

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS Y DE LAS TEMPERATURAS DE CULTIVO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Talguenea quinquenervia* (talguén).

Cabello, A.¹; Sandoval, A.² y Carú, M.³

RESUMEN

Se determinó el efecto de la aplicación de tratamientos pregerminativos (remojo en ácido sulfúrico grado técnico y estratificación fría) y de la temperatura de cultivo, sobre el porcentaje y la velocidad de germinación de semillas de *Talguenea quinquenervia* (talguén). Los resultados obtenidos confirman la existencia de una latencia exógena física en las semillas. La impermeabilidad impuesta por la testa de las semillas fue superada mediante tratamiento con ácido sulfúrico comercial, concentrado. La velocidad de germinación fue aumentada significativamente al aplicar períodos cortos de estratificación fría. Con respecto a las temperaturas de cultivo, las semillas obtuvieron una germinación semejante entre 5 y 25°C, aunque la mayor velocidad de germinación ocurrió entre 15 y 20°C. Estos resultados serán útiles para obtener, en vivero, plantas de talguén en cantidad y de calidad, para ser inoculadas con cepas de *Frankia*, y determinar el efecto de la bacteria (fijadora de nitrógeno) en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Palabras claves: *Talguenea quinquenervia*, Rhamnaceae, germinación de semillas, tratamientos pregerminativos, temperaturas de cultivo, *Frankia*.

SUMMARY

The effect of pregermination treatments (sulfuric acid soaking and cold stratification) and cultivation temperature on the percentage and rate of seed germination of *Talguenea quinquenervia* was determined. The results obtained showed that the seeds exhibit an exogenous physical dormancy. The impermeability produced by the seed coat was overcome by treatment with concentrated sulfuric acid. The seed germination rate was increased significantly with short periods of cold stratification. Similar seed germination was obtained between 5°C and 25°C, although the best germination rate was obtained between 15-20°C. These results will be useful in obtaining "talguen" plants to assay the effect of the inoculation and nodulation with *Frankia* on the growth and development of these host plants in nurseries.

Key words: *Talguenea quinquenervia*, Rhamnaceae, seed germination, pregermination treatments, cultivation temperature, *Frankia*.

¹ Depto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Casilla 9206 - Santiago, Chile. E-mail: acabello@abello.dic.uchile.cl.

² Centro de Semillas y Arboles Forestales. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Casilla 3 Correo 17 - Santiago, Chile. E-mail: asandova@abello.dic.uchile.cl

³ Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653 - Santiago, Chile. E-mail: mcaru@codon.ciencias.uchile.cl

INTRODUCCION

Talguenea quinquenervia (Gill. et al. Hook.) Johnston, "talguén" o "talhuén", es un arbusto o árbol espinoso, de hasta tres metros de alto, endémico de Chile, que forma parte del matorral esclerófilo de la zona central. Habita en sectores secos, con fuerte insolación y luminosidad, principalmente en los faldeos de los cerros precordilleranos andinos desde la IV Región (Provincia de Choapa) hasta la VII Región (Provincia de Linares) (Rodríguez et al., 1983; Serra, 1990). Perteneció a la familia Rhamnaceae, con 45 géneros y 500 especies, que se distribuyen en zonas templadas y cálidas de todo el mundo. En Chile habitan 8 géneros; algunas especies son ricas en heteróxidos antraquinónicos de acción laxante o purgante, como la cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) de América del Norte, y los frutos del espiño cercal (*R. cathartica*) de África y Asia; otras especies poseen materias colorantes y taninos (Navas, 1976).

Talguén es una especie muy abundante en la Región Metropolitana, encontrándosele de preferencia en los cerros de Renca, en Peldehue, en las Termas de Colina, en el cerro San Cristóbal, en el cerro Manquehue, en la quebrada de Peñalolén, en el cajón del Maipo, entre otros. Florece desde agosto a octubre; flores blanco-amarillentas. Fruto en nuez pubescente, de 5 mm de longitud, con 1-3 semillas, plano-convexas, lisas, brillantes, de 3,5-4 mm de longitud (Navas, 1976).

Al igual que otras especies argentinas y chilenas de la familia Rhamnaceae, Talguén se asocia a *Frankia*, un actinomicete que fija nitrógeno en vida libre y en simbiosis con las plantas que nodula. *Frankia* es una bacteria que puede inducir la formación de nódulos radiculares, fijadores de nitrógeno, en aproximadamente 200 especies de angiospermas dicotiledóneas distribuidas en 8 familias, en ambos hemisferios, conocidas como plantas actinorrícicas (Akkermans et al., 1989; Fabri et al., 1996). *Frankia* es capaz de nodular especies pertenecientes a siete géneros de la familia Rhamnaceae: *Colletia*, *Ceanothus*, *Discaria*, *Kentrothamus*, *Retanilla*, *Talguenea* y *Trevoa* (Rundel y Neel, 1978; Medan y Tortosa, 1981; Silvester et al., 1985; Balboa et al., 1988; Longeri y Abarzúa, 1989).

En Chile habitan varias Rhamnáceas actinorrícicas tales como: *Colletia hystrix* "crucero", *Retanilla ephedra* "retamo", *Trevoa trinervis* "trevo", *Discaria serratifolia* y talguén. De todas ellas se han aislado cepas desde nódulos radiculares (Carú et al., 1990; Carú, 1993), y las bacterias se han caracterizado morfológicamente (Longeri y Abarzúa, 1989; Carú et al., 1990; Carrasco et al., 1992) y fisiológicamente (Carú, 1993; Carrasco et al., 1995), se ha estudiado la esporulación (Carú, 1995) y la germinación de las esporas (Carú et al., 1997), se han determinado las propiedades simbióticas de cepas silvestres y mutantes resistentes a antibióticos (Carú y Cabello, 1998), y se ha determinado la habilidad para nodular sobre plantas de especies nativas y exóticas y de fijar nitrógeno atmosférico (Carú y Cabello, 1999).

Las bacterias aisladas desde talguén, se han mantenido y cultivado *in vitro*, y han sido objeto de diversas investigaciones (Balboa y Martínez, 1985; Carú y Cabello, 1999). Actualmente, se están estudiando los efectos de la simbiosis talguén-*Frankia* sobre el desarrollo de las plantas de vivero y comprobar así la importancia ecológica del actinomicete. Sin embargo, no hay antecedentes sobre la propagación de talguén en viveros. Sólo se sabe que sus semillas requieren, para germinar, de la aplicación de tratamientos que ablanden la testa y permitan la entrada de agua. Cabello (1990) recomienda el remojo en ácido sulfúrico concentrado, de 5 a 30 minutos, según el lote o procedencia de la semilla, seguido de estratificación por 30 días.

El propósito de la presente investigación es determinar parámetros de germinación de las semillas de talguén, bajo distintas temperaturas y tratamientos pregerminativos, que sirvan de guía para ubicar la época de siembra y el tratamiento previo adecuado para obtener plántulas en el vivero, en cantidad y de calidad, para ser inoculadas con distintas cepas de *Frankia*.

MATERIAL Y METODOS

Las semillas de talguén fueron colectadas (enero, 1998), desde vegetación natural existente en la Estación Experimental Rinconada de Maipú, perteneciente a la

Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la comuna de Maipú, Región Metropolitana.

Se realizaron tres ensayos para determinar los efectos de la temperatura de cultivo y de los tratamientos pregerminativos sobre el porcentaje y la velocidad de germinación de las semillas. Cada tratamiento estuvo constituido por 3 repeticiones de 25 semillas cada una, colocadas en placas Petri con papel filtro humedecido con agua destilada. Las placas Petri se cubrieron con bolsas de polietileno negro para proteger a las semillas de la luz y de la pérdida excesiva de humedad. Los ensayos tuvieron una duración cercana a los 30 días.

En cada ensayo se analizaron estadísticamente los parámetros Capacidad Germinativa y Valor Máximo, mediante un análisis de varianza y un test de comparación de medias para determinar diferencias entre tratamientos. La Capacidad Germinativa corresponde al porcentaje acumulado de germinación al término del ensayo. El Valor Máximo (Czabator, 1962), es el cociente máximo entre el porcentaje de germinación acumulado hasta un período determinado y el número de días en que se logró dicho porcentaje. A su vez, el Valor Máximo (VM) determina la Energía Germinativa (porcentaje de germinación acumulado al día en que se produce el VM) y el Período de Energía (número de días en que ocurre el VM).

Se utilizó un Diseño Bifactorial de Efectos Fijos (Ostle, 1965) en el ensayo de germinación que prueba los efectos de la temperatura y del tratamiento a la testa, y un Diseño Completamente al Azar en los ensayos de efectos de los tiempos de remojo en ácido sulfúrico y de la estratificación.

Efecto de la temperatura de cultivo y del tratamiento a la testa sobre la germinación

Las semillas permanecieron dentro de cámaras de cultivo a temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. En cada temperatura se ensayaron dos tratamientos a la testa, un testigo y remojo en H₂SO₄ concentrado (grado técnico) por 20 minutos.

Efecto del tiempo de remojo en H₂SO₄ sobre la germinación

Se trataron lotes de semillas en H₂SO₄ concentrado, por períodos de tiempo de 0, 5, 10, 15, 20, 0 y 45 minutos. Una vez lavadas, las semillas se pusieron a germinar en una cámara de cultivo, a una temperatura constante, determinada de acuerdo a los resultados del ensayo anterior.

Efecto de la estratificación fría, previo tratamiento con H₂SO₄, sobre la germinación

Semillas tratadas durante 20 minutos en H₂SO₄ concentrado, fueron remojadas en agua durante 24 hr, mezcladas con arena húmeda estéril, y ubicadas en bolsas de polietileno y estratificadas a 5°C por una, dos y cuatro semanas. Posteriormente, los lotes de semillas así tratados, más un testigo, fueron puestos a germinar en una cámara de cultivo a 15°C.

RESULTADOS

De acuerdo al análisis preliminar del lote de semillas empleado en los ensayos el número de semillas/kg fue 85.051 y el contenido de humedad 7,68%. Según ensayo de corte practicado, un 10,5% de las semillas estaban vanas.

Efecto de la temperatura de cultivo y del tratamiento a la testa sobre la germinación

Para determinar el efecto de la temperatura sobre semillas tratadas, se eligió 20 minutos en H₂SO₄ como tratamiento pregerminativo, de acuerdo a los antecedentes bibliográficos (Cabello, 1990). Además, para cada temperatura se usó un testigo.

Las semillas sin tratar mostraron una capacidad germinativa y una velocidad de germinación (valor máximo) estadísticamente semejantes entre 5 y 30°C. La capacidad germinativa aumentó desde 5°C (8%) a 15°C (24%); lo mismo ocurrió con la velocidad de germinación (Cuadro 1). Entre 15 y 30°C ambos parámetros mantuvieron sus valores.

Las semillas tratadas durante 20 min en H₂SO₄ presentaron una capacidad germinativa estadísticamente semejante entre 5 y 25°C, la que decreció fuertemente a 30°C, llegando a ser prácticamente nula a 35°C (Cuadro 1). Las más altas velocidades de germinación, estadísticamente semejantes, ocurrieron a 15 y 20°C; tanto la disminución como el aumento de la temperatura de cultivo produjo una disminución de los valores máximos. De acuerdo a estos resultados, las temperaturas óptimas de germinación serían 15 y 20°C, ya que reúnen los mayores valores (estadísticamente diferentes) de velocidad y porcentaje de germinación (capacidades

germinativas de 88 a 96%, energías germinativas de 72 a 78,7% en períodos de energía entre 6 a 7 días).

La temperatura más alta probada, 35°C, fue letal tanto para las semillas testigos como para las semillas tratadas con H₂SO₄. Esta afirmación queda avalada por la mortalidad casi total de las semillas, detectada visualmente al término del ensayo de germinación (Cuadro 1). También se evidenció una alta mortalidad para 30°C, temperatura en que se produjo una fuerte reducción tanto en porcentaje como en velocidad de germinación.

Cuadro 1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de *Talguenea quinquenervia* con y sin tratamiento pregerminativo (Inicio: 28 de mayo, 1998, duración: 33 días, en oscuridad).

Temperatura (°C)	Tratamiento Pregerminativo	Capacidad Germinativa (%)	Valor Máximo	Energía Germinativa (%)	Período de Energía (días)	Semillas muertas (%)
5	TESTIGO	8,0 cd ¹	0,283 ef	6,70	26,7	0,00
	H ₂ SO ₄ 20min	89,3 a	3,867 c	77,30	20,0	10,67
10	TESTIGO	18,7 c	0,903 de	17,30	20,7	0,00
	H ₂ SO ₄ 20min	89,3 a	7,620 b	88,00	11,7	10,67
15	TESTIGO	24,0 bc	1,123 de	14,70	13,0	2,67
	H ₂ SO ₄ 20min	88,0 a	11,840 a	78,67	6,7	12,00
20	TESTIGO	21,3 bc	0,957 de	13,33	19,0	4,00
	H ₂ SO ₄ 20min	96,0 a	12,000 a	72,00	6,0	4,00
25	TESTIGO	22,7 bc	0,723 e	21,33	29,7	5,33
	H ₂ SO ₄ 20min	89,3 a	8,370 b	81,33	10,3	9,33
30	TESTIGO	20,0 bc	0,800 e	17,33	23,0	38,67
	H ₂ SO ₄ 20min	45,3 b	2,157 d	45,33	19,3	26,67
35	TESTIGO	0,0 d	0,103 f	0,00	33,0	92,00
	H ₂ SO ₄ 20min	1,3 d	0,000 f	1,33	26,3	98,67

¹Medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

La capacidad de germinar a bajas temperaturas mostrada por las semillas de talguén, también la presentan las semillas de otras especies chilenas que habitan en la zona central (Cabello, 1990), tales como: *Acacia caven* "espino" (Cabello y Alvear, 1991); *Maytenus boaria* "maitén" (Cabello y Camelio, 1996); *Beilschmiedia miersii* "belloto del norte" (Cabello y Anselmo, 1999); *Quillaja saponaria* "quillay" (Cabello y Wiberg, 1999). Según Cabello y Alvear (1991), esta adaptación permite que las semillas de estas especies, germinen en la época fría y lluviosa (otoño e invierno) y así las

plántulas puedan alcanzar un desarrollo adecuado que les permita sobrevivir en las condiciones de sequedad y altas temperaturas de la primavera y el verano.

Efecto de distintos tiempos de remojo en H₂SO₄ sobre la germinación

La temperatura de cultivo empleada en este ensayo, se eligió de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo precedente.

Aunque todos los tiempos de remojo en H₂SO₄ produjeron resultados aceptables, en comparación con el testigo, los tratamientos óptimos fueron 20 a 45 min, ya que reunieron las más altas velocidades y capacidades germinativas, estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos (Cuadro 2). El remojo en H₂SO₄ produjo un mayor efecto en la velocidad de germinación que en la capacidad germinativa; en efecto, el valor máximo fue elevándose paulatina y notoriamente con el aumento del tiempo de tratamiento (entre 5 y 45 min).

Aparentemente, el tratamiento con H₂SO₄ dañaría a algunas semillas (Cuadro 1), pero el porcentaje es bajo y el elevado porcentaje de

germinación obtenido justifica el tratamiento. Es posible que parte de las semillas testigo estuvieran muertas (el ensayo de corte preliminar determinó que un 10,5% de las semillas estaban vanas), pero no fueran detectadas, en cambio las semillas tratadas, al desaparecer la impermeabilidad de la testa, absorben agua y son atacadas por hongos, lo que hace notorio su deterioro.

Los resultados confirman la existencia de una latencia exógena física, debido a las diferencias estadísticamente significativas entre semillas tratadas con H₂SO₄ y las testigo, y concuerdan tanto en los porcentajes de germinación como en los tiempos de tratamiento con los señalados por Cabello (1990).

Cuadro 2. Efecto del tratamiento con ácido sulfúrico sobre la germinación de semillas de *Talguenea quinquenervia* (Inicio del ensayo: 1 de julio, 1998; duración: 33 días; temperatura de germinación: 15°C, en oscuridad).

Tratamiento Pregerminativo	Capacidad Germinativa (%)	Valor Máximo	Energía Germinativa (%)	Período de Energía (días)	Semillas muertas (%)
Testigo	21,3 c ¹	1,20 f	12,0	10,33	0
H ₂ SO ₄ 5min	84,0 b	3,91 e	68,0	17,67	5,33
H ₂ SO ₄ 10min	82,7 b	5,89 d	58,7	10,00	5,33
H ₂ SO ₄ 15min	89,3 ab	7,43 cd	76,0	10,33	10,67
H ₂ SO ₄ 20min	93,3 ab	11,56 ab	88,0	7,67	6,67
H ₂ SO ₄ 25min	92,0 ab	9,64 bc	84,0	9,00	8
H ₂ SO ₄ 30min	88,0 ab	10,2 ab	77,3	7,67	12
H ₂ SO ₄ 45min	94,7 a	12,25 a	81,3	6,67	5,33

¹Medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Efecto de la estratificación fría, previo tratamiento con H₂SO₄, sobre la germinación

Tanto la temperatura de cultivo como el tiempo de tratamiento con H₂SO₄ fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de los ensayos precedentes. Las semillas tratadas durante 20 min en H₂SO₄, como tratamiento único, se consideraron testigo.

Los resultados de este ensayo evidencian que la estratificación, como tratamiento combinado al remojo de las semillas en H₂SO₄, no modifica los porcentajes de germinación. Sin embargo, tiene un efecto significativo sobre el valor máximo cuando el período húmedo-frío se extiende por 2

a 4 semanas (Cuadro 3); con dichos períodos de estratificación se alcanzan energías germinativas que varían entre 46,7 y 76,0% en períodos de energía de 24 a 48 horas. Estos resultados confirman la afirmación hecha por Cabello (1990), en el sentido de la conveniencia de estratificar, por 30 días, las semillas de talguén.

El aumento conseguido en la velocidad de germinación justifica la aplicación de un período corto de estratificación, 15 a 30 días, previa eliminación de la barrera física impuesta por la testa al ingreso de agua, lo que permitiría obtener plantas más uniformes en el vivero.

Cuadro 3. Efecto del período de estratificación (5°C) sobre la germinación de semillas de *Talguenea quinquenervia* tratadas previamente con ácido sulfúrico (20 min) (inicio: 1 de julio, 1998; duración: 30 días; temperatura de germinación: 15°C, en oscuridad).

Tratamiento Pregerminativo	Capacidad Germinativa (%)	Valor Máximo	Energía Germinativa (%)	Período de Energía (días)	Semillas muertas (%)
H ₂ SO ₄ 20min	97,3 a ¹	17,20 b	90,7	5,3	2,67
H ₂ SO ₄ 20min + Estr. 1 sem.	96,0 a	17,67 b	82,7	4,7	4
H ₂ SO ₄ 20min + Estr. 2 sem.	96,0 a	46,67 a	46,7	1,0	4
H ₂ SO ₄ 20min + Estr. 4 sem.	93,3 a	38,00 a	76,0	2,0	6,67

¹Medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

- Las semillas de talguén presentan latencia exógena física, la cual se supera con remojo en H₂SO₄ concentrado.
- Los tiempos de remojo de las semillas en H₂SO₄ concentrado que obtuvieron los más altos porcentajes de germinación en el menor tiempo, correspondieron al intervalo comprendido entre 20 y 45 minutos.
- Las semillas de talguén tratadas durante 20 min en H₂SO₄ concentrado, presentan altos porcentajes de germinación, estadísticamente semejantes, con temperaturas de cultivo entre 5 y 25°C. Al igual que las de otras especies del bosque esclerófilo y espinoso, las semillas de talguén presentan la capacidad de germinar (si desaparece la impermeabilidad de la testa) durante el otoño e invierno, y así las plántulas pueden aprovechar las precipitaciones invernales para establecerse.
- Las temperaturas óptimas de germinación, para semillas tratadas, se encuentran entre 15 y 20°C. Con ellas se obtuvieron los más altos porcentajes y las mayores velocidades de germinación. Para el lote de semillas empleado en los ensayos, la temperatura de cultivo 35°C resultó letal.
- La estratificación fría por 2 a 4 semanas, aplicada a semillas previamente tratadas con H₂SO₄ concentrado, aumenta significativamente la velocidad de germinación, pero las capacidades germinativas no mejoran con respecto a las obtenidas con la aplicación de H₂SO₄ como tratamiento único.

- De acuerdo a los resultados obtenidos, las semillas de talguén deberían ser tratadas con ácido sulfúrico concentrado durante 20 a 45 min, luego remojadas en agua por 12 a 24 horas y mantenidas en condición húmeda-fría (5°C) por 15 a 30 días, y sembradas en el vivero entre otoño y comienzos de primavera.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1980752 "Diversidad genética y fenotípica de cepas de *Frankia* aisladas de rhamnáceas nativas: marcadores moleculares y propiedades simbióticas", por el Proyecto "Propagación de plantas leñosas y ornamentales" del Depto. de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, y por el Proyecto FONDEF-CONYCIT FI-12 "Centro de Semillas de Arboles Forestales". Los autores agradecen la asistencia técnica en los ensayos de laboratorio de las Sras. Ana Alvear y Mónica González.

BIBLIOGRAFIA

- Akkermans, A.; Hahn, D. Y Zoon, F. 1989. Interactions between root symbionts, root pathogens and actinorhizal plants. Annual Science Forestry 46 (suppl.): 765s-771s.
- Balboa, O.; Ávila, G. Y Arce, P. 1988. Fine structure of actinorhiza of the Rhamnaceae growing in Chile: *Talguenea quinquenervia* (Gill et Hook). Protoplasma 147: 143-148.

- Balboa, O. y Martínez, J. 1985. Actividad reductora estacional de los nódulos en algunas especies de Rhamnaceae (Tribu Colletiae). *Medio Ambiente* 7 (2): 63-72.
- Cabello, A. 1990. Propagación de especies pertenecientes a los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinoso de la zona central de Chile. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Dpto. de Silvicultura. Apuntes Docentes N° 3. pp. 56-74.
- Cabello, A. y Alvear, A. 1991. Efecto de la temperatura sobre la germinación de dos lotes de semillas de Espino (*Acacia caven* (Mol.) Mol.). *Rev. Ciencias Forestales* 7(1-2): 3-12.
- Cabello, A. y Anselmo, M. 1999. Algunos factores que inciden en la germinación y producción de plantas de *Beilschmiedia miersii* (Belloto del Norte). *Notas CESAF-CHILE* 9: 11-12.
- Cabello, A. y Camelio, M. E. 1996. Germinación de semillas de maitén (*Maytenus boaria*) y producción de plantas en vivero. *Rev. Ciencias Forestales* 11(1-2): 3-17.
- Cabello, A. y Wiberg, S. 1999. Factores que influyen en la germinación y producción de plantas de quillay (*Quillaja saponaria*). *Notas CESAF-CHILE* 8: 9.
- Carrasco, A.; Sayards, J. y Berry, A. 1995. Studies of two *Frankia* strains isolated from *Trevoa trinervis* Miers. *Plant and Soil* 171: 359-363.
- Carrasco, A.; Schwencke, J. y Carú, M. 1992. Isolation of *Frankia* from nodules of *Trevoa trinervis*: Ultrastructural characterization. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 174-180.
- Carú, M. 1993. Characterization of native *Frankia* strains isolated of chilean shrubs (Rhamnaceae). *Plant and Soil* 157: 137-145.
- Carú, M. 1995. Sporulation of two *Frankia* strains in submerged cultures. *Acta Microbiológica* 6: 145- 151.
- Carú, M.; Abarzúa, M. y Carrasco, A. 1990. Estructura fina de *Frankia*, cepas Ch11 y Ch12 aisladas de *Colletia hystrix* (Clos.). *Acta Microbiológica* 3 (1-2): 55-62.
- Carú, M. y Cabello, A. 1998. Isolation and characterization of the symbiotic phenotype of antibiotic-resistant mutants of *Frankia* from Rhamnaceae. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14: 205-210.
- Carú, M. y Cabello, A. 1999. Infectivity and effectivity of some *Frankia* strains from the Rhamnaceae family. Aceptado para su publicación en *Journal Arid Soil Research and Rehabilitation*. 13: 53-59.
- Carú, M.; Sepúlveda, D. y Cabello, A. 1997. Spore germination of *Frankia* strains isolated from *Colletia hystrix* and *Retanilla ephedra* (Rhamnaceae). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 219-224.
- Czabator, F. J. 1962. Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science* 8(4): 386-396.
- Fabri, S.; Caucas, V. y Abril, A. 1996. Infectividad y efectividad de distintas cepas de *Frankia* spp. sobre plantas de *Atriplex cordobensis*. *Revista Argentina de Microbiología* 28: 31-38.
- Longeri, L. Y Abarzúa, M. 1989. Ultrastructure of *Frankia* isolated from three Chilean shrubs (Rhamnaceae). En F. A. Skinner *et al* (Eds.), Nitrogen fixation with non-legumes. pp. 47-53.
- Medan, D. Y Tortosa, R. D. 1981. Nódulos actinorrícicos en especies argentinas de los géneros *Kentrothamus*, *Trevoa* (Rhamnaceae) y *Coriaria* (Coriariaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 20: 71-80.
- Navas, L. 1976. Flora de la Cuenca de Santiago de Chile. Editorial de la Universidad de Chile. Tomo II. 541 p. más láminas.
- Ostle, B. 1965. Estadística Aplicada: técnicas de la estadística moderna, cuándo y dónde aplicarlas. Limusa-Wiley, México. 629 p.

- Longeri, L. y Abarzúa, M. 1989. Ultrastructure of *Frankia* isolated from three Chilean shrubs (Rhamnaceae). En: F.A. Skinner, R.M. Boddey, I. Fendrik (Eds). Nitrogen fixation with non-legumes. pp. 47-53.
- Rodríguez, R.; Quezada, M. y Matthei, O. 1983. Flora Arbórea de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción. 408 p.
- Rundel, P. W. y Neel, J. W. 1978. Nitrogen fixation by *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) in the chilean matorral. Flora Bd. 167: 127-132.
- Serra, M. T. 1990. Elementos florísticos de los bosques esclerófilos y espinosos de Chile central. En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Silvicultura. Apuntes Docentes N°3. pp. 19-37.
- Silvester, W. B.; Balboa, O. y Martínez, J. A. 1985. Nodulation and nitrogen fixation in members of the Rhamnaceae (*Colletia*, *Retanilla*, *Talguenea*, *Trevoa*) growing in the chilean matorral. Symbiosis 1: 29-38.