

Efecto combinado de la escarificación y la temperatura en la germinación de semillas de leguminosas herbáceas

Combined effect of scarification and temperature on the germination of herbaceous legume seeds

J. Reino¹, J. A. Sánchez², Bárbara Muñoz², Yolanda González¹ y Laura Montejo²

¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

E-mail: jreino@indio.atenas.inf.cu

² Instituto de Ecología y Sistemática, La Habana, Cuba

Resumen

Se utilizaron semillas de cinco leguminosas herbáceas con diferentes tiempos de colecta: *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria* sp. y *Centrosema pubescens*, procedentes del banco de genes de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. Se diseñó un experimento de clasificación simple con arreglo factorial y cinco réplicas (25 semillas cada una), para evaluar la combinación de cuatro tratamientos pregerminativos: semillas intactas (control); agua a 80°C durante 2' (Agua 2'); H₂SO₄ al 96% durante 5' (Ácido 5') y H₂SO₄ al 96% durante 10' (Ácido 10'), con la alternancia de temperatura (25/30°C, 25/35°C y 25/40°C). Los mayores porcentajes de germinación en todas las especies se obtuvieron a la temperatura alterna de 25/30°C, y los tratamientos de escarificación resultaron adecuados para eliminar la dormancia exógena presente en cada una de las especies. Se concluye que la mejor combinación fue la temperatura alterna de 25/30°C con la escarificación con ácido en todas las especies, excepto en *Crotalaria* sp. en la que resultó mejor el agua a 80°C durante 2' combinada con 25/30°C.

Palabras clave: Escarificación, germinación, leguminosas

Abstract

Seeds from five herbaceous legumes with different collection times were used: *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria* sp. and *Centrosema pubescens*, from the genebank of the Experimental Station of Pastures and Forages "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. A simple classification experiment with factorial arrangement and five replications (25 seeds per each) was designed, in order to evaluate the combination of four pregerminative treatments: intact seeds (control); water at 80°C for 2' (Water 2'); 96% H₂SO₄ during 5' (Acid 5') and 96% H₂SO₄ for 10' (Acid 10'), with temperature alternance (25/30°C, 25/35°C and 25/40°C). The highest germination percentages in all species were obtained at the alternate temperature 25/30°C, and the scarification treatments were adequate to eliminate the exogenous dormancy present in each of the species. The best combination was concluded to be the alternate temperature 25/30°C with the acid scarification in all species, except in *Crotalaria* sp., in which water at 80°C for 2' combined with 25/30°C turned out to be better.

Key words: Germination, legumes, scarification

Introducción

La aplicación de tratamientos pregerminativos, como los de escarificación térmica o ácida, forma parte de la metodología tradicional agrícola para incrementar y acelerar la germinación de las semillas frescas de las leguminosas que tienen dormancia exógena por impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua (Nikolaeva *et al.*, 1985). Con este fin algunos autores han estudiado el efecto de la combinación de la escarificación y la temperatura en la germinación de las semillas de leguminosas, tales como *Albizia lebbeck*, *Gliricidia sepium* y *Bauhinia purpurea* (Reino *et al.*, 2008).

En este sentido se deben aplicar tratamientos que además de estimular la germinación, incrementen el vigor de las plantas durante la emergencia y así asegurar la posterior regeneración, lo que debe ser una tarea permanente en todos los bancos de genes.

Entre los más utilizados se encuentran los tratamientos de hidratación-deshidratación (Sánchez *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2007). En Cuba se han obtenido incrementos notables tanto en la germinación de las semillas como en el establecimiento de las plántulas de varias especies de interés forrajero, como *Macroptilium atropurpureum* Urb (Orta *et al.*, 1983) y *Crotalaria spectabilis* (González *et al.*, 2006) y en algunas arbóreas como *A. lebbeck* y *G. sepium* (González *et al.*, 2009).

Por lo antes expuesto el objetivo del presente trabajo fue la determinación de la combinación óptima de los tratamientos de temperatura y escarificación para las semillas de *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria* sp. y *Centrosema pubescens*, así como su efecto en la germinación.

Materiales y Métodos

Material vegetal. Se utilizaron semillas de cinco especies de leguminosas herbáceas con diferentes tiempos de colecta: *Indigofera* sp. (1998), *D. virgatus* (1998), *C. ternatea* (1999), *Crotalaria* sp. (1999) y *C. pubescens* (1997), procedentes de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, las que fueron

Introduction

The application of pregerminative treatments, such as thermal or acid scarification, is part of the traditional agricultural methodology to increase and accelerate the germination of fresh seeds from legumes which have exogenous dormancy due to impermeability of seed coats to water (Nikolaeva *et al.*, 1985). With this purpose, some authors have studied the effect of the combination of scarification and temperature on legume seed germination, such as *Albizia lebbeck*, *Gliricidia sepium* and *Bauhinia purpurea* (Reino *et al.*, 2008).

In this sense, treatments should be applied that in addition to stimulating germination, increase plant vigor during emergence and thus ensure later regeneration, which should be a permanent task in all genebanks.

Among the most used ones are hydration-dehydration treatments (Sánchez *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2007). In Cuba remarkable increases have been obtained in seed germination as well as seedling establishment of several forage species, such as *Macroptilium atropurpureum* Urb (Orta *et al.*, 1983) and *Crotalaria spectabilis* (González *et al.*, 2006) and of some trees such as *A. lebbeck* and *G. sepium* (González *et al.*, 2009).

Due to the above-explained the objective of this work was the determination of the optimum combination of temperature and scarification treatments for the seeds from *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria* sp. and *Centrosema pubescens*, as well as its effect on germination.

Materials and Methods

Plant material. Seed from five species of herbaceous legumes with different collection times were used: *Indigofera* sp. (1998), *D. virgatus* (1998), *C. ternatea* (1999), *Crotalaria* sp. (1999) and *C. pubescens* (1997), from the Experimental Station of Pastures and Forages “Indio Hatuey”, which were stored under controlled conditions ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) until they were used on January, 2002.

almacenadas en condiciones controladas ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta su empleo en enero del 2002.

Diseño y tratamientos. Se diseñó un experimento de clasificación simple con arreglo factorial y cinco réplicas (25 semillas cada una). Se combinaron cuatro tratamientos pregerminativos: semillas intactas (control); agua a 80°C durante 2' (Agua 2'); H_2SO_4 al 96% durante 5' (Ácido 5') y H_2SO_4 al 96% durante 10' (Ácido 10'), y la alternancia de temperatura ($25/30^\circ\text{C}$, $25/35^\circ\text{C}$ y $25/40^\circ\text{C}$), con ocho horas para la temperatura más elevada y 12 horas para 25°C , y una transición de cuatro horas.

Variables estudiadas. Se determinó el porcentaje de germinación final (G) y a las semillas que no germinaron se les practicó la prueba de TZ (ISTA, 1999) para establecer el porcentaje de semillas muertas (M) y dormantes (D). También se determinó el contenido de humedad mediante el secado durante 17 horas en una estufa mantenida a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (ISTA, 1999).

Las pruebas de germinación se realizaron en placas de Petri (9 cm de diámetro) que se colocaron en cámara de crecimiento (Gallenkamp, Londres) equipada con lámparas fluorescentes de 40 W situadas a 20 cm del nivel de las placas, con un fotoperíodo de 8 horas-luz que coincidió con el termoperíodo de mayor temperatura.

Análisis de los datos. Los datos expresados en porcentaje se transformaron en $\arcsen \sqrt{\%}$ y se procesaron por ANOVA de clasificación simple. Se aplicó una prueba de Duncan ($P \leq 0,05$) para detectar diferencias entre las medias.

Resultados y Discusión

Contenido de humedad de las semillas. Las semillas de las cinco especies estudiadas presentaron un contenido de humedad que osciló entre 7,9 y 11,8% (tabla 1), por lo que pertenecen a la categoría de ortodoxas propuesta inicialmente por Roberts (1973). Los valores de este indicador estuvieron cerca de los informados para las semillas frescas de leguminosas, que variaron entre 7 y 11%, y ello posiblemente se deba a la fuerte impermeabilidad de las cubiertas en estas especies, aspecto importante para evitar variaciones en el contenido de humedad,

Design and treatments. A simple classification experiment with factorial arrangement and five replications (25 seeds each) was designed. Four pregerminative treatments were combined: intact seeds (control); water at 80°C for 2' (Water 2'); 96% H_2SO_4 during 5' (Acid 5') and 96% H_2SO_4 for 10' (Acid 10'), and temperature alternance ($25/30^\circ\text{C}$, $25/35^\circ\text{C}$ and $25/40^\circ\text{C}$), with eight hours for the highest temperature and 12 hours for 25°C , and a four-hour transition.

Studied variables. The final germination percentage (G) was determined and the TZ test (ISTA, 1999) was practiced on the seeds that did not germinate, in order to establish the percentage of dead (M) and dormant (D) seeds. The moisture content was also determined through drying for 17 hours in an oven maintained at $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (ISTA, 1999).

The germination tests were conducted on Petri dishes (9 cm diameter), which were placed in growth chamber (Gallenkamp, London) with fluorescent 40-W lamps located 20 cm above the level of the dishes, with a photoperiod of 8 hours-light, which coincided with the highest-temperature thermoperiod.

Data analysis. The data expressed in percentage were transformed into $\arcsin \sqrt{\%}$ and were processed by simple classification ANOVA. A Duncan's test was applied ($P \leq 0,05$) to detect differences among means.

Results and Discussion

Seed moisture content. The seeds from the five studied species showed a moisture content that varied between 7,9 and 11,8% (table 1), for which they belong to the orthodox category initially proposed by Roberts (1973). The values of this indicator were close to the ones reported for fresh legume seeds, which varied between 7 and 11% and that is possibly due to the high impermeability of the seed coats in these species, important aspect for avoiding variations in the moisture content, because of the storage environment (Nikolaeva *et al.*, 1985).

Germination test. Most of the intact seeds (control) did not germinate or showed very low

Tabla 1. Contenido de humedad de las semillas (%).

Table 1. Seed moisture content (%).

Especie	Humedad
<i>Indigofera sp.</i>	9,33
<i>Desmanthus virgatus</i>	7,90
<i>Clitoria ternatea</i>	8,10
<i>Crotalaria sp.</i>	9,43
<i>Centrosema pubescens</i>	11,87

debido al ambiente de almacenamiento (Nikolaeva *et al.*, 1985).

Prueba de germinación. La mayoría de las semillas intactas (control) no germinaron o presentaron valores de germinación final muy bajos, cuando se colocaron en los tres termoperíodos ensayados. En cambio, el porcentaje de semillas dormantes en la mayoría de las especies con los diferentes tratamientos, tuvo un comportamiento inverso al porcentaje de germinación final, excepto en *C. pubescens* que fue inferior. Por su parte, en el control el porcentaje de semillas muertas fue muy bajo para *Indigofera sp.* y relativamente bajo en *C. ternatea* y *D. virgatus*. Este último indicador se incrementó en la mayoría de los casos cuando las semillas se sometieron a tratamientos pregerminativos y al aumentarse la temperatura del sustrato (tabla 2).

En general, en todas las especies estudiadas el factor tratamiento pregerminativo fue el más influyente en la germinación (tabla 3). En tres especies hubo una interacción altamente significativa ($P < 0,001$) entre la germinación, la temperatura y el tratamiento pregerminativo (*Indigofera sp.*, *C. ternatea* y *Crotalaria sp.*) y en las dos restantes (*D. virgatus* y *C. pubescens*) la interacción fue significativa ($p < 0,01$) entre la germinación y dicho tratamiento.

En *Indigofera sp.*, *D. virgatus* y *C. pubescens* los mejores resultados para incrementar la germinación se alcanzaron cuando sus semillas se sometieron a escarificación en ácido sulfúrico durante 10 minutos y se colocaron a 25/30°C; mientras que para *C. ternatea* se obtuvieron a 25/40°C durante 5 minutos, sin diferir de 25/30°C. En *Crotalaria sp.* resultó más efectiva para este fin la escarificación en agua a 80°C

final germination values, when they were put in the three essayed thermoperiods. However, the dormant seed percentage in most species with the different treatments had an inverse performance to the final germination percentage, except in *C. pubescens*, which was lower. On the other hand, in the control the dead seed percentage was very low for *Indigofera sp.* and relatively low in *C. ternatea* and *D. virgatus*. This last indicator increased in most cases when the seeds were subject to pregerminative treatments and as the substratum temperature increased (table 2).

In general, in all the studied species the factor pregerminative treatment was the most influential on germination (table 3). In three species there was a highly significant interaction ($P < 0,001$) among germination, temperature and pregerminative treatment (*Indigofera sp.*, *C. ternatea* and *Crotalaria sp.*) and in the other two (*D. virgatus* and *C. pubescens*) the interaction was significant ($P < 0,01$) between germination and such treatment.

In *Indigofera sp.*, *D. virgatus* and *C. pubescens* the best results for increasing germination were reached when their seeds were subject to scarification in sulfuric acid during 10 minutes and were placed at 25/30°C; while for *C. ternatea* they were obtained at 25/40°C for 5 minutes, without differing from 25/30°C. In *Crotalaria sp.* the scarification in water at 80°C during 2 minutes and planting at 25/30°C was more effective for this purpose. These results proved the effectiveness of scarification treatments (acid or thermal) to eliminate the dormancy imposed by the seed coats of fresh seeds from the studied species, and in general are in correspondence with the ones obtained by other authors in Cuba and fresh legume seeds (Muñoz *et al.*, 2009).

The best combination was concluded to be the alternate temperature 25/30°C with acid scarification, in all species, except *Crotalaria sp.* for which water at 80°C during 2' combined with 25/30°C turned out to be the best.

--End of the English version--

Tabla 2. Valores medios de germinación final (G), semillas dormantes (D) y muertas (M) en semillas de leguminosas (%). ◇

Table 2. Mean values of final germination (G), dormant (D) and dead seeds (M) in legume seeds (%).

Especie	Tratamiento	25/30°C			25/35°C			25/40°C		
		G	D	M	G	D	M	G	D	M
<i>Indigofera</i> sp.	Control	4	88	8	3	92	5	17	79	4
	Agua (2')	1	99	0	0	0	100	0	0	100
	Ácido (5')	96	0	4	91	3	6	85	5	10
	Ácido (10')	100	0	0	90	0	10	92	0	8
<i>Desmanthus virgatus</i>	Control	0	100	0	1	59	40	3	72	25
	Agua (2')	17	3	80	15	1	84	15	0	85
	Ácido (5')	25	0	75	17	0	83	8	0	92
	Ácido (10')	25	0	75	27	0	73	16	0	84
<i>Clitoria ternatea</i>	Control	7	73	20	5	64	31	15	60	25
	Agua (2')	0	35	65	1	40	59	0	35	65
	Ácido (5')	20	12	68	36	16	48	49	12	39
	Ácido (10')	45	1	54	47	3	50	31	0	69
<i>Crotalaria</i> sp.	Control	3	51	46	3	77	20	5	67	28
	Agua (2')	69	16	15	72	0	28	52	0	48
	Ácido (5')	25	0	75	11	11	78	8	0	92
	Ácido (10')	44	0	56	49	8	43	35	0	65
<i>Centrosema pubescens</i>	Control	19	16	65	23	15	62	15	15	70
	Agua (2')	28	0	72	19	3	78	7	0	93
	Ácido (5')	79	5	16	59	0	41	47	0	53
	Ácido (10')	72	0	28	60	0	40	55	0	45

Semillas intactas (control); agua a 80°C durante 2' (Agua 2'); H₂SO₄ al 96% durante 5' (Ácido 5') y H₂SO₄ al 96% durante 10' (Ácido 10')

◇ Valores retransformados

Tabla 3. Análisis de los porcentajes de germinación final, semillas dormantes y muertas, de leguminosas sometidas a diferentes termoperíodos y tratamientos pregerminativos.

Table 3. Analysis of the percentages of final germination, dormant and dead seeds of legumes subject to different thermoperiods and pregerminative treatments.

Especie	Dependencia	ES +
<i>Indigofera</i> sp.	Germinación x Temperatura x Tratamiento pregerminativo	34,8 ***
	Germinación x Temperatura	82,3 ***
	Germinación x Tratamiento pregerminativo	334,8 ***
<i>Desmanthus virgatus</i>	Germinación x Temperatura x Tratamiento pregerminativo	12,3 ns
	Germinación x Temperatura	18,3 ns
	Germinación x Tratamiento pregerminativo	52,0 **
<i>Clitoria ternatea</i>	Germinación x Temperatura x Tratamiento pregerminativo	113,0 ***
	Germinación x Temperatura	107,1 ***
	Germinación x Tratamiento pregerminativo	36,2 **
<i>Crotalaria</i> sp.	Germinación x Temperatura x Tratamiento pregerminativo	105,4 ***
	Germinación x Temperatura	129,6 ***
	Germinación x Tratamiento pregerminativo	174,1 ***
<i>Centrosema pubescens</i>	Germinación x Temperatura x Tratamiento pregerminativo	13,1 ns
	Germinación x Temperatura	15,9 ns
	Germinación x Tratamiento pregerminativo	66,2 **

ns: no significativo; **, *** significativo a P< 0,01 y P<0,001, respectivamente (Duncan, 1955)

durante 2 minutos y siembra a 25/30°C. Estos resultados evidenciaron la efectividad de los tratamientos de escarificación (ácida o térmica) para eliminar la dormancia impuesta por las cubiertas seminales que presentan las semillas frescas de las especies estudiadas, y en general están en correspondencia con los obtenidos por otros autores en Cuba, en semillas frescas de leguminosas (Muñoz *et al.*, 2009).

Se concluye que la mejor combinación fue la temperatura alterna de 25/30°C con la escarificación en ácido, en todas las especies, excepto en *Crotalaria* sp. para la que resultó ser mejor el agua a 80°C durante 2' combinada con 25/30°C.

Referencias bibliográficas

- González, Yolanda *et al.* 2006. Efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación en la emergencia y el rendimiento de *Macroptilium atropurpureum* y *Crotalaria spectabilis*. *Pastos y Forrajes*. 29:31
- González, Yolanda *et al.* 2009. Efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación en la germinación, la emergencia y el vigor de las plántulas de *Albizia lebbbeck* y *Gliricidia sepium*. *Pastos y Forrajes*. 32:255
- ISTA. 1999. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 27:155 (Suppl.)
- Muñoz, Bárbara C. *et al.* 2009. Valoración germinativa de 20 accesiones de leguminosas almacenadas en condiciones desfavorables. *Pastos y Forrajes*. 32:263
- Nikolaeva, M.G. *et al.* 1985. Manual de técnicas pregerminativas para semillas dormantes (en ruso). Nauka, Moscú. 348 p.
- Orta, R. *et al.* 1983. Aplicación de tratamientos pregerminativos a semillas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*. Moc & Sessé) Urb. Memorias del I Simposio de Botánica, La Habana, Cuba. Tomo V, p. 251
- Reino, J. *et al.* 2008. Temperatura óptima de germinación y patrones de imbibición de las semillas de *Albizia lebbbeck*, *Gliricidia sepium* y *Bauhinia purpurea*. *Pastos y Forrajes*. 31:209
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1:499
- Sánchez, J.A. *et al.* 2007. Enhanced germination, emergence and seedling vigour of *Leucaena leucocephala* using hardening hydration and acid shock treatments. *Seed Sci. Technol.* 35:224
- Sánchez, J.A. *et al.* 2001. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*. 25:67

Recibido el 27 de abril del 2011

Aceptado el 12 de mayo del 2011