

EFFECTOS COMBINADOS DE ESCARIFICACIÓN Y DE HIDRATACIÓN PARCIAL EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS ENVEJECIDAS DE LEGUMINOSAS

J.A. Sánchez¹, Bárbara Muñoz¹, J. Reino² y Laura Montejo¹

¹Instituto de Ecología y Sistemática, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente
Carretera de Varona km 3 ½ Capdevila, Boyeros, A.P. 8029, C.P. 10800, Habana 8, Cuba
E-mail: ecologia.ies@ama.cu

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Se estudió la respuesta germinativa de semillas envejecidas de *Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum* y *Mimosa invisa* en condiciones de estrés calórico (25-35°C ó 25-40°C) y sometidas a tratamientos pregerminativos de escarificación (ácida y térmica) y de hidratación parcial en agua o en soluciones osmóticas (polietilenglicol 6000). La combinación más económica, escarificación térmica (agua 80°C durante 2') más hidratación-deshidratación en agua (6 y 48 horas, respectivamente, a 30°C), fue un procedimiento adecuado para incrementar la germinación y la emergencia final de las plántulas en las tres especies, con relación a las semillas sometidas solamente a los tratamientos tradicionales de escarificación ácida o térmica. También la aplicación combinada de los tratamientos indujo la termotolerancia en los cultivares, lo que fue mayor en *M. invisa* a 25-40°C.

Palabras clave: *Crotalaria spectabilis*, germinación, *Macroptilium atropurpureum*, *Mimosa invisa*, semillas

The germinative response of aged *Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum* and *Mimosa invisa* seeds was tested under heat stress conditions (25-35°C or 25-40°C) and exposition to pregerminative acid and heat scarification and partial hydration in water or osmotic solution (polyethylene glycol 6000). The most economic combination, heat scarification (water at 80°C for 2') with hydration-dehydration in water (6 and 48 hours, respectively, at 30°C), was an appropriate procedure to increase the final germination and seedling emergence in the three species, as compared to the seeds subjected only to traditional treatments of acid and heat scarification. The combined application of the treatments also induced thermotolerance in the cultivars which was higher in *M. invisa* at 25-40°C.

Key words: *Crotalaria spectabilis*, germination, *Macroptilium atropurpureum*, *Mimosa invisa*, seeds

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 leguminosas que tienen dormancia exógena por impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua (Nikolaeva, 1982). Sin embargo, cuando estos tratamientos se aplican a las semillas envejecidas pueden afectar considerablemente su viabilidad (Potsov, 1976; González y Mendoza, 1999), debido posiblemente al daño en las membranas celulares (McDonald, 1999).

Los tratamientos fisiológicos de hidratación-deshidratación constituyen una ecotecnología de bajos insumos que ha probado ser adecuada para incrementar, acelerar y sincronizar la germinación de las semillas frescas y envejecidas de muchos cultivos (McDonald, 2000; Sánchez, Orta y Muñoz, 2001). Estos procedimientos consisten, fundamentalmente, en la inmersión de las semillas en

agua o en soluciones osmóticas durante cierto tiempo, con deshidratación previa a la siembra o sin ella. Se basan en la correlación que se establece entre los contenidos de humedad que alcanzan las semillas y la secuencia de eventos bioquímico-fisiológicos que se activan en estas durante su patrón trifásico de adsorción de agua (Bewley, 1997).

Evidentemente la aplicación efectiva de los tratamientos de hidratación parcial en las semillas duras de leguminosas debe estar precedida de un tratamiento de escarificación que permita el intercambio de agua entre las semillas y el medio (Orta, Pozo, Pérez y Espinosa, 1983). En el presente trabajo se examinó la respuesta germinativa de semillas envejecidas de *Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum* (Moc & Sessé) Urb., y *Mimosa invisa* a la combinación de tratamientos de escarificación (ácida y térmica) con los de hidratación parcial en agua o en soluciones osmóticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las semillas fueron suministradas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. La recolección de *M. invisa* y *M. atropurpureum* se realizó en 1974 y 1975, respectivamente. Las semillas de *C. spectabilis* se recolectaron en 1984. Todas las semillas se almacenaron en cámaras con altas fluctuaciones de humedad y temperatura. Las semillas intactas (control) de *C. spectabilis* y *M. atropurpureum* presentaron una germinación entre 1 y 3 %, y *M. invisa* no germinó. El contenido de humedad se determinó mediante el secado durante 17 horas en una estufa mantenida a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (ISTA, 1999).

Diseño y tratamientos. Se aplicó un diseño de clasificación simple con arreglo factorial y cinco réplicas (25 semillas cada una) para estudiar la germinación de las semillas sometidas a diferentes tratamientos pregerminativos y condiciones de estrés calórico del sustrato. Se aplicaron dos tratamientos de escarificación: agua a 80°C durante 2' y H_2SO_4 al 96 % durante 5', que se combinaron con cinco tratamientos de hidratación parcial: uno en agua y cuatro en soluciones de polietilenglicol 6000 (PEG). El tratamiento no osmótico se realizó mediante la hidratación de las semillas en agua destilada durante 6 horas a 30°C ; esta temperatura se corresponde con el rango superior del termoperíodo óptimo ($25\text{--}30^\circ\text{C}$) para la germinación de las especies estudiadas, según Muñoz, Bárbara y Sánchez, J. A. (datos sin publicar). La deshidratación se llevó a cabo al aire durante 48 horas hasta alcanzar aproximadamente el contenido de humedad inicial de las semillas (7–14 % sobre la base de la masa fresca).

El potencial hídrico de las soluciones de PEG (-0,27; -0,41; -0,77 y -1,22 MPa) a 25°C se calculó por la ecuación propuesta por Hardegree y Emmerich (1990) y la hidratación osmótica se efectuó por el método tradicional sugerido por Heydecker, Higgins y Gulliver (1973), que consistió en la imbibición de las semillas en las respectivas soluciones durante 48 horas a 25°C . La deshidratación fue similar a la del tratamiento no osmótico.

Las pruebas de germinación de las semillas tratadas o no tratadas se realizaron en dos temperaturas alternas del sustrato ($25\text{--}35^\circ\text{C}$ y $25\text{--}40^\circ\text{C}$) y bajo luz blanca fluorescente. El termoperíodo empleado fue de 8 horas para la temperatura más elevada y de 12 horas para 25°C , con una transición entre ambas de 4 horas. Esto se logró colocando las semillas en placas Petri (9 cm

de diámetro) sobre papel de filtro humedecido con agua destilada estéril e incubándolas en cámaras de crecimiento (Gallenkamp, Londres) equipadas con lámparas fluorescentes de 40 W situadas a 20 cm del nivel de las placas. El fotoperíodo fue de 8 horas-luz y coincidió con el termoperíodo de mayor temperatura.

Variables estudiadas. El conteo de la germinación se realizó diariamente durante 7 días. Se determinó el porcentaje de germinación final, la velocidad de germinación (expresada en el tiempo para alcanzar el 10 % de germinación en la muestra, T_{10}) y el porcentaje de emergencia final (primera señal visible de los cotiledones).

Análisis de los datos. Se hizo independientemente para cada especie. Las variables expresadas en porcentajes se transformaron en $\arcsin \sqrt{\%}$ y se procesaron por ANOVA factorial (tratamiento pregerminativo x temperatura). En *C. spectabilis* los datos de la velocidad de germinación y el porcentaje de emergencia final se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple. Los valores retransformados de los porcentajes aparecen en las tablas y figuras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La germinación de *C. spectabilis* no se afectó significativamente por la temperatura del sustrato, ni por la interacción de este factor con el tratamiento pregerminativo ($P > 0,05$). En cambio, el factor principal tratamiento pregerminativo influyó significativamente en su respuesta germinativa (tabla 1). Los mayores porcentajes de germinación final, en ambas temperaturas de siembra, se obtuvieron con el tratamiento pregerminativo T6 (escarificación térmica más un ciclo de hidratación-deshidratación en agua). No obstante, los resultados alcanzados con el procedimiento T6 no mostraron diferencias significativas con los de los tratamientos T3 y T4 (escarificación ácida más un ciclo de hidratación-deshidratación en agua y escarificación térmica, respectivamente) (fig. 1). Los porcentajes de germinación con los tratamientos pregerminativos T1, T2 y T5 (escarificación ácida, escarificación ácida más hidratación parcial en PEG, y escarificación térmica más hidratación parcial en PEG, respectivamente) fueron significativamente inferiores a los alcanzados con los tratamientos anteriormente señalados. Al parecer, la escarificación ácida en combinación o no con la hidratación parcial en PEG resultó menos adecuada para incrementar la germinación en las semillas envejecidas.

Tabla 1. ANOVA para los factores estudiados en *C. spectabilis*.

(A)		Fuente de variación (F)		
Variable dependiente		Tratamiento pregerminativo	Temperatura	Interacción
Germinación		4,0*	2,0	0,5
(B)		Germinación (%)	Velocidad (días)	Emergencia (%)
Temperatura/Tratamiento ¹				
25-35°C	T1	9,3		6,3
	T2	8,0		6,6
	T3	10,6	3,8 ^a	10,0
	T4	12,0	1,3 ^b	10,6
	T5	6,6		
	T6	13,3	1,5 ^b	10,6
25-40°C	T1	2,6		
	T2	5,3		5,3
	T3	9,3		8,0
	T4	6,6		
	T5	6,6		
	T6	14,6	1,5 ^b	9,3
ES(±)		1,0	0,6	0,7

¹ T1: escarificación ácida; T2: T1 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); T3: T1 + hidratación parcial en agua; T4: escarificación térmica; T5: T4 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); y T6: T4 + hidratación parcial en agua

a,b Medias con letras diferentes, en la misma columna, difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955)

* $P < 0,05$

Sin embargo, al comparar los resultados con relación al control (semillas intactas, 1% de germinación) se evidenció que la escarificación, en combinación o no con los tratamientos de hidratación parcial, fue apropiada para incrementar la germinación. Por otra parte, los resultados con los tratamientos pregerminativos de escarificación, en combinación con los de hidratación parcial en soluciones de polietilenglicol de -0,27; -0,48 y -1,22 MPa, fueron significativamente inferiores a los que se obtuvieron con las soluciones de -0,77 MPa en todas las especies y en cualquier variable analizada, por lo que no se incluyeron en el análisis.

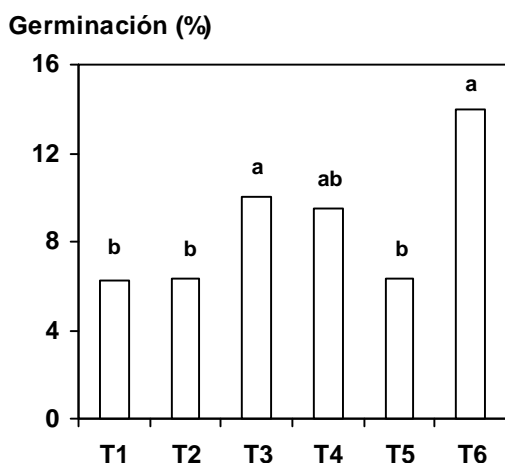
La velocidad de germinación en las semillas de *C. spectabilis* siguió un comportamiento similar al porcentaje de germinación (tabla 1); la germinación más rápida se alcanzó con los tratamientos T4 y T6, que lograron disminuir a menos de 2 días el tiempo necesario para alcanzar el 10% de germinación en la muestra. Sin embargo, el porcentaje de emergencia final no difirió significativamente entre los tratamientos, aunque existió una tendencia a incrementarse con T3, T4 y T6 (tabla 1). Se conoce que la velocidad de germinación está correlacionada positivamente con una emergencia rápida en condiciones de campo y con un mayor desarrollo de las plántulas en especies de interés

agrícola (Czabator, 1962; Bonner, 1998; Sánchez, Calvo, Muñoz y Orta, 1999). Por consiguiente, tales evidencias demuestran la importancia práctica que tiene el incremento de la velocidad de germinación alcanzado con los tratamientos pregerminativos.

En las semillas de *M. atropurpureum* todas las variables analizadas se afectaron significativamente por la aplicación de los tratamientos pregerminativos ($P \leq 0,05$) y la interacción de este factor con la temperatura no fue significativa (tabla 2). Los mejores resultados en el incremento de la germinación y la emergencia (fig. 2) se obtuvieron cuando los tratamientos de escarificación ácida o térmica se combinaron con los de hidratación parcial (T2, T3 y T6), aunque en la variable germinación final los resultados obtenidos con los procedimientos antes señalados no mostraron diferencias significativas con los de escarificación ácida y térmica (T1 y T4, respectivamente). En general, los efectos logrados en la emergencia final de las plántulas demuestran el sinergismo que establece la combinación de estos métodos para mejorar el establecimiento de las plantas, cuando se compara con los tratamientos tradicionales de escarificación. También los efectos en el porcentaje de germinación pueden considerarse satisfactorios,

si se comparan con el 3% alcanzado en las semillas intactas.

Resultados similares obtuvieron Orta *et al.* (1983) en esta misma especie al utilizar la combinación de escarificación ácida con hidratación parcial de las semillas en soluciones de PEG. La efectividad de los tratamientos de hidratación-deshidratación para revigorizar las semillas ha sido comprobada en diversos cultivos. Al parecer los referidos procedimientos no sólo promueven los mecanismos reparadores de DNA, proteínas, lípidos y membranas, sino también activan los mecanismos antioxidantes, eliminadores de radicales libres (Kester, Geneve y Houtz, 1997; Bailly, Benamar, Corbineau y Côme, 1998; 2000). El incremento de la actividad antioxidante en las células evita fundamentalmente la peroxidación lipídica y con ello el envejecimiento de las semillas (McDonald, 1999; 2000).



a,b Medias con letras distintas difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 1. Efectos combinados de los tratamientos de escarificación con los de hidratación parcial en la germinación de *C. spectabilis*. T1: escarificación ácida; T2: T1 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); T3: T1 + hidratación parcial en agua; T4: escarificación térmica; T5: T4 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa), y T6: T4 + hidratación parcial en agua.

Por último, *M. invisa* fue la única especie que mostró interacción altamente significativa entre los factores estudiados para el porcentaje de germinación y de emergencia final (tabla 3). Todos los tratamientos pregerminativos fueron adecuados

para incrementar ambos procesos con relación a las semillas no tratadas o intactas (no germinaron). Pero sólo cuando el estrés calórico del sustrato se hizo más severo, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de escarificación (térmica y ácida) y la combinación de procedimientos (tabla 3). Esto es un resultado sumamente interesante, debido a que las condiciones de estrés son las que encuentran las semillas con mayor frecuencia cuando llegan al suelo (Khan, 1992; Bradford, 1995; Bonner, 1998).

Igualmente, se demostró que los tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación en esta especie no sólo activaron el aparato metabólico relacionado con la germinación, sino también estimularon numerosos procesos bioquímico-fisiológicos de tolerancia al estrés ambiental (Henckel, 1982), que permanecen latentes en condiciones ambientales óptimas (Heydecker, 1977). Efectos similares se han obtenido en diferentes hortalizas y árboles forestales pioneros cuando las semillas se someten a tratamientos de hidratación parcial previamente a su siembra en condiciones ecológicas adversas (McDonald, 2000; Sánchez, 2000; Sánchez, Muñoz y Fresneda, 2001). Bradford (1986) también sugirió que una medida de la efectividad de los tratamientos de hidratación-deshidratación podría ser la capacidad de germinación de las semillas sometidas a un potencial de agua reducido y a temperaturas adversas.

En general, los resultados en *M. invisa* con los tratamientos de escarificación demostraron que el principal problema para su germinación, en condiciones de laboratorio, se debe a la fuerte impermeabilidad de su cubierta seminal, que al mismo tiempo le permite evitar el intercambio de humedad con el ambiente de almacenamiento y tener un alto porcentaje de germinación final a pesar de haber sido cosechada en 1974 y almacenada en condiciones desfavorables para la viabilidad de sus semillas.

En conclusión, en las tres especies la escarificación térmica más hidratación parcial en agua, la combinación más económica, resultó un procedimiento adecuado para mejorar la germinación y la emergencia de las plántulas. Además, la combinación de tratamientos incrementó la termotolerancia en los tres cultivares, lo que fue más evidente en *M. invisa* a 25-40°C.

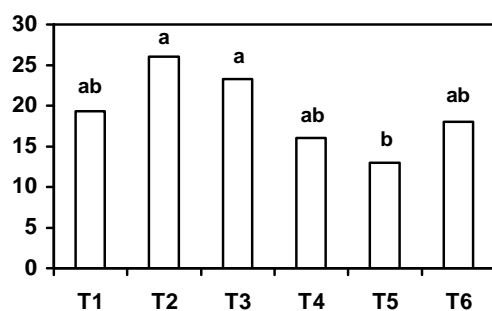
Tabla 2. ANOVA para los factores estudiados en *M. atropurpureum*.

(A)		Fuente de variación (F)		
Variable dependiente		Tratamiento pregerminativo	Temperatura	Interacción
Germinación		6,0*	0,9	0,3
Velocidad		5,8*	1,2	0,1
Emergencia		4,2*	0,3	0,4
(B)		Germinación (%)	Velocidad (días)	Emergencia (%)
Temperatura/Tratamiento ¹				
25-35°C	T1	22,6	1,4	14,6
	T2	25,3	0,5	21,3
	T3	25,3	0,6	25,3
	T4	14,6	1,4	12,0
	T5	13,3	0,8	10,6
	T6	17,3	0,7	16,0
25-40°C	T1	16,0	1,8	13,3
	T2	26,6	0,5	25,3
	T3	22,6	0,5	18,6
	T4	17,3	1,1	12,3
	T5	13,3	0,8	5,3
	T6	18,3	0,7	16,0
ES(±)		1,4	0,1	1,7

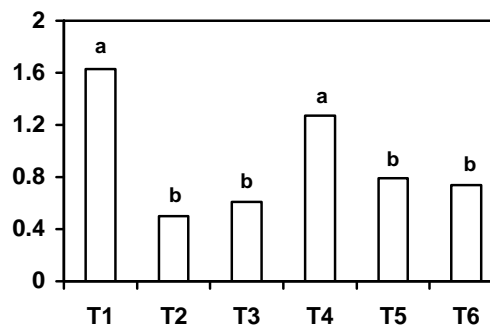
¹ T1: escarificación ácida; T2: T1 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); T3: T1 + hidratación parcial en agua; T4: escarificación térmica; T5: T4 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); y T6: T4 + hidratación parcial en agua

* P<0,05

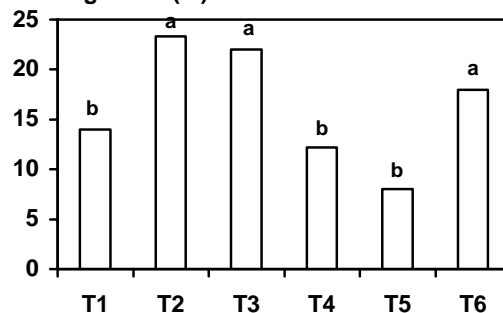
Germinación (%)



Velocidad (días)



Emergencia (%)



a, b Medias con letras distintas difieren significativamente $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 2. Efectos combinados de los tratamientos de escarificación con los de hidratación parcial en la germinación y emergencia de *M. atropurpureum*.

Tabla 3. ANOVA para los factores estudiados en *M. invisa*.

(A)		Fuente de variación (F)		
Variable dependiente		Tratamiento pregerminativo	Temperatura	Interacción
Germinación		10,0 ***	3,0*	6,2**
Velocidad		1,9	2,3	0,4
Emergencia		20,5 ***	23,1 ***	15,6 ***
(B)		Germinación (%)	Velocidad (días)	Emergencia (%)
Temperatura/Tratamiento ¹				
25-35°C	T1	97,3 ^a	0,3	97,3 ^a
	T2	98,6 ^a	0,3	97,3 ^a
	T3	80,3 ^c	0,3	77,6 ^b
	T4	98,6 ^a	0,3	98,6 ^a
	T5	98,6 ^a	0,3	96,0 ^a
	T6	98,6 ^a	0,3	97,3 ^a
25-40°C	T1	90,5 ^b	0,5	62,6 ^c
	T2	97,3 ^a	0,3	97,3 ^a
	T3	93,3 ^{ab}	0,3	81,3 ^b
	T4	920,2 ^{ab}	0,3	84,0 ^b
	T5	98,6 ^a	0,3	98,6 ^a
	T6	98,6 ^a	0,3	96,0 ^a
ES(±)		1,5	0,0	3,3

¹ T1: escarificación ácida; T2: T1 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); T3: T1 + hidratación parcial en agua; T4: escarificación térmica; T5: T4 + hidratación parcial en PEG (-0,77 MPa); y T6: T4 + hidratación parcial en agua

a,b,c Medias con letras diferentes, en la misma columna, difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955)

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

*** $P \leq 0,001$

REFERENCIAS

- Bailly, C.; Benamar, A.; Corbineau, F. & Côme, D. 1998. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiologia Plantarum*. 104:646
- Bailly, C.; Benamar, A.; Corbineau, F. & Côme, D. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Sci. Res.* 10:35
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9:1055
- Bonner, F.T. 1998. Testing tree seeds for vigor: a review. *Seed Technology*. 20:5
- Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *HortScience*. 21:1105
- Bradford, K.J. 1995. Water relations in seed germination. In: Seed development and germination. (Eds. J. Kigel & G. Galili). Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong. p. 351
- Czabator, F.J. 1962. Germination value: hand index combining speed and completeness of pine germination. *Forest Science*. 8:386
- González, Y. & F. Mendoza, F. 1999. Efecto de diferentes tratamientos en la germinación de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 22:327
- Hardegree, S.P. & Emmerich, W.E. 1990. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution-saturated filter paper. *Plant Physiol*. 92:462
- Henckel, P.A. 1982. Fisiología de la resistencia de las plantas al calor y a la sequía [en ruso]. Nauka, Moscú. 280 p.
- Heydecker, W. 1977. Stress and germination. In: The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. (Ed. A.A. Khan). Elsevier/North-Holland, Amsterdam. p. 240
- Heydecker, W.; Higgins, J. & Gulliver, R.L. 1973. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*. 246:42
- ISTA. 1999. International rules for seed testing. *Seed Sci. & Technol.* 27:155
- Kester, S.T.; Geneve, R.L. & Houtz, R.L. 1997. Priming and accelerated ageing affect L-isoaspartyl methyltransferase activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *J. Expt. Bot.* 48:943
- Khan, A.A. 1992. Preplant physiological seed conditioning. *Hort. Rev.* 14:131

- McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. **Seed Sci. & Technol.** 27:177
- McDonald, M.B. 2000. Seed priming. In: Seed technology and its biological basic. (Eds. M. Black & J.D. Bewley). Academic Press. Sheffield. p. 286
- Nikolaeva, M.G. 1982. Dormancia de las semillas. En: Fisiología de las semillas [en ruso]. (Ed. A.A. Prokofiev). Nauka, Moscú. p. 318
- Orta, R.; Pozo, L.; Pérez, E. & Espinosa, I. 1983. Aplicación de tratamientos pregerminativos a semillas de Siratro /*Macroptilium atropurpureum* (Moc & Sessé) Urb./ En: Memorias del I Simposio de Botánica. La Habana, Cuba. p. 251
- Potsov, A.V. 1976. Biología de la latencia de las semillas por cubiertas duras [en ruso]. Nauka, Moscú. 156 p.
- Sánchez, J.A. 2000. Regenerative strategies of main forest pioneer species under adverse ecological conditions of the Sierra del Rosario, Cuba. Informe Final del Proyecto MAB-UNESCO (SC/ECO/565/19.1). París, Francia. 94 p.
- Sánchez, J.A.; Orta, R. & Muñoz, Bárbara. 2001. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. **Agronomía Costarricense**. 25:67
- Sánchez, J.A.; Calvo, E.; Muñoz, Bárbara & Orta, R. 1999. Efecto de los tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación sobre la germinación, establecimiento, floración y fructificación del pepino. **Agronomía Costarricense**. 23:193
- Sánchez, J.A.; Muñoz, Bárbara & Fresneda, J. 2001. Combined effects of hardening hydration-dehydration and heat shock treatments on the germination of tomato, pepper and cucumber. **Seed Sci. & Technol.** 29:691

Recibido el 13 de junio del 2002
Aceptado el 26 de noviembre del 2002