

Valoración germinativa de 20 accesiones de leguminosas almacenadas en condiciones desfavorables

Germinative evaluation of 20 legume accessions stored under unfavorable conditions

Bárbara C. Muñoz₁, J. A. Sánchez₁, Laura A. Montejó₁, Yolanda González₂ y J. Reino₂

¹Instituto de Ecología y Sistemática

Carretera de Varona km 3¹/₂, Capdevila, AP 8029, CP 10800 Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba

E-mail: ecologia.ies@ama.cu

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba

Resumen

Se valoró la respuesta germinativa de 20 accesiones de leguminosas procedentes de diferentes tiempos de almacenamiento, en condiciones inadecuadas de humedad y temperatura, y sometidas a tratamientos de escarificación térmica y ácida antes de la siembra, con distintas temperaturas del sustrato. Independientemente del tiempo de almacenamiento, el contenido de humedad de las semillas fue inferior al 15%. Las semillas de las accesiones con más de 12 años presentaron porcentajes de germinación inferiores al 10% para todos los tratamientos de siembra ensayados, excepto en *Centrosema pubescens* cv. CIAT 438, *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria brownii* cv. 687, *Macroptilium atropurpureum*, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 136 y *Mimosa invisa*. El resto de las accesiones presentaron diferentes grados de pérdida de la viabilidad. Las de mejor respuesta germinativa fueron *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *M. invisa* e *Indigofera* sp., debido a que alcanzaron porcentajes de germinación final superiores al 70% para, al menos, uno de los termoperíodos de siembra ensayados.

Palabras clave: Almacenamiento de semillas, escarificación, leguminosas.

Abstract

An evaluation was made of the germinative response of 20 legume accessions from different storage times, under inadequate humidity and temperature conditions, and subject to thermal and acid scarification treatments before seeding, with different temperatures of the substratum. Independently from the storage time, the moisture content of the seeds was lower than 15%. The seeds from the accessions with more than 12 years showed germination percentages lower than 10% for all the essayed planting treatments, except in *Centrosema pubescens* cv. CIAT 438, *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria brownii* cv. 687, *Macroptilium atropurpureum*, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 136 and *Mimosa invisa*. The other accessions showed different degrees of viability loss. The best germinative response occurred in *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *M. invisa* and *Indigofera* sp., because they reached final germination percentages higher than 70% for, at least, one of the studied seeding thermoperiods.

Key words: Seed storage, scarification, legumes

Introducción

Las semillas de las leguminosas se caracterizan por presentar, como principal mecanismo de dormancia, la impermeabilidad de sus cubiertas al agua y a los gases (Sabiiti, 1983; Serrato-Valenti et al., 1993; Amodu et

al., 2000; Sarmiento y Schifino-Wittmann, 2000). Este tipo de dormancia se debe a la presencia de capas de células lignificadas o suberizadas en el parénquima de empalizada, aunque otras sustancias hidrofóbicas como la cutina, la pectina, la calosa y la hemicelulosa pueden ser también responsables de la impermeabilidad (Tran y Cavanagh, 1984; Serrato-Valenti et al., 1993; Kozłowski y Pallardy, 2002). Las cubiertas duras no sólo impiden la entrada de agua al embrión, sino también restringen la difusión del oxígeno al interior de este; el mantenimiento prolongado de la anaerobiosis provoca la acumulación de ácido láctico, acetaldehído y otros productos de la fermentación que son tóxicos a las semillas (Bewley y Black, 1994; Baskin y Baskin, 1998).

Entre los métodos más ampliamente utilizados para la eliminación de este tipo de dormancia se encuentran la escarificación térmica y la química, y dentro de éstas la inmersión en agua caliente y en ácidos a diferentes intervalos y concentraciones. Diversos autores han referido las ventajas de la utilización de la escarificación con ácidos concentrados respecto a los tratamientos de inmersión en agua caliente (Sabiiti, 1983; Al Yemini y Basahy, 1999; Pandita et al., 1999). Según Orta et al. (1988) se obtiene una germinación superior al 95% en menos de 48 h, con la utilización de ácido sulfúrico concentrado en semillas frescas de diferentes leguminosas: Dolichos (10 min.), Glycine (15 min.), Leucaena (15 min.), Macroptilium (15 min.), Stylosanthes (10 min.) y Teramnus (10 min.). Sin embargo, los tratamientos de inmersión de las semillas en agua caliente son ampliamente utilizados y se obtienen resultados similares a los de la escarificación química (Schmidt, 2000; González et al., 2005).

Otra vía utilizada para la eliminación de la dormancia exógena en las leguminosas es el almacenamiento durante un tiempo prolongado (Bass, 1984); las semillas de algunas especies después de cuatro a siete años llegan a convertirse en blandas, aunque algunas como las del género *Trifolium* almacenadas húmedas durante 37-40 años, sólo responden ligeramente a los tratamientos de escarificación (Nikolaeva, 1982). En otros géneros como *Leucaena* y *Teramnus*, aunque envejecen y mueren de 0-18 y de 0-10 años, respectivamente, aquellas que logran sobrevivir responden al agua a 80°C/2 min. (González et al., 2007; González y Mendoza, 2008).

El objetivo del presente estudio fue analizar la respuesta germinativa de 20 accesiones de leguminosas procedentes de diferentes tiempos de almacenamiento, en condiciones no adecuadas de humedad y temperatura, y sometidas a escarificación térmica y ácida antes de la siembra.

Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de almacenamiento. Las semillas de leguminosas fueron suministradas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, Matanzas. El almacenamiento se realizó a una temperatura entre 5-7°C, con una humedad relativa superior a 80%. Las accesiones de cada especie se almacenaron en frascos de cristal (con tapa metálica de rosca) y permanecieron en las condiciones antes mencionadas durante diferentes tiempos (tabla 1). El estudio de las variables seminales se realizó en el Laboratorio de Semillas del Instituto de Ecología y Sistemática (IES), perteneciente al CITMA y ubicado en Ciudad de La Habana, entre septiembre del 2001 y abril del 2002.

Contenido de humedad. A cada accesión se le determinó el contenido de humedad por el método de secado a baja temperatura constante, según las normas del ISTA (1999), mediante la pesada de 10 réplicas de 50 semillas cada una, en una balanza Sartorius con precisión de 10-4.

Pruebas de germinación. Se realizó un experimento bifactorial para conocer el efecto combinado de la alternancia de temperatura del sustrato y la aplicación de tratamiento pregerminativo de escarificación térmica y ácida, en la germinación de las 20 accesiones. Se utilizaron tres rangos de temperatura: 25-30°C, 25-35°C y 25-40°C, con una alternancia de 12 h para 25°C y 8 h para la más alta de cada termoperíodo, y una transición entre ambas de 4 h; para el factor tratamiento pregerminativo se empleó la inmersión en agua a 80°C durante 2 min. y la escarificación en ácido sulfúrico durante 5 y 10 min., respectivamente, además de un control (sin tratamiento).

Tabla 1. Accesiones de semillas de leguminosas, año de la colecta, tiempo de almacenamiento y valores promedio del contenido de humedad.

Table 1. Legume seed accessions, year of collection, storage time and average moisture content values.

Accesión	Año colecta	Tiempo (años)	Humedad (%)
<i>Neonotonia wightii</i> cv. Tinaroo 73	1973	28	12,12
<i>Centrosema virginianum</i> cv. CIAT 478	1984	17	13,98
<i>Centrosema plumieri</i> cv. PI-90	1982	19	14,50
<i>Centrosema macrocarpum</i> cv. CIAT 5065	1987	14	14,40
<i>Centrosema pubescens</i> cv. PII-89	1989	12	14,82
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 438	1999	1	14,89
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 5172	1991	11	8,97
<i>Centrosema pubescens</i> cv. Baracutey	1997	5	11,87
<i>Clitoria ternatea</i>	1975	26	11,05
<i>Clitoria ternatea</i>	1999	3	8,10
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1984	17	13,57
<i>Crotalaria brownii</i> cv. 687	1968	34	8,28
<i>Crotalaria</i> sp. cv. Derecha	1999	3	9,43
<i>Mimosa invisa</i>	1974	27	6,50
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	1975	26	11,88
<i>Desmodium ovalifolium</i> cv. CIAT 13089	1989	13	7,59
<i>Teramnus labialis</i> cv. Semilla Clara	1970	32	8,20
<i>Stylosanthes guianensis</i> cv. CIAT 136	1976	26	6,04
<i>Desmanthus virgatus</i>	1998	4	7,90
<i>Indigofera</i> sp.	1998	4	9,33

Las pruebas de germinación se realizaron en placas Petri (9 cm de diámetro), sobre papel de filtro saturado en agua destilada estéril, y las semillas se incubaron en cámaras de crecimiento (Gallenkamp INF-600, Londres). Por cada tratamiento se utilizaron cinco réplicas, de 50 semillas cada una.

En todos los ensayos de germinación se consideraron como germinadas aquellas semillas con emergencia de la radícula superior a 1 mm. Se determinó el porcentaje de germinación final. A las semillas blandas que no germinaron se les practicó la prueba de TZ (Cloruro de 2, 3, 5 Trifenil Tetrazolium) según las normas del ISTA (1999), y se cuantificó el porcentaje de semillas dormantes y muertas. Aquellas que se mantuvieron duras durante la prueba de germinación se adicionaron al porcentaje de semillas dormantes.

Procesamiento estadístico de los datos. Se calcularon los valores promedio de cada variable analizada. Se empleó un ANOVA de clasificación simple con arreglo factorial de los tratamientos (tratamiento pregerminativo por termoperíodo) para el análisis de todas las variables. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante la prueba de Duncan (1955).

Resultados y Discusión

Después del almacenamiento en las condiciones descritas anteriormente, las semillas de las 20 accesiones mantuvieron contenidos de humedad inferiores al 15% (tabla 1). Roberts (1981), Nikolaeva et al. (1985) y Chin et al. (1989) informaron este valor como límite para la categoría de las semillas ortodoxas. Por otra parte, Nikolaeva et al. (1985) y Chin et al. (1989) plantearon que las semillas frescas de las leguminosas presentan entre 7 y 11% de humedad. Según estos resultados, se infiere que las semillas de las accesiones estudiadas pudieran pertenecer a la categoría de ortodoxas; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el contenido de humedad que se informa no se corresponde con el de las semillas frescas.

Centrosema pubescens cv. CIAT 5172, *Clitoria ternatea* (de 1999), *Crotalaria brownii* cv. 687, *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *Mimosa invisa*, *Desmodium ovalifolium* cv. CIAT 13089, *Teramnus labialis* cv. Semilla Clara, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 136, *Desmanthus virgatus* e *Indigofera* sp. tuvieron porcentajes de humedad acordes con lo reportado para las leguminosas (tabla 1). De este grupo, *M. invisa* y *S. guianensis* presentaron los valores más bajos para esta variable, debido posiblemente a una mayor impermeabilidad de sus cubiertas seminales.

Por otra parte, *Neonotonia wightii* cv. Tinaroo 73, *Centrosema virginianum* cv. CIAT 478, *Centrosema plumieri* cv. PI-90, *Centrosema macrocarpum* cv. CIAT 5065, *C. pubescens* cv. PII-89, *C. pubescens* cv. CIAT 438 y *Crotalaria spectabilis* mostraron valores superiores al 12%. Este último grupo de accesiones (con excepción de *C. pubescens* cv. CIAT 438) permanecieron por más de 12 años en las condiciones de almacenamiento descritas. Posiblemente a ello se deba el incremento en el contenido de humedad, aunque la constitución y el grado de impermeabilidad de sus cubiertas también pudo haber influido en que presentaran un deterioro heterogéneo (Schmidt, 2000).

Según Roberts (1981), cuando las semillas son almacenadas en ambientes de alta humedad y/o temperatura se aceleran los procesos de envejecimiento seminal. El almacenamiento con variaciones en la humedad relativa ambiental es más dañino a la semilla que el realizado bajo constante humedad relativa alta (Pérez-García et al., 2007). En contraste, los incrementos en la temperatura durante un almacenamiento en frío no causan daños tan perjudiciales a la viabilidad seminal como los producidos por la humedad (Bewley y Black, 1994; Gómez-Campo, 2006a).

Gómez-Campo (2006b) planteó que es recomendable sacar las semillas ortodoxas entre 4 y 6% de humedad; además pueden ultrasecarse (a 3% de humedad) y evitar así el envejecimiento seminal sin que sufran daños (Ellis y Hong, 2006).

C. pubescens cv. CIAT 438 sólo permaneció en condiciones inadecuadas de almacenamiento durante un año. Aunque no se puede descartar la posibilidad del efecto nocivo de las variaciones de la humedad ambiental en la integridad de las cubiertas seminales en esta especie, también pudieron influir en el incremento de la humedad los problemas de manejo en la colecta y/o secado de las semillas, que permitieron una menor resistencia de las cubiertas seminales al deterioro. Igualmente no se debe descartar la influencia de las condiciones ambientales en el momento de la formación y maduración de la semilla, en el ablandamiento de las cubiertas seminales para este lote de la especie.

Este último aspecto es de destacar si se tiene en cuenta que las accesiones de *C. pubescens* cv. CIAT 5172 y *C. pubescens* cv. Baracutey presentaron contenidos de humedad de 8,9 y 11,8% con 11 y 5 años de almacenamiento, respectivamente. Según Andersson y Milberg (1998), para evaluar el grado de profundidad de la dormancia seminal en una especie es necesario tener en cuenta las posibles diferencias entre poblaciones, el año de colecta y las condiciones de la planta madre, así como el factor genético, lo cual fue informado para dos cultivares de *Leucaena leucocephala* en cuanto al tamaño y la permeabilidad de las semillas y sus cubiertas (González et al., 2005).

Las accesiones *N. wightii* cv. Tinaroo 73, *C. virginianum* cv. CIAT 478, *C. plumieri* cv. PI-90, *Centrosema macrocarpum* cv. CIAT 5065, *C. pubescens* cv. PII-89, *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089 y *T. labialis* cv. Semilla Clara presentaron una germinación final casi nula e inferior a 10%, como promedio; las semillas muertas fueron superiores a 90% en todos los tratamientos pregerminativos ensayados, para cualquier condición de siembra, excepto en *C. ternatea* (de 1975) con agua a 80°C durante 2' (75-81%), la que presentó los mayores valores de dormancia (tabla 2). Estas relaciones entre los porcentajes de germinación final, semillas dormantes y semillas muertas indican un envejecimiento seminal en las referidas accesiones.

Las semillas que presentan dormancia por cubiertas impermeables tienden a permanecer viables por más tiempo, con relación a las especies con otros tipos de dormancia, dado que las estructuras que rodean el embrión lo aíslan del medio (Bewley y Black, 1994; Baskin y Baskin, 1998). Según McDonald (1999) la causa más frecuente del deterioro seminal se debe a la peroxidación lipídica, que inicia la generación de radicales libres. Este proceso puede ocurrir tanto por autooxidación como por oxidación enzimática. Cuando el contenido de humedad es bajo se activa la vía autooxidativa. Sin embargo, ante aumentos en el contenido de humedad se estimula la oxidación enzimática por la actividad de las enzimas hidrolíticas oxidativas, como las lipoxigenasas.

En este grupo, las cinco primeras accesiones coincidieron además con una humedad superior al 11%; mientras que en las dos últimas esta variable alcanzó valores inferiores (tabla 1). En este sentido, si la causa del envejecimiento seminal de las accesiones antes mencionadas fue el mecanismo de peroxidación lipídica,

en las cinco primeras posiblemente éste pudo ocurrir a través de la oxidación enzimática, dado el incremento en humedad que presentaron dichas muestras con relación al valor estimado para las leguminosas (entre 7 y 11%). Sin embargo, los contenidos de humedad en *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089 y *T. labialis* cv. Semilla Clara fueron de 7,6% y 8,2% después de 13 y 32 años de almacenamiento, respectivamente. Posiblemente, en estos dos casos la autooxidación lipídica pudo haber sido la causa del deterioro seminal debido al contenido de humedad en las semillas, a pesar del tiempo de almacenamiento.

Tabla 2. Germinación (G), semillas dormantes (D) y semillas muertas (M) en las accesiones con germinación final nula o baja (%).

Table 2. Germination (G), dormant seeds (D) and dead seeds (M) in the accessions with null or low final germination (%)

Accesión	Trat. pregerm.	25-30°C			25-35°C			25-40°C		
		G	D	M	G	D	M	G	D	M
<i>Neonotonia wightii</i> cv. Tinaroo 73	Control	0	5	95	2	0	98	0	10	90
	80°C H ₂ O	5	2	93	0	3	97	0	1	99
	5'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	10' H ₂ SO ₄	0	0	100	2	0	98	0	0	100
<i>Centrosema virginianum</i> cv. CIAT 478	Control	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	80°C H ₂ O	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	5'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	10' H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>Centrosema plumieri</i> cv. PI-90	Control	5	0	95	2	0	98	2	0	98
	80°C H ₂ O	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	5'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	10'H ₂ SO ₄	10	0	90	2	0	98	2	0	98
<i>Centrosema macrocarpum</i> cv. CIAT 5065	Control	2	0	98	0	0	100	0	0	100
	80°C H ₂ O	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	5'H ₂ SO ₄	0	0	100	2	0	98	0	0	100
	10'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>Centrosema pubescens</i> cv. PII-89	Control	3	0	97	7	0	93	3	0	97
	80°C H ₂ O	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	5'H ₂ SO ₄	7	0	93	2	0	98	0	0	100
	10'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	2	0	98
<i>Desmodium ovalifolium</i> cv. CIAT 13089	Control	3	0	97	9	0	91	0	0	100
	80°C H ₂ O	3	0	97	3	0	97	4	0	96
	5'H ₂ SO ₄	1	0	99	3	0	97	7	0	93
	10' H ₂ SO ₄	8	0	92	3	0	97	3	0	97
<i>Teramnus labialis</i> cv. Semilla Clara	Control	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	80°C H ₂ O	4	0	96	0	0	100	0	0	100
	5'H ₂ SO ₄	3	0	97	1	0	99	0	0	100
	10' H ₂ SO ₄	3	0	97	3	0	97	1	0	99
<i>Clitoria ternatea</i> (de 1975)	Control	4	0	96	0	0	100	0	0	100
	80°C H ₂ O	0	21	79	0	25	75	3	16	81
	5'H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	10' H ₂ SO ₄	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Aunque la relación entre los porcentajes de germinación final, de semillas dormantes y de semillas muertas para todos los tratamientos (tabla 3) en *T. labialis* cv. Semilla Clara indicaron un deterioro seminal, con el termoperíodo de 25-30°C y la aplicación de tratamientos pregerminativos se alcanzó una respuesta más favorable, debido a la discreta disminución en el porcentaje de semillas muertas y el incremento en la germinación final. Según Roberts (1981), un aumento en la temperatura de siembra puede provocar un incremento en el porcentaje de semillas muertas, determinado por un refuerzo en la respiración y, como consecuencia, el agotamiento de las reservas y la muerte de las semillas más débiles del lote. En *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089 no se pudo precisar una tendencia germinativa con la variación del termoperíodo de siembra.

De las accesiones con porcentaje de germinación final casi nulo en todas las condiciones ensayadas, *C. ternatea* (de 1975) se destacó por presentar entre 16 y 25% de semillas dormantes con la inmersión en agua a 80°C, para cualquiera de las temperaturas de siembra (tabla 2). En esta accesión la aplicación de escarificación ácida fue totalmente inadecuada, al provocar la muerte de todas las semillas del lote. Este mecanismo ha sido descrito por Roberts (1981), Bewley y Black (1994) y Baskin y Baskin (1998), debido a un incremento en la respiración producido por la entrada abrupta de agua al interior de las semillas. Los resultados con la inmersión en agua a 80°C inducen a creer que una parte de las semillas del lote, después de 26 años de almacenamiento, permanecieron viables con cierto grado de dormancia, que no fue posible detectar al realizar la prueba de TZ en el control.

El resto de las accesiones presentaron valores más elevados de germinación final, como promedio (tablas 3 y 4). En estos casos, el tratamiento pregerminativo aplicado en el momento de la siembra tuvo un efecto significativo en los porcentajes de semillas germinadas, dormantes y muertas en todas las accesiones; no así la temperatura de siembra y la interacción de ambos (tabla 3).

Tabla 3. Valor de F y significación para los porcentajes de semillas germinadas, dormantes y muertas en las accesiones con germinación final más elevada.

Table 3. Value of F and significance for the percentages of germinated, dormant and dead seeds in the accessions with higher final germination

Accesión	Fuente de variación	Valor de F		
		Germinadas	Dormantes	Muertas
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 438	Trat. pregerminativo (A)	20,188 ***	24,067 ***	11,100 ***
	Temp. siembra (B)	2,913	0,867	2,740
	A x B	2,739 *	0,867	2,463
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 5172	Trat. pregerminativo (A)	25,051 ***	-	22,322 ***
	Temp. siembra (B)	13,231 ***	-	13,608 ***
	A x B	8,513 ***	-	8,017 ***
<i>Centrosema pubescens</i> cv. Baracutey	Trat. pregerminativo (A)	40,669 ***	36,952 ***	27,255 ***
	Temp. siembra (B)	7,467 ***	0,679	5,513 **
	A x B	0,872	0,774	1,836
<i>Clitoria ternatea</i> (de 1999)	Trat. pregerminativo (A)	32,452 ***	81,632 ***	13,402 ***
	Temp. siembra (B)	0,979	0,665	0,349
	A x B	2,654*	0,492	1,814
<i>Crotalaria spectabilis</i> (de 1984)	Trat. pregerminativo (A)	5,630 **	-	4,291 *
	Temp. siembra (B)	0,352	-	0,384
	A x B	0,574	-	0,519
<i>Crotalaria brownii</i> cv. 687	Trat. pregerminativo (A)	4,997 **	-	4,997 **
	Temp. siembra (B)	2,215	-	2,215
	A x B	1,343	-	1,343
<i>Crotalaria</i> sp. cv. Derecha	Trat. pregerminativo (A)	62,656 ***	152,509 ***	35,496 ***
	Temp. siembra (B)	3,392 *	3,000	5,151 **
	A x B	1,280	3,140 *	1,988
<i>Mimosa invisa</i>	Trat. pregerminativo (A)	462,086***	504,804 ***	8,628 **
	Temp. siembra (B)	1,037	0,864	0,654
	A x B	0,753	0,348	3,055 *
<i>Macroptilium</i> <i>atropurpreum</i>	Trat. pregerminativo (A)	30,948 ***	-	8,409 ***
	Temp. siembra (B)	0,837	-	0,228
	A x B	0,272	-	0,272
<i>Stylosanthes</i> <i>guianensis</i> cv. CIAT 136	Trat. pregerminativo (A)	101,143 ***	-	75,610 ***
	Temp. siembra (B)	8,351 ***	-	6,243 *
	A x B	1,338	-	1,338
<i>Desmanthus virgatus</i>	Trat. pregerminativo (A)	17,732 ***	2006,00 ***	433,957 ***
	Temp. siembra (B)	3,593*	22,389 ***	19,495 ***
	A x B	1,167	17,722 ***	6,650 ***
<i>Indigofera</i> sp.	Trat. pregerminativo (A)	388,324***	594,035 ***	211,615 ***
	Temp. siembra (B)	62,147***	88,649 ***	76,409 ***
	A x B	45,284***	99,456 ***	60,697 ***

*P<0,05 **P<0,01 ***P<0,001

Tabla 4. Germinación, semillas dormantes y semillas muertas en las accesiones con germinación final más elevada (%).

Table 4. Germination, dormant and dead seeds in the accessions with higher final germination (%).

Accesión	Trat. pregerm.	25-30°C			25-35°C			25-40°C		
		G	D	M	G	D	M	G	D	M
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 438	Control	8 ^{cde}	0	92 ^{ab}	12 ^{bcde}	0	88 ^{ab}	12 ^{bcde}	0	88 ^{ab}
	80°C H ₂ O	2 ^{de}	3	95 ^{ab}	0 ^e	11	89 ^{ab}	3 ^{de}	9	88 ^{ab}
	5'H ₂ SO ₄	18 ^{bc}	0	82 ^b	22 ^b	0	78 ^b	40 ^a	0	60 ^c
<i>Centrosema pubescens</i> cv. CIAT 5172	10'H ₂ SO ₄	15 ^{bcd}	0	85 ^{ab}	3 ^{de}	0	97 ^a	8 ^{cde}	0	92 ^{ab}
	Control	11 ^{cd}	0	89 ^{bcd}	19 ^{bc}	0	81 ^{de}	4 ^d	0	96 ^{ab}
	80°C H ₂ O	0 ^e	0	100 ^a	4 ^d	0	96 ^{abc}	4 ^d	0	96 ^{ab}
<i>Centrosema pubescens</i> cv. Baracutey	5H ₂ SO ₄	28 ^a	0	72 ^f	15 ^c	0	85 ^{cde}	19 ^{bc}	0	81 ^{de}
	10 H ₂ SO ₄	23 ^{ab}	0	77 ^{ef}	22 ^a	0	71 ^f	3 ^{de}	0	97 ^{ab}
	Control	19 ^e	16	71 ^{abc}	23 ^e	15	64 ^{bcd}	15 ^e	15	63 ^{bcde}
<i>Clitoria ternatea</i> (de 1999)	80°C H ₂ O	28 ^{de}	0	72 ^{abc}	19 ^e	3	79 ^{ab}	7 ^e	0	93 ^a
	5H ₂ SO ₄	79 ^a	5	16 ^g	59 ^{abc}	0	41 ^{def}	47 ^{cd}	0	53 ^{cde}
	10 H ₂ SO ₄	72 ^{ab}	0	28 ^{fg}	60 ^{abc}	0	40 ^{ef}	55 ^{bc}	0	45 ^{def}
<i>Crotalaria spectabilis</i> (de 1984)	Control	7 ^{de}	73	20 ^e	5 ^{de}	64	31 ^{cde}	15 ^{cde}	60	25 ^{de}
	80°C H ₂ O	0 ^e	35	65 ^a	1 ^{de}	40	59 ^{ab}	0	35	65 ^a
	5'H ₂ SO ₄	20 ^{bcd}	12	68 ^a	36 ^{ab}	16	48 ^{abcd}	49 ^a	12	39 ^{bcde}
<i>Crotalaria brownii</i> cv. 687	10'H ₂ SO ₄	45 ^a	1	53 ^{abc}	47 ^a	3	50 ^{abcd}	31 ^{abc}	0	69 ^a
	Control	1 ^b	2	97 ^{ab}	3 ^{ab}	0	97 ^{ab}	1 ^b	0	99 ^a
	80°C H ₂ O	11 ^{ab}	0	89 ^{ab}	12 ^a	0	88 ^b	7 ^{ab}	0	93 ^{ab}
<i>Crotalaria sp. cv. Derecha</i> (de 1999)	5'H ₂ SO ₄	9 ^{ab}	0	91 ^{ab}	11 ^{ab}	0	89 ^{ab}	7 ^{ab}	0	93 ^{ab}
	10'H ₂ SO ₄	9 ^{ab}	0	91 ^{ab}	8 ^{ab}	0	92 ^{ab}	12 ^a	0	88 ^b
	Control	1 ^b	0	99 ^a	1 ^b	0	99 ^a	0 ^b	0	100 ^a
<i>Mimosa invisa</i>	80°C H ₂ O	9 ^b	0	91 ^a	1 ^b	0	99 ^a	9 ^b	0	91 ^a
	5'H ₂ SO ₄	23 ^a	0	77 ^b	7 ^b	0	93 ^a	11 ^b	0	89 ^{ab}
	10'H ₂ SO ₄	10 ^b	0	90 ^a	11 ^b	0	89 ^{ab}	5 ^b	0	95 ^a
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Control	3 ^f	57	46 ^{def}	3 ^f	77	20 ^{fg}	5 ^f	67	28 ^{efg}
	80°C H ₂ O	69 ^{ab}	16	15 ^g	72 ^a	0	28 ^{efg}	52 ^{bc}	0	48 ^{cde}
	5'H ₂ SO ₄	25 ^{de}	0	75 ^{ab}	11 ^{ef}	11	79 ^{ab}	8 ^{ef}	0	92 ^a
<i>Stylosanthes guianensis</i> cv. CIAT 136	10'H ₂ SO ₄	44 ^c	0	56 ^{bcd}	49 ^{bc}	8	44 ^{cde}	35 ^{cd}	0	65 ^{bc}
	Control	0 ^d	99	1 ^b	0 ^d	100	0 ^b	0 ^{do}	96	4 ^b
	80°C H ₂ O	95 ^{ab}	0	5 ^b	99 ^a	0	1 ^b	92 ^{ab}	0	8 ^{ab}
<i>Desmanthus virgatus</i> (de 1998)	5'H ₂ SO ₄	93 ^{ab}	7	0 ^b	85 ^b	14	1 ^b	89 ^{ab}	10	1 ^b
	10'H ₂ SO ₄	17 ^c	7	76 ^a	16 ^c	7	77 ^a	8 ^{cd}	1	91 ^a
	Control	3 ^c	0	97 ^a	4 ^b	0	96 ^{ab}	0 ^c	0	100 ^a
<i>Indigofera sp.</i> (de 1998)	80°C H ₂ O	23 ^{ab}	0	77 ^b	15 ^{abc}	0	85 ^{ab}	17 ^{abc}	0	83 ^{ab}
	5'H ₂ SO ₄	23 ^{ab}	0	77 ^b	24 ^a	0	76 ^b	27 ^a	0	73 ^b
	10'H ₂ SO ₄	17 ^{abc}	0	83 ^{ab}	12 ^{abc}	0	88 ^{ab}	16 ^{abc}	0	84 ^{ab}
<i>Indigofera sp.</i> (de 1998)	Control	9 ^{def}	0	91 ^{abc}	11 ^{de}	0	89 ^{abc}	3 ^{ef}	0	97 ^{ab}
	80°C H ₂ O	0 ^f	0	100 ^a	12 ^{de}	0	88 ^{bc}	7 ^{def}	0	93 ^{abc}
	5'H ₂ SO ₄	49 ^{ab}	0	51 ^{ef}	56 ^a	0	44 ^f	40 ^b	0	60 ^c
<i>Indigofera sp.</i> (de 1998)	10'H ₂ SO ₄	23 ^c	0	77 ^d	27 ^c	0	73 ^d	17 ^{cd}	0	83 ^{cd}
	Control	0 ^c	100	0 ^c	1 ^c	83	16 ^b	0 ^c	72	28 ^b
	80°C H ₂ O	17 ^{ab}	3	80 ^{ab}	15 ^{ab}	1	84 ^{ab}	15 ^{ab}	0	85 ^{ab}
<i>Indigofera sp.</i> (de 1998)	5'H ₂ SO ₄	25 ^a	0	75 ^{ab}	17 ^{ab}	0	83 ^{ab}	8 ^{bc}	0	92 ^a
	10'H ₂ SO ₄	25 ^a	0	75 ^{ab}	27 ^a	0	73 ^{ab}	16 ^{ab}	0	84 ^{ab}
	Control	4 ^c	88	8 ^b	3 ^c	92	5 ^b	12 ^c	84	4 ^b
<i>Indigofera sp.</i> (de 1998)	80°C H ₂ O	1 ^c	99	0 ^b	0 ^c	99	1 ^b	0 ^c	0	100 ^a
	5'H ₂ SO ₄	0 ^c	0	100 ^a	96 ^{ab}	3	6 ^b	91 ^{ab}	3	6 ^b
	10'H ₂ SO ₄	85 ^b	0	15 ^b	100 ^a	0	0 ^b	92 ^{ab}	0	8 ^b

a, b, c, d, f, g. Valores con superíndices no comunes difieren a P<0,05 (Duncan, 1955)

De este grupo de accesiones se destacaron, con un mayor deterioro seminal, *C. pubescens* cv. CIAT 438, *C. spectabilis* y *Macroptilium atropurpureum*, donde en todos los casos el contenido de humedad fue superior a 10%, la germinación final no sobrepasó el 40%, el porcentaje de semillas dormantes fue prácticamente nulo y las semillas muertas presentaron valores superiores al 60%, para cualquier termoperíodo de siembra. En este sentido, las de mayor vigor germinativo fueron *Crotalaria* sp., cv. Derecha, *M. invisus* e *Indigofera* sp., que alcanzaron una germinación final superior al 70% para al menos uno de los termoperíodos de siembra; se destacaron las dos últimas accesiones, con una germinación superior al 85% para el más exitoso de los tratamientos pregerminativos aplicados y con contenidos de humedad de 6,5% y 9,3%, respectivamente (tabla 1).

C. pubescens cv. Baracutey, con la escarificación ácida y siembra a 25-30°C, alcanzó una germinación final superior a 72% (tabla 4). Sin embargo, el tratamiento de inmersión en agua caliente resultó el menos ventajoso para cualquiera de los termoperíodos de siembra, debido principalmente al incremento en el porcentaje de semillas muertas. Este resultado alerta sobre un posible deterioro seminal en este lote; así, el contenido de humedad (11,9%) parece estar dado por cierto grado de envejecimiento y no por el valor que dicha variable pudiera tener en el caso de tratarse de semillas frescas.

Como mejor tratamiento pregerminativo se recomienda la inmersión en agua a 80°C durante 2 min., para *Crotalaria* sp. cv. Derecha y *M. invisus*; esta última también respondió favorablemente a la escarificación durante 5 min. en ácido sulfúrico concentrado. Para *C. pubescens* cv. CIAT 438, *M. atropurpureum* y *S. guianensis* cv. CIAT 136 la escarificación durante 5 min. en ácido sulfúrico concentrado fue la más apropiada, aunque para *M. atropurpureum* la inmersión en agua a 80°C durante 2 min. también fue efectiva.

Se ha reportado dormancia en *Stylosanthes scabra* (Serrato-Valenti et al., 1993) por impermeabilidad de sus cubiertas al agua, producida por la presencia de sustancias fenólicas, calosa y lípidos hidrofóbicos en las células en empalizada de la testa; este tipo de dormancia se relaciona con una mayor longevidad de la semilla (Baskin y Baskin, 1998). Dados estos criterios, se infiere que las semillas de *S. guianensis* presentaron este tipo de dormancia, debido a que durante los 26 años de almacenamiento el contenido de humedad se mantuvo en 6,0%, y se obtuvo un mayor incremento en el porcentaje de germinación final con la escarificación ácida que con la inmersión en agua a 80°C.

Indigofera sp. y *D. virgatus*, con la escarificación durante 10 min. en ácido sulfúrico concentrado, mostraron los mejores resultados para cualquier termoperíodo de siembra. En *Indigofera* sp. se alcanzó el 100% de germinación con 25-35°C; mientras que para las accesiones *C. pubescens* cv. CIAT 5172, *C. pubescens* cv. Baracutey, *C. ternatea* (de 1999), *C. spectabilis* y *C. brownii* cv. 687 el tratamiento más eficaz varió según el termoperíodo de siembra.

En *C. ternatea* (de 1999) el deterioro seminal no fue tan evidente como en la accesión del año 1975 (tabla 2), ya que se obtuvieron porcentajes de germinación más elevados. En el control se observó un incremento del porcentaje de semillas dormantes al incrementarse el termoperíodo de siembra. En la accesión de 1999 (tabla 4) los tratamientos de escarificación ácida resultaron más efectivos que el de inmersión en agua a 80°C. La escarificación química en ácido sulfúrico concentrado durante 5 min. provocó un incremento del porcentaje de germinación y una disminución de las semillas muertas, al aumentar el termoperíodo, con relación al control.

Se concluye que las semillas de las accesiones con más de 12 años de almacenamiento inadecuado tuvieron porcentajes de germinación inferiores a 10% para cualquiera de los tratamientos, excepto en *C. pubescens* cv. CIAT 438, *C. sp.* cv. Derecha, *C. spectabilis*, *C. brownii* cv. 687, *M. atropurpureum*, *S. guianensis* cv. CIAT 136 y *M. invisus*. El resto de las accesiones presentaron diferentes grados de pérdida de la viabilidad. Las de mayor respuesta germinativa fueron *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *M. invisus* e *Indigofera* sp., con una germinación final superior al 70% para al menos uno de los termoperíodos de siembra.

Referencias bibliográficas

- Al Yemeni, M.N. & Basahy, A.Y. 1999. Breaking of seed dormancy in *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. *Pakistan Journal of Botany*. 31:247

- Amodu, J.T. et al. 2000. The effect of hot water and acid treatment on establishment of *Leucaena leucocephala*. *Seed Research*. 28:226
- Andersson, L. & Milberg, P. 1998. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Science Research*. 8:29
- Baskin, Carol & Basin, J. 1998. *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, California. 666 p.
- Bass, L.N. 1984. Storage of seeds of tropical legumes. *Seeds Sci. Technol.* 12:395
- Bewley, D.J. & Black, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press, Londres. 445 p.
- Chin, H.F. et al. 1989. Seed moisture: Recalcitrant vs. Orthodox seed. *Seed Moisture CSSA spec. publ.* 14:15
- Ellis, R.H. & Hong, T.D. 2006. Temperature sensibility of the low-moisture-content limite to negative seed longevity-moisture content relations in hermetic storage. *Annals of Botany*. 97:785
- Gómez-Campo, C. 2006a. Erosion of genetic resources within seed genebanks: the role of seed containers. *Seed Sci. Research*. 16: 291
- Gómez-Campo, C. 2006b. Long term seed preservation: update standards are urgent. *Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid*, 168, 1-4. Disponible en: [www. Seedcontainers.net](http://www.seedcontainers.net). Consulta: julio 2008
- González, Yolanda et al. 2005. Producción, beneficio y conservación de semillas de plantas arbóreas. En: *El Silvopastoreo: un nuevo concepto de pastizal*. (Ed. L. Simón). EEPF “Indio Hatuey”, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 53
- González, Yolanda et al. 2007. Efecto de tratamientos pregerminativos en la longevidad de las semillas de *Teramnus labialis* cv. Semilla clara. *Memorias. VII Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos. FITOGEN' 2007. Sancti Spiritus, Cuba*. p. 34
- González, Yolanda & Mendoza, F. 2008. Efecto del agua caliente en la germinación de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*. 31:47
- ISTA. 1999. International rules for testing. *Seed Sci. Technol.* 27:155
- Kozłowski, T.T. & Pallardy, S.G. 2002. Acclimation and adaptative response of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review*. 8:270
- McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27:177
- Nikolaeva, Margarita. 1982. Dormancia de las semillas [en ruso]. En: *Fisiología de las semillas*. (Ed. A. A. Prokofiev). Nauka, Moscú, p. 317
- Nikolaeva, Margarita et al. 1985. *Manual de técnicas pregerminativas de semillas dormantes [en ruso]*. Nauka, Leningrado. 348 p.
- Orta, R. et al. 1988. Efecto del preacondicionamiento sobre la viabilidad y el vigor germinativo de semillas almacenadas I. Leguminosas de pastizales. En: *Resúmenes I Simposio de Zoología y II Simposio de Botánica*. Palacio de las Convenciones, La Habana. p. 85
- Pandita, V.K. et al. 1999. Reducing hard seededness in ferugreek by scarification technique. *Seed Sci. Technol.* 27:627
- Pérez-García, F. et al. 2007. High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. *Seed Sci. Technol.* 35:143
- Roberts, H.E. 1981. Physiology of ageing and its applications to drying and storage. *Seed Sci. Technol.* 9:359

- Sabiiti, E.N. 1983. Ecological studies on *Macroptilium atropurpureum* Urb. I Effects of pre-treating seeds with concentrated sulphuric acid, scarification, boiling and burning on germination. *Afr. J. Ecol.* 21:285
- Sarmiento, M.B. & Schifino-Wittmann, M.T. 2000. Different treatments and their effects on germination of *Leucaena* seeds. *Revista Científica Rural.* 5:89
- Schmidt, L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. (Ed. K. Olesen). Danida Forest Seed Center, Denmark. 511 p.
- Serrato-Valenti, G.L. et al. 1993. Structural and histochemical feature of *Stylosanthes scabra* (Leguminosae; Papilionoideae) seed coat as related to water entry. *Can. J. Bot.* 71:834
- Tran, V.N. & Cavanagh, A.K. 1984. Structural aspects of dormancy. In: *Seed physiology.* (Ed. D.R. Murray). Academic Press, Sydney. Vol. 2, 295 p.

Germinative evaluation of 20 legume accessions stored under unfavorable conditions

Abstract

An evaluation was made of the germinative response of 20 legume accessions from different storage times, under inadequate humidity and temperature conditions, and subject to thermal and acid scarification treatments before seeding, with different temperatures of the substratum. Independently from the storage time, the moisture content of the seeds was lower than 15%. The seeds from the accessions with more than 12 years showed germination percentages lower than 10% for all the essayed planting treatments, except in *Centrosema pubescens* cv. CIAT 438, *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria brownii* cv. 687, *Macroptilium atropurpureum*, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 136 and *Mimosa invisa*. The other accessions showed different degrees of viability loss. The best germinative response occurred in *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *M. invisa* and *Indigofera* sp., because they reached final germination percentages higher than 70% for, at least, one of the studied seeding thermoperiods.

Key words: Seed storage, scarification, legumes

Introduction

Legume seeds show coat impermeability to water and gasses as their main dormancy mechanism (Sabiiti, 1983; Serrato-Valenti *et al.*, 1993; Amodu *et al.*, 2000; Sarmento and Schifino-Wittmann, 2000). This type of dormancy occurs due to the presence of lignified or suberized cell layers in the palisade parenchyma, although other hydrophobic substances such as cutin, pectin, callose and hemicellulose can also be responsible for the impermeability (Tran and Cavanagh, 1984; Serrato-Valenti *et al.*, 1993; Kozłowski and Pallardy, 2002). Hard seed coats not only prevent the entrance of water to the embryo, but they also restrict the oxygen diffusion inside it; the long maintenance of anaerobiosis causes the accumulation of lactic acid, acetaldehyde and other fermentation products which are toxic to seeds (Bewley and Black, 1994; Baskin and Baskin, 1998).

Among the most widely used methods for the elimination of this type of dormancy are thermal and chemical scarification, and among them the immersion in hot water and acids at different intervals and concentrations. Different authors have referred to the advantages of using scarification with concentrate acids as compared to the treatments of immersion in hot water (Sabiiti, 1983; Al Yemeni and Basahy, 1999; Pandita *et al.*, 1999). According to Orta *et al.* (1988) germination higher than 95% is obtained in less than 48 h, using concentrate sulfuric acid in fresh seeds from different legumes: *Dolichos* (10 min.), *Glycine* (15 min.), *Leucaena* (15 min.), *Macroptilium* (15 min.), *Stylosanthes* (10 min.) and *Teramnus* (10 min.). However, the treatments of seed immersion in hot water are widely used and similar results to those from chemical scarification are obtained (Schmidt, 2000; González *et al.*, 2005).

Another way used to eliminate exogenous dormancy in legumes is the storage for a long time (Bass, 1984); the seeds from some species after four to seven years become soft, although some, such as the ones from the *Trifolium* genus stored humid for 37-40 years, only respond slightly to scarification treatments (Nikolaeva, 1982). In other genera, such as *Leucaena* and *Teramnus*, although they age and die of 0-18 years and 0-10 years, respectively, the ones that survive respond to water at 80°C/2 min. (González *et al.*, 2007; González and Mendoza, 2008).

The objective of this study was to analyze the germinative response of 20 accessions of legumes from different storage times, under inadequate humidity and temperature conditions, and subject to thermal and acid scarification before planting.

Materials and Methods

Plant material and storage conditions. The legume seeds were supplied by the Experimental Station of Pastures and Forages “Indio Hatuey”, Matanzas. The storage was made at a temperature between 5 and 7°C, with relative humidity higher than 80%. The accessions of each species were stored in glass flasks (with metallic screw cap) and they remained under the above-mentioned conditions for different times (table 1). The study of the seed variables was conducted at the Seed Laboratory of the Institute of Ecology and Systematics (IES), belonging to the Ministry of Science, Technology and Environment (CITMA) and located in Havana City, between September, 2001 and April, 2002.

Moisture content. The moisture content was determined in each accession through the method of drying at constant low temperature, according to ISTA’s rules (1999), by weighing 10 replications of 50 seeds each, on a Sartorius scale with precision 10^{-4} .

Germination tests. A bifactorial experiment was conducted to learn the combined effect of the temperature alternance in the substratum and the application of the pregerminative treatment of thermal and acid scarification on the germination of the 20 accessions. Three temperature ranges were used: 25-30°C, 25-35°C and 25-40°C, with an alternance of 12 h for 25°C and 8 h for the highest temperature of each thermoperiod, and a 4-h transition between both; for the factor pregerminative treatment immersion in water at 80°C for 2’ and scarification in sulfuric acid during 5 and 10 min., respectively, were used, besides a control (without treatment).

The germination tests were conducted on Petri dishes (9 cm diameter), on filter paper soaked in sterile distilled water, and the seeds were incubated in growth chambers (Gallenkamp INF-600; London). Five replications, of 50 seeds each, were used per treatment.

In all the germination essays, those seeds with radical emergence higher than 1 mm were considered germinated. The final germination percentage was determined. The TZ test (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride) was practiced on the soft seeds, according to ISTA’s rules (1999), and the percentage of dormant and dead seeds was quantified. Those that remained hard during the germination test were added to the percentage of dormant seeds.

Statistical data processing. The average values of each analyzed variable were calculated. A simple classification ANOVA with factorial arrangement of the treatments (pregerminative treatment per thermoperiod) was used for the analysis of all the variables. The differences among means were determined through Duncan’s test (1955).

Results and Discussion

After storage under the above-described conditions, the seeds of the 20 accessions maintained moisture contents lower than 15% (table 1). Roberts (1981), Nikolaeva *et al.* (1985) and Chin *et al.* (1989) reported this value as limit for the category of orthodox seeds. On the other hand, Nikolaeva *et al.* (1985) and Chin *et al.* (1989) stated that fresh legume seeds show between 7 and 11% moisture. According to these results, it is inferred that the seeds from the studied accessions could belong to the orthodox category; however, it should be taken into consideration that the moisture content which is reported is not in correspondence with that of fresh seeds.

Centrosema pubescens cv. CIAT 5172, *Clitoria ternatea* (of 1999), *Crotalaria brownii* cv. 687, *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *Mimosa invisa*, *Desmodium ovalifolium* cv. CIAT 13089, *Teramnus labialis* cv. Semilla Clara, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 136, *Desmanthus virgatus* and *Indigofera* sp. had moisture percentages in accordance with the reports made for legumes (table 1). From this group, *M. invisa* and *S. guianensis* showed the lowest values for this variable, possibly due to higher impermeability of their seed coats.

On the other hand, *Neonotonia wightii* cv. Tinaroo 73, *Centrosema virginianum* cv. CIAT 478, *Centrosema plumieri* cv. PI-90, *Centrosema macrocarpum* cv. CIAT-5065, *C. pubescens* cv. PII-89, *C. pubescens* cv. CIAT 438 and *Crotalaria spectabilis* showed values higher than 12%. This last group of accessions (except *C. pubescens* cv. CIAT 438) remained for more than 12 years under the above-described

storage conditions. Possibly, the increase in the moisture content is due to this, although the composition and degree of impermeability of their coats could have also influenced them to show heterogeneous deterioration (Schmidt, 2000).

According to Roberts (1981), when seeds are stored in high humidity and/or temperature ambients the processes of seed ageing are accelerated. The storage with variations of the ambient relative humidity causes more damage to the seed than the one done under constant high relative humidity (Pérez-García *et al.*, 2007). In contrast, the increases in temperature during cold storage do not cause serious damage to seed viability as that produced by humidity (Bewley and Black, 1994; Gómez-Campo, 2006a).

Gómez-Campo (2006b) stated that it is ideal in orthodox seeds to dry them to 4-6% moisture; in addition, they can be ultradried and thus avoid seed ageing without them suffering damage (Ellis and Hong, 2006).

C. pubescens cv. CIAT 438 only remained under inadequate storage conditions for one year. Although the possibility of the noxious effect of the variations of ambient temperature on the integrity of the seed coats of this species can not be discarded; the management problems in the seed collection and/or drying, which allowed lower resistance of seed coats to deterioration, could have also influenced the moisture increase. The influence of ambient conditions at the moment of seed formation and maturation, on the softening of seed coats for this lot of the species can not be discarded either.

This last aspect must be emphasized if it is taken into consideration that the accessions of *C. pubescens* cv. CIAT 5172 and *C. pubescens* cv. Baracutey showed moisture contents of 8,9 and 11,8% with 11 and 5 years of storage, respectively. According to Andersson and Milberg (1998) to evaluate the extension of seed dormancy in one species, it is necessary to take into consideration the possible differences among populations, the year of collection and the conditions of the mother plant, as well as the genetic factor, which was reported for two *Leucaena leucocephala* cultivars, regarding the size and permeability of seeds and their coats (González *et al.*, 2005).

The accessions of *N. wightii* cv. Tinaroo 73, *C. virginianum* cv. CIAT 478, *C. plumieris* cv. PI-90, *Centrosema macrocarpum* cv. CIAT 5065, *C. pubescens* cv. PII-89, *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089 and *T. labialis* cv. Semilla Clara showed final germination almost null and lower than 10%, as average; the dead seeds were higher than 90% in all the essayed pregerminative treatments, for any seeding condition, except in *C. ternatea* (of 1975) with water at 80°C for 2' (75-81%), which showed the highest dormancy values (table 2). These relationships between the final germination percentages, dormant and dead seeds indicate seed ageing in the referred accessions.

The seeds that show dormancy due to impermeable coats tend to remain viable for more time, with regards to the species with other dormancy types, as the structures that surround the embryo isolate it from the environment (Bewley and Black, 1994; Baskin and Baskin, 1998). According to McDonald (1999), the most frequent cause of seed deterioration is lipid peroxidation, which triggers the generation of free radicals. This process can occur due to self-oxidation as well as enzymatic oxidation. When the moisture content is low the self-oxidation is activated. However, before increases in moisture content, the enzymatic oxidation is stimulated by the activity of oxidative hydrolytic enzymes, such as lipoxygenases.

In this group, the first five accessions coincided also with higher moisture than 11%; while in the two last ones this variable reached lower values (table 1). In this sense, if the cause of seed-ageing of the above-mentioned accessions was the lipid peroxidation mechanism, in the first five ones it was likely to occur through enzymatic oxidation, given the increase in moisture shown by such samples with regards to the value estimated for legumes (between 7 and 11%). Yet, the moisture contents in *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089 and *T. labialis* cv. Semilla Clara were 7,6 and 8,2% after 13 and 32 years of storage, respectively. Possibly, in these two cases lipid self-oxidation could have been the cause of seed deterioration due to the moisture content in seeds, in spite of storage time.

Although the relationship among the percentages of final germination, dormant and dead seeds for all treatments (table 3) in *T. labialis* cv. Semilla Clara indicated seed deterioration, with the thermoperiod 25-30°C and the application of pregerminative treatments a more favorable response was achieved, due to the discreet decrease in the percentage of dead seeds and the increase of final germination. According to Roberts

(1981), an increase in seeding temperature can cause an increase in the percentage of dead seeds, determined by an enhancement in respiration and, consequently, the depletion of reserves and death of the weakest seeds of the lot. In *D. ovalifolium* cv. CIAT 13089, a germinative trend with the variation of the seeding thermoperiod could not be precisely determined.

From the accessions with final germination percentage almost null under all the essayed conditions, *C. ternatea* (of 1975) stood out for showing between 16 and 25% dormant seeds with immersion in water at 80°C, for any of the seeding temperatures (table 2). In this accession, the application of acid scarification was completely inadequate, causing the death of all the seeds in the lot. This mechanism has been described by Roberts (1981), Bewley and Black (1994) and Baskin and Baskin (1998), due to an increase in respiration caused by the abrupt entrance of water inside the seeds. The results with the immersion in water at 80°C induce to think that part of the seeds from the lot, after 26 years of storage remained viable with certain degree of dormancy, which could not be detected when performing the TZ test in the control.

The other accessions showed higher final germination values, as average (tables 3 and 4). In these cases, the pregerminative treatment applied at the moment of seeding had a significant effect on the percentages of germinated, dormant and dead seeds in all the accessions; unlike the seeding temperature and the interaction of both (table 3).

In this group of accessions, *C. pubescens* cv. CIAT 438, *C. spectabilis* and *Macroptilium atropurpureum* stood out, with higher seed deterioration, where in all cases the moisture content was higher than 10%, final germination did not exceed 40%, the percentage of dormant seeds was practically null and the dead seeds showed values higher than 60%, for any seeding thermoperiod. In this sense, the accessions with higher germinative value were *Crotalaria* sp. cv. Derecha, *M. invisá* and *Indigofera* sp., which reached final germination higher than 70% for at least one of the seeding thermoperiods; the last two accessions stood out, with germination higher than 85% for the most successful of the applied pregerminative treatments and with moisture contents of 6,5% and 9,3%, respectively (table 1). *C. pubescens* cv. Baracutey, with acid scarification and seeding at 25-30°C, reached final germination higher than 72% (table 4). However, the treatment of immersion in hot water turned out to be the least advantageous for any of the seeding thermoperiods, mainly due to the increase in the percentage of dead seeds. This result warns about possible seed deterioration in this lot; thus, the moisture content (11,9%) seems to be given by certain degree of ageing and not by the value this variable could have in the case of fresh seeds.

As best pregerminative treatment the immersion in water at 80°C for 2 min. is recommended for *Crotalaria* sp. cv. Derecha and *M. invisá*; the latter also responded favorably to scarification during 5 min. in concentrate sulfuric acid. For *C. pubescens* cv. CIAT 438, *M. atropurpureum* and *S. guianensis* cv. CIAT 136, scarification during 5 min. in concentrate sulfuric acid was the most appropriate, although for *M. atropurpureum* the immersion in water at 80°C for 2 min. was also effective.

Dormancy has been reported in *Stylosanthes scabra* (Serrato-Valenti *et al.*, 1993) due to impermeability of the seed coats to water, produced by the presence of phenolic substances, callose and hydrophobic lipids in the palisade cells of the testa; this type of dormancy is related to higher seed longevity (Baskin and Baskin, 1998). Given these criteria, it is inferred that the seeds from *S. guianensis* showed this type of dormancy, because during 26 years of storage the moisture content remained in 6,0%, and a higher increase was obtained in the final germination percentage with acid scarification than with immersion in water at 80°C.

Indigofera sp. and *D. virgatus*, with scarification during 10 min. in concentrate sulfuric acid, showed the best results for any seeding thermoperiod. In *Indigofera* sp. 100% germination was achieved with 25-35°C; while for the accessions of *C. pubescens* cv. 5172, *C. pubescens* cv. Baracutey, *C. ternatea* (of 1999), *C. spectabilis* and *C. brownii* cv. 687, the most efficacious treatment varied according to the planting thermoperiod.

In *C. ternatea* (of 1999) seed deterioration was not as evident as in the accession of 1975 (table 2), because higher germination percentages were obtained. In the control an increase of the percentage of dormant seeds was observed when increasing the seeding thermoperiod. In the accession of 1999 (table 4) the

acid scarification treatments were more effective than the immersion in water at 80°C. Chemical scarification in concentrate sulfuric acid for 5 min. caused an increase of the germination percentage and a decrease of dead seeds, by increasing the thermoperiod, with regards to the control.

The seeds from the accessions with more than 12 years of inadequate storage were concluded to have germination percentages lower than 10% for any of the treatments, except in *C. pubescens* cv. CIAT 438, *C. sp.* cv. Derecha, *C. spectabilis*, *C. brownii* cv. 687, *M. atropurpureum*, *S. guianensis* cv. CIAT 136 and *M. invisá*. The other accessions showed different degrees of viability loss. The accessions with higher germinative response were *Crotalaria sp.* cv. Derecha, *M. invisá* and *Indigofera sp.*, with final germination higher than 70% for at least one of the seeding thermoperiods.