativamente el más adecuado para la germinación, con un 26,2% de capacidad germinativa en 7 meses y un valor máximo de 0,129.

La aplicación exógena de ácido giberélico disminuye a 4 meses el tiempo necesario para inicio de la germinación, y a su vez aumenta la velocidad de esta.

El tratamiento testigo presentó bajos porcentajes de germinación (2,4%), lo que permite concluir que esta especie presenta problemas de reproducción en forma natural.

Es probable que los valores de germinación obtenidos en este ensayo se puedan aumentar, al seguir investigando en el tema se recomienda probar concentraciones entre 10 y 15 g/l (10, 11, 12, 13, 14 y 15) con tiempos de remojo entre 24 y 72 horas con una frecuencia de 6 horas de diferencia por tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, S.; INFANTE, P. 1988. Funciones de biomasa para boldo (*Peumus Boldus*) y Espino (*Acacia Caven*) de la zona central de Chile. *Ciencia e Investigación Forestal*. 3 (2): 45-50.
- ANDERSON, D. ; BÖHNING, R. y MEYER, B. 1972. Introducción a la fisiología vegetal. Buenos Aires. Argentina. Editorial Universitaria. 579p.
- ASCON-BIETO, J. y TAYLON, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Madrid, España. Interamericana McGraw-Hill 581p.
- BALDINI, E. 1992. Arboricultura general. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 379p.
- BARCELO, J.; NICOLAS, G.; SABATER, B. y SANCHEZ, R. 1983. Fisiología vegetal. Madrid, España. Ediciones Pirámide. 823 p.
- BARROS, S. 1991. Forestación en zonas áridas y semi áridas. *Ciencia e Investigación Forestal*. 5 (1): 151-164.
- BESNIER, F. 1989. Semillas, biología y tecnología. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 637p.
- BEWLEY, J. D. y BLACK, M. 1985. Seeds, physiology of development and germination. New York, USA. Plenum Press. 367p.
- BIDWELL, R. G. 1990. Fisiología vegetal. México. Editorial Calypso S.A. 784p.
- BOTTI, C. y CABELLO, A. 1990. Anatomía y desarrollo de flores, frutos y semillas de boldo (*Peumus boldus* Mol.). *Ciencia e Investigación Forestal* 4 (1):49-60.

- CABELLO, A. 1987. Proyecto de protección y recuperación de especies arbóreas y arbustivas amenazadas de extinción. I y II parte Documento Técnico, revista Chile Forestal N°21 y 22. Marzo-Abril.
- CABELLO, A. 1990. Propagación de especies pertenecientes a los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile: 56-74, En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 171p.
- COPELAND, L. O. y McDONALD, M. B. 1985 Principles of seeds science and technology. New York, USA. Macmillan Publishing Company 321p.
- CZABATOR, F. 1962. Germination Value. An index combining Speed and Completeness of Pine seed germination. Forest Science 8 (4) : 386 - 396.
- DAVIES, P. J. 1987. Plant hormones and their role in plant growth and development. Nature, occurrence and functions. Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers 681p.
- DONOSO, C. 1978. Dendrología, árboles y arbustos chilenos. Manual N° 2. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Silvicultura. 142p.
- GALVEZ, J. 1990. Rol económico y social de los bosques esclerófilos y espinosos: 110-117, En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 171p.
- HARDEE, J. 1955. Procedimientos para pequeños viveros forestales en Chile. Dirección de bosques, Instituto de Asuntos Interamericanos, Santiago. 39 p.

- HARTMANN, H. y KESTER, D. 1981. Propagación de plantas, principios y prácticas. México, continental. 814 p.
- HERRERA, J. M. 1984. Efectos de la temperatura y la aplicación de ácido giberélico, BAP, cinetina y ethrel a semillas de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) variedad "Mary Washington" sobre la germinación y desarrollo de plántulas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Quillota, Chile. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Departamento de Horticultura. 105p.
- HILLIGER, G. 1976. Aplicación de ácido giberélico a semillas y plántulas de tres cultivares de palto (*Persea americana* Mill.) usadas como portainjerto para obtener un mayor crecimiento en altura y diámetro al momento de ser injertados. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Quillota, Chile. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Departamento de Horticultura. 59p.
- HOFFMANN, A. J. 1981. Seasonal growth rhythms in *Peumus boldus*, a dioecious tree of the Chilean mediterranean vegetation. Ecol. Plant. 2 (16):31- 39
- HOMANN, C. 1969. Nuevos aspectos acerca de la germinación de semillas de *Peumus boldus*. Bol. U. de Chile N° 93-94 : 25-30. Junio- Julio.
- HOMANN, C. y MATTE, V. 1967. Para el conocimiento de la silvicultura de boldo (*Peumus boldus* Mol.). Bol. U. de Chile N° 78-79 : 19-24. Septiembre- Octubre.
- INFOR, 1995. Exportaciones forestales chilenas (Enero-Diciembre 1994). Boletín estadístico N° 38: 75.
- ISTA. 1976. Reglas internacionales para ensayos de semillas. Madrid, España. Ministerio de Agricultura. Dirección General de la Producción Agraria, pp 35 - 39.

- JACOBS, W. P. 1979. Plant hormones and plant development. Cambridge, New York, USA. Cambridge University Press. 339p.
- JAMES, W. O. 1976. Intrducción a la fisiología vegetal. Barcelona. España. Ediciones Omega. S.A. 456p.
- KANNEGIESSER, U. 1987. Evaluación de biomasa y boldina en boldo (*Peumus boldus* Mol.), VII Región. Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 97p.
- LABBE, S. 1989. Estudio fitosociológico estadístico de los bosques de boldo de la cuenca del rio bueno (Chile). Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. 94p.
- * LITTLE, T. y JACKSON, F. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. México. Editorial Trillas. 270p.
- MALDONADO, A. 1990. Características del hábitat de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon en su rango de distribución y algunos antecedentes de su reproducción sexuada. Tesis Ingeniero Forestal. Chillan, Chile. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Agronómicas, Veterinarias y Forestales. 126p.
- MARTH, P. C. y MITCHELL, J. W. 1962. Semillas. Departamento de agricultura de USA. México. Compañía editorial Continental. pp. 107- 117.
- MARTINEZ, G.; ARENAS, M. y FERNÁNDEZ, C. 1994. Notas sobre la influencia de ácido giberélico y del nitrato de potasio en la germinación de semillas de *Nothofagus betuloides* (MIRB.) OERST. Investigación agraria sistema y recursos forestales. 3(1): 12p

- MUÑOZ, M. 1986. Cultivo de embriones y ensayo de germinación en boldo (*Peumus boldus* Mol.) Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y forestales. 88 p.
- POWELL, L. E. 1987. Hormonal aspects of bud and seeds dormancy in temperate-zone woody plants. *HortScience* 22 (5): 845-849.
- RAMÍREZ, C.; ROMERO, M. y HENRÍQUEZ, O. 1980. Estudios de germinación en semillas de Mirtaceas chilenas. *Bosque* 3 (2): 106-114.
- RAMIREZ, C.; LABBE, S.; SAN MARTIN, C. y FIGUEROA, H. 1990. Sinecología de los bosques de boldo (*Peumus boldus*) de la cuenca del río Bueno, Chile. *Bosque* 11 (1): 45-56.
- RODRÍGUEZ, G. 1987. Árboles chilenos para ornamentación. *Revista Chile Forestal* N°139. Ficha coleccionable.
- RODRIGUEZ, G. 1990. Propagación de *Nothofagus* Chilenos por medio de semillas. *Agro-Ciencia* 6 (2): 123-129.
- ROCUANT, L. 1983. Efecto de giberelina y de tiourea en la germinación de semillas: especies del género *Nothofagus*. *Bosque* 5 (2) : 53-58.
- ROSS, C. W. y SALISBURY, F.B. 1994. Fisiología vegetal. México. Editorial Iberoamericana. 759p.
- SHAFIQ, Y. 1981. Effect of gibberellic acid (GA3) and pre-chilling on germination percent of *Nothofagus obliqua* MIRB. and N. Procera Oerst. Seeds. *Turrialba* 31 (4): 365-368.
- WILLAN, R.L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. Roma, Italia. FAO. 502p.

WEAVER, R. 1976 Reguladores del crecimiento de las plantas en agricultura. Triallas, México. 622p.

APÉNDICES

APENDICE N°1

1.- Resultado del análisis estadístico para la capacidad germinativa

General Linear Models Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
Concent	4	0 10 15 20
Tiempo	4	0 24 48 72

Number of observations in data set = 30

Dependent Variable: CAPAC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Fvalue	F(0,05)	Pr> F
Model	10	3302.4826467	330.2482647	36.33*	2.38	0.0001
Error	19	172.7138333	9.0902018			
Corrected Total	29	3475.1964800				

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

R-Square	C.V.	Root MSE	Capac Mean
0.950301	45.25662	3.0149961	6.6620000

Source	DF	Type III SS	Mean square	Fvalue	F(0.05)	Pr> F
Bloque	1	31.0005000	31.0005000	3.41	4.38	0.0804
Concent	2	2023.9315689	1011.557959	111.28*	3.52	0.0001
Tiempo	2	486.3831185	243.191559	26.75*	3.52	0.0001
Conce*Tiem	4	761.1674593	190.2918648	20.93*	2.9	0.0001

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

**General Linear Models Procedure
Least Squares Means**

Concent	Tiempo	Capac LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr> T H0:LSMEAN=0	LSMEAN Number
0	0	7.1566667	1.7407088	0.0006	1
10	24	22.7866667	1.7407088	0.0001	2
10	48	30.7633333	1.7407088	0.0001	3
10	72	2.9566667	1.7407088	0.1057	4
15	24	0.0000000	1.7407088	1.0000	5
15	48	2.9566667	1.7407088	0.1057	6
15	72	0.0000000	1.7407088	1.0000	7
20	24	0.0000000	1.7407088	1.0000	8
20	48	0.0000000	1.7407088	1.0000	9
20	72	-0.0000000	1.7407088	1.0000	10

Pr> I T I H0: LSMEAN (i) = LSMEAN (j)

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	0.0001	0.0001	0.1043	0.0090	0.1043	0.0090	0.0090	0.0090	0.0090
2	0.0001	-	0.0043	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	0.0001	0.0043	-	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	0.1043	0.0001	0.0001	-	0.2445	1.0000	0.2445	0.2445	0.2445	0.2445
5	0.0090	0.0001	0.0001	0.2445	-	0.2445	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	0.1043	0.0001	0.0001	1.0000	0.2445	-	0.2445	0.2445	0.2445	0.2445
7	0.0090	0.0001	0.0001	0.2445	1.0000	0.2445	-	1.0000	1.0000	1.0000
8	0.0090	0.0001	0.0001	0.2445	1.0000	0.2445	1.0000	-	1.0000	1.0000
9	0.0090	0.0001	0.0001	0.2445	1.0000	0.2445	1.0000	1.0000	-	1.0000
10	0.0090	0.0001	0.0001	0.2445	1.0000	0.2445	1.0000	1.0000	1.0000	-

APENDICE N°2

1.- Resultado del análisis estadístico para el valor máximo

General Linear Models Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
Concent	4	0 10 15 20
Tiempo	4	0 24 48 72

Number of observations in data set = 30

Dependent Variable: VALOR MAXIMO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Fvalue	F(0,05)	Pr> F
Model	10	0.0540037700	0.005400387	55.79*	2.38	0.0001
Error	19	0.001839200	0.00009680			
Corrected Total	29	0.05584297				

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

R-Square	C.V.	Root MSE	VAL_MAXMean
0.997065	42.10570	0.0098387	0.0233667

Source	DF	Type III SS	Mean square	Fvalue	F(0.05)	Pr> F
Bloque	1	0.00009680	0.00009680	1.00	4.38	0.3299
Concent	2	0.030019190	0.01500959	155.06*	3.52	0.0001
Tiempo	2	0.008389410	0.00419470	43.33*	3.52	0.0001
Conce*Tiemp	4	0.015265040	0.00381626	20.93*	2.90	0.0001

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

**General Linear Models Procedure
Least Squares Means**

Concent	Tiempo	VAL_MAX LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr>I T I H0:LSMEAN=0	LSMEAN Number
0	0	0.01500000	0.0056803	0.0161	1
10	24	0.07966667	0.0056803	0.0001	2
10	48	0.12966667	0.0056803	0.0001	3
10	72	0.0050000	0.0056803	0.3897	4
15	24	0.0000000	0.0056803	1.0000	5
15	48	0.0043333	0.0056803	0.4549	6
15	72	0.0000000	0.0056803	1.0000	7
20	24	-0.0000000	0.0056803	1.0000	8
20	48	0.0000000	0.0056803	1.0000	9
20	72	-0.0000000	0.0056803	1.0000	10

Pr> I T I H0: LSMEAN (i) = LSMEAN (j)

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	0.0001	0.0001	0.2283	0.0774	0.2000	0.0774	0.0774	0.0774	0.0774
2	0.0001	-	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	0.0001	0.0001	-	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	0.2283	0.0001	0.0001	-	0.5411	0.9347	0.5411	0.5411	0.5411	0.5411
5	0.0774	0.0001	0.0001	0.5411	-	0.5959	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	0.2000	0.0001	0.0001	0.9347	0.5959	-	0.5959	0.5959	0.5959	0.5959
7	0.0774	0.0001	0.0001	0.5411	1.0000	0.5959	-	1.0000	1.0000	1.0000
8	0.0774	0.0001	0.0001	0.5411	1.0000	0.5959	1.0000	-	1.0000	1.0000
9	0.0774	0.0001	0.0001	0.5411	1.0000	0.5959	1.0000	1.0000	-	1.0000
10	0.0774	0.0001	0.0001	0.5411	1.0000	0.5959	1.0000	1.0000	1.0000	-

APENDICE N°3

1.- Resultado del análisis estadístico para el valor de germinación

General Linear Models Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
Concent	4	0 10 15 20
Tiempo	4	0 24 48 72

Number of observations in data set = 30

Dependent Variable: VALOR DE GERMINACION

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Fvalue	F(0,05)	Pr> F
Model	10	13.938835000	1.393883500	34.09*	2.38	0.0001
Error	19	0.776795000	0.04088395			
Corrected Total	29	14.71563000				

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

R-Square	C.V.	Root MSE	VAL_GERMean
0.947213	46.26952	0.2021978	0.4370000

Source	DF	Type III SS	Mean square	Fvalue	F(0.05)	Pr> F
Bloque	1	0.14620500	0.14205000	3.58	4.38	0.0740
Concent	2	8.596118520	4.29805926	105.13*	3.52	0.0001
Tiempo	2	2.031562960	1.01578148	24.85*	3.52	0.0001
Conce*Tiemp	4	3.157792590	0.78944815	19.31*	2.90	0.0001

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

**General Linear Models Procedure
Least Squares Means**

Concent	Tiempo	VAL_GER LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr>I T I H0:LSMEAN=0	LSMEAN Number
0	0	0.48333333	0.1167389	0.0006	1
10	24	1.50333333	0.1167389	0.0001	2
10	48	1.98333333	0.1167389	0.0001	3
10	72	0.2000000	0.1167389	0.1029	4
15	24	-0.0000000	0.1167389	1.0000	5
15	48	0.2000000	0.1167389	0.1029	6
15	72	-0.0000000	0.1167389	1.0000	7
20	24	0.0000000	0.1167389	1.0000	8
20	48	0.0000000	0.1167389	1.0000	9
20	72	-0.0000000	0.1167389	1.0000	10

Pr> I T I H0: LSMEAN (i) = LSMEAN (j)

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	0.0001	0.0001	0.1024	0.0086	0.1024	0.0086	0.0086	0.0086	0.0086
2	0.0001	-	0.0090	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	0.0001	0.0090	-	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	0.1024	0.0001	0.0001	-	0.2406	1.0000	0.2406	0.2406	0.2406	0.2406
5	0.0086	0.0001	0.0001	0.2406	-	0.2406	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	0.1024	0.0001	0.0001	1.0000	0.2406	-	0.2406	0.2406	0.2406	0.2406
7	0.0086	0.0001	0.0001	0.2406	1.0000	0.2406	-	1.0000	1.0000	1.0000
8	0.0086	0.0001	0.0001	0.2406	1.0000	0.2406	1.0000	-	1.0000	1.0000
9	0.0086	0.0001	0.0001	0.2406	1.0000	0.2406	1.0000	1.0000	-	1.0000
10	0.0086	0.0001	0.0001	0.5411	1.0000	0.2406	1.0000	1.0000	1.0000	-

APENDICE N°4

1.- Resultado del análisis estadístico para la sobrevivencia

General Linear Models Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
Concent	4	0 10 15 20
Tiempo	4	0 24 48 72

Number of observations in data set = 30

Dependent Variable: SOBREVIVENCIA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Fvalue	F(0,05)	Pr> F
Model	10	17275.3478670	1727.5347870	3.85*	2.38	0.0056
Error	19	8516.5180130	448.2377900			
Corrected Total	29	25791.8658800				

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

R-Square	C.V.	Root MSE	SOBREVIVENCIA
0.669798	115.95810	21.1716270	18.2580000

Source	DF	Type III SS	Mean square	Fvalue	F(0.05)	Pr> F
Bloque	1	1087.517520	1087.517520	2.43	4.38	0.1358
Concent	2	61663066889	3083.1533444	6.36*	3.52	0.0057
Tiempo	2	3445.9748222	1722.987411	3.84*	3.52	0.0396
Conce*Tiemp	4	4193.5494222	1048.3873556	2.34	2.90	0.0922

*** Diferencia estadística significativa al 95%**

**General Linear Models Procedure
Least Squares Means**

Concent	Tiempo	SOBRE LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr> T H0:LSMEAN=0	LSMEAN Number
0	0	44.9900000	12.2234446	0.0016	1
10	24	56.7366667	12.2234446	0.0002	2
10	48	50.8600000	12.2234446	0.0005	3
10	72	0.0000000	12.2234446	1.0000	4
15	24	0.0000000	12.2234446	1.0000	5
15	48	29.9933333	12.2234446	0.1057	6
15	72	0.0000000	12.2234446	1.0000	7
20	24	0.0000000	12.2234446	1.0000	8
20	48	0.0000000	12.2234446	1.0000	9
20	72	-0.0000000	12.2234446	1.0000	10

Pr> I T I H0: LSMEAN (i) = LSMEAN (j)

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	0.5050	0.7379	0.0175	0.0175	0.3965	0.0175	0.0175	0.0175	0.0175
2	0.5050	-	0.7376	0.0039	0.0039	0.1383	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
3	0.7379	0.7376	-	0.0084	0.0084	0.2422	0.0084	0.0084	0.0084	0.0084
4	0.0175	0.0039	0.0084	-	1.0000	0.0989	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	0.0175	0.0039	0.0084	1.0000	-	0.0989	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	0.3965	0.1383	0.2422	0.0989	0.0989	-	0.0989	0.0989	0.0989	0.0989
7	0.0175	0.0039	0.0084	1.0000	1.0000	0.0989	-	1.0000	1.0000	1.0000
8	0.0175	0.0039	0.0084	1.0000	1.0000	0.0989	1.0000	-	1.0000	1.0000
9	0.0175	0.0039	0.0084	1.0000	1.0000	0.0989	1.0000	1.0000	-	1.0000
10	0.0175	0.0039	0.0084	1.0000	1.0000	0.0989	1.0000	1.0000	1.0000	-