

Bases conceptuales para la estimación del vigor de las semillas a través de indicadores del crecimiento y el desarrollo inicial

Conceptual bases for estimating seed vigor through growth indicators and initial development

Marlen Navarro¹, G. Febles² y Verena Torres²

Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

E-mail: marlen.navarro@indio.atenas.inf.cu

²Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba

Resumen

Se evaluaron, con métodos apropiados, los aspectos de la calidad de la semilla a través del estudio de la germinación, la viabilidad, la dormancia y el envejecimiento. La forma de almacenamiento en condiciones no controladas fue la seleccionada, por su prevalencia en los almacenes convencionales existentes en el país. Los resultados del trabajo condujeron a evaluar los métodos de escarificación como elementos que contribuyen a la ruptura de la dormancia. Además, permitieron tener un conocimiento más objetivo y preciso del vigor, debido a que se logró un equilibrio aceptable entre los elementos biológicos y matemáticos que se utilizaron. Al valorar en su conjunto los diferentes elementos de los estudios realizados, se propone considerar las bases conceptuales para la estimación del vigor de las semillas de especies de leguminosas tropicales arbustivas y arbóreas, u otras especies con características seminales similares en cuanto a la morfología y el comportamiento.

Palabras clave: Germinación, semilla, viabilidad de la semilla

Abstract

An evaluation was made, with adequate methods, of the seed quality aspects through the study of germination, viability, dormancy and ageing. Storage under uncontrolled conditions was the form selected, due to its prevalence in the existing conventional storehouses in the country. The results of the work led to evaluate the scarification methods as elements which contribute to dormancy breakup. In addition, they allowed having more objective and accurate knowledge of vigor, because acceptable balance was achieved between the biological and mathematical elements used. When evaluating as a whole the different elements of the studies conducted, to consider the conceptual bases for estimating the vigor of seeds from tropical shrub and tree leguminous species, or other species with similar seed characteristics regarding morphology and performance is proposed.

Key words: Germination, seed, seed viability

Introducción

La aplicación de conceptos esquemáticos y no integrales en el tratamiento que se les debe dar a las plantas en cualquier etapa de su vida puede conducir a decisiones graves en los trabajos de investigación y de producción, por lo que es importante evitar que esto ocurra. De tal forma, se alcanzarán resultados más objetivos,

Introduction

The application of schematic and non-integral concepts in the treatment plants should receive in any stage of their life may lead to serious decisions in research and production works, for which it is important to prevent this from happening. Thus, more objective, stable, universal, practical and directly influential

estables, universales, prácticos y de influencia directa en la sociedad en la que nos desenvolvemos.

Respecto al concepto y los procesos vinculados al vigor de las semillas, se especula y se debate profusamente (Delouche, 1976; McDonald, 1980; Perry, 1981; Steiner, 1990; Murcia, Peretti, San Martín y Pereyra, 2001; Shah, Watson y Cabrera, 2002). Una de las ideas es que las pruebas de vigor se desarrollan con la finalidad de ofrecer solo información complementaria a la obtenida por la prueba de germinación y que, a su vez, permiten estimar el potencial de la emergencia en el campo, en una amplia gama de condiciones ambientales (Barros, Nunes, Fernandes y Bhering, 2002; Costa y Carvalho, 2006).

Las investigaciones relacionadas con el vigor y la confección de metodologías apropiadas para su medición enfatizan en las especies hortícolas de diferentes ambientes, principalmente en áreas de clima templado. Sin embargo, el trabajo en esta dirección es muy escaso en especies tropicales praterenses y más aun en leguminosas de hábito de crecimiento arbustivo y arbóreo (Bonner, 1998; Tekrony, 2003; Tekrony, 2006).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue realizar estudios que permitieran crear las bases conceptuales para medir el vigor de las semillas, a través de indicadores del crecimiento y el desarrollo inicial, apoyados en investigaciones diseñadas con esos fines en la especie *Albizia lebeck* (L.) Benth. Se seleccionó esta leñosa perenne como especie "modelo" debido a la dormancia de sus semillas, la cual es provocada por factores físicos (Navarro y Mesa, 2005), al igual que sucede en un gran número de especies de leguminosas tropicales y subtropicales presentes en los sistemas de producción de la región.

Con este estudio, se pretendió crear un mecanismo estable, que permitiera la reproducibilidad de un resultado de manera confiable, al emplear métodos biológicos y matemáticos, sobre la base del análisis interactivo de elementos básicos cualitativos y cuantitativos que intervienen en el desarrollo de una semilla.

Antecedentes para la evaluación del vigor

La detección del deterioro de las semillas a través de las pruebas de vigor puede ser

results for the society in which we live, will be obtained.

With regards to the concept and processes linked to seed vigor, there is profuse speculation and discussion (Delouche, 1976; McDonald, 1980; Perry, 1981; Steiner, 1990; Murcia, Peretti, San Martín y Pereyra, 2001; Shah, Watson y Cabrera, 2002). One of the ideas is that vigor tests are conducted in order to provide only additional information to the one obtained by the germination test and which, in turn, allow estimating the emergence potential in the field, in a wide range of environmental conditions (Barros, Nunes, Fernandes y Bhering, 2002; Costa and Carvalho, 2006).

The studies related to vigor and the elaboration of adequate methodologies for its measurement make emphasis on horticultural species of different environments, mainly in areas of temperate climate. However, this work is very scarce in tropical pasture species and even more in shrub and tree legumes (Bonner, 1998; Tekrony, 2003; Tekrony, 2006).

For such reasons, the objective of this work was to conduct studies which would allow creating the conceptual bases to measure seed vigor, through indicators of growth and initial development, supported by studies designed for those purposes in the species *Albizia lebeck* (L.) Benth. This perennial ligneous plant was selected as "model" species due to the dormancy of its seeds, which is caused by physical factors (Navarro and Mesa, 2005), as it occurs in a large number of species of tropical and subtropical legumes present in the production systems of the region.

With this study the authors intended to create a stable mechanism, which allowed the reproducibility of a result in a reliable way, by using biological and mathematical methods, based on the interactive analysis of basic qualitative and quantitative elements which participate in seed development.

Antecedents for vigor evaluation

The detection of seed deterioration through vigor tests may be understood as an important component in the evaluation of quality elements, and contributes to the solution of problems of the seed industry, such as storage. In this regard,

entendida como un componente importante en la evaluación de elementos de la calidad, y contribuye a la solución de problemas de la industria semillera, como el almacenamiento. Al respecto, Alizaga, Sterting y Herrera (1992) aseveran que el principal desafío de las investigaciones sobre pruebas de vigor es la identificación de indicadores relacionados con el deterioro, que preceden a la pérdida de la capacidad germinativa.

Si bien el comité de vigor de la Asociación Internacional para el Análisis de Semillas (ISTA) sugiere los protocolos de algunas pruebas de uso ya generalizado (ISTA, 1995; ISTA, 2001), debido a la difícil estandarización de algunas pruebas, es necesario realizar ensayos para conocer la respuesta de las semillas a las condiciones locales de siembra.

No obstante, en los últimos 50 años los especialistas en semillas propusieron, estudiaron y utilizaron diferentes métodos para evaluar el vigor. La excelencia de las investigaciones demostró que se ha diversificado el acercamiento a la estimación de este indicador y, como consecuencia, su integralidad, por lo que se necesita volver a encauzar los objetivos de las pruebas de vigor para alcanzar las metas que se proponen, ya que solo se utilizan internacionalmente algunos métodos. El comité de vigor de la ISTA concentró sus esfuerzos en la estandarización de nueve pruebas, mientras que la AOSA sugirió o recomendó los procedimientos para siete métodos.

Además, el vigor muchas veces se maneja de forma empírica o mediante la utilización de solo una o dos variables. En este trabajo se aplicó tal concepto y se le adjudicó una expresión más integral y dinámica. Los elementos (variables) seleccionados son expresiones biológicas del crecimiento y el desarrollo, y se les dio un contenido y expresión matemáticos para precisar su comportamiento.

Es de destacar que el almacenamiento se valoró como un elemento de envejecimiento y deterioro, y como expresión dinámica de todas las variables, aspecto de crucial importancia y que ratifica la correspondencia entre el método propuesto y el estado del arte en el tema objeto de estudio.

Alizaga, Sterting y Herrera (1992) assert that the main challenge of research on vigor tests is the identification of indicators related to deterioration, which precedes the loss of germination capacity.

Although the vigor committee of the International Seed Testing Association (ISTA) suggests the protocols of some tests of generalized use (ISTA, 1995; ISTA, 2001), because of the difficult standardization of some tests, it is necessary to conduct essays to learn the response of seeds to local planting conditions.

Nevertheless, in the last 50 years, seed specialists proposed, studied and used different methods to evaluate vigor. The excellence of the studies proved that the approach to the estimation of this indicator and, thus, its integrality, have been diversified, for which it is necessary to channel the objectives of vigor tests to reach the proposed goals, because only some methods are internationally used. The vigor committee of ISTA focused its efforts on the standardization of nine tests, while the AOSA suggested or recommended the procedures for seven methods.

In addition, vigor is often managed empirically or through the utilization of only one or two variables. In this work such concept was applied and a more integral and dynamic expression was ascribed to it. The selected elements (variables) are biological expressions of growth and development, and they were given mathematical content and expression to determine exactly their performance.

It must be stressed that storage was considered an ageing and deterioration element, and as dynamic expression of all the variables, highly important aspect which ratifies the correspondence between the proposed method and the state-of-the-art in the studied topic.

Seed vigor

Ferguson (1995), in his attempt to conceptualize vigor, expressed that it is based on the physical or physiological performance of a seed lot, and includes: 1) changes in the biochemical processes, 2) germination rate and uniformity and seedling growth, and 3) seed germination or emergence capacity when exposed to stress conditions. Below, the way in

El vigor de las semillas

Ferguson (1995), en su intento por conceptualizar el vigor, expresó que este se basa en el comportamiento físico o fisiológico de un lote de semillas, e incluye: 1) los cambios en los procesos bioquímicos, 2) la tasa y uniformidad de la germinación y el crecimiento de las plántulas, y 3) la germinación o capacidad de emergencia de las semillas al ser expuestas a condiciones de estrés. A continuación se explica la manera en que estos argumentos se relacionaron con la secuencia de estudios, así como la intención de realizarlos.

1) Cambios en los procesos bioquímicos.

La manifestación visual de los cambios bioquímicos que ocurrieron puede ser valorada mediante el comportamiento de la viabilidad (Taiz y Zeiger, 2006), y se explicará en el epígrafe "Procedimiento y secuencia de trabajo".

2) Tasa y uniformidad de la germinación y el crecimiento de las plántulas.

La tasa y la uniformidad de la germinación y el crecimiento de las plántulas se abordaron de manera integral, a través de la selección y el análisis de las variables que se midieron durante la prueba de emergencia de las plántulas. La originalidad del método que se propone es integrar variables del crecimiento y el desarrollo, medidas en condiciones ambientales, es decir, en las condiciones reales del campo y no en locales acondicionados, como señaló Bennett (2002). Se empleó como unidades experimentales bolsas aviveradas, con un sustrato compuesto de suelo y estiércol ovino –este se puede encontrar en cualquier unidad productiva de Cuba que se dedique a la actividad agropecuaria, dígase finca o banco de semilla.

El hecho de que casi todas las variables tuvieran un alto grado de preponderancia, explicada fundamentalmente en la primera y en la segunda componente principal, indica lo acertado de la selección (Navarro, 2009). Muchas de ellas pueden contribuir a explicar el vigor con más precisión e integralidad. Aunque al emplear el análisis de componentes principales se pretendía discriminar algunas variables, esto no fue posible –ni es recomendable– debido a que todas estuvieron

which these arguments were related to the study sequence is explained, as well as the intention to conduct them.

1) Changes in the biochemical processes

The visual manifestation of the biochemical processes which occurred can be evaluated through the performance of viability (Taiz and Zeiger, 2006), and will be explained in the epigraph "Work procedure and sequence".

2) Germination rate and uniformity and seedling growth

Germination rate and uniformity and seedling growth were integrally approached, through the selection and analysis of the variables measured during the seedling emergence test. The novelty of the proposed method is in integrating growth and development variables, measured under ambient conditions, that is, under real field conditions and not in conditioned facilities, as pointed out by Bennett (2002). Bags in nursery were used as experimental units, with a substratum composed by soil and sheep manure –the latter can be found in any Cuban productive unit dedicated to livestock production, a farm or seed bank.

The fact that almost all the variables had a high preponderance degree, mainly explained in the first and second principal components, indicates the accuracy of the selection (Navarro, 2009). Many of them can contribute to explain vigor more accurately and integrally. Although by using the principal component analysis some variables were intended to be discriminated, this was not possible –nor is it advisable– because they were all expressed in the two components with a high preponderance degree.

Below each of the variables for the stages of germination, seedling emergence and growth is explained.

Selected variables

From the daily records in the experimental nursery the following variables were interpreted, which, in turn, made up the evaluations conducted in the first and second experimentation phase.

First phase: germination and seedling emergence

expresadas en las dos componentes con un alto grado de preponderancia.

A continuación se explica cada una de las variables para las etapas de germinación, emergencia y crecimiento de las plántulas.

Variables seleccionadas

A partir de los registros diarios en el vivero experimental se interpretaron las siguientes variables, las cuales, a su vez, conformaron las evaluaciones realizadas en la primera y la segunda fase de experimentación.

Primera fase: germinación y emergencia de las plántulas.

- Días para el inicio de la emergencia –IE– (Edwards, 1980).
- Porcentaje de emergencia final para el período de la prueba –Emer– (Perry, 1984).
- Día pico: en el que se observó la mayor cantidad de plántulas emergidas –DP– (Murillo, 1998).
- Emergencia pico: porcentaje máximo de emergencia observado en un mismo día –EP– (Murillo, 1998).
- Valor de la germinación (VG), determinado mediante la fórmula propuesta por Djavanshir y Pourbeik (1976).

$$VG = \left(\sum_{i=1}^n Ved_i \right) \left(\frac{Ef}{10N} \right)$$

Donde:

Ved: velocidad de la emergencia diaria, calculada como el porcentaje de la emergencia acumulada entre el número de días desde el inicio de la prueba.

N: frecuencia o número de *Ved* que se calcularon durante la prueba.

Ef: porcentaje de emergencia de las plántulas al final de la prueba.

f) Energía de la germinación (Ener), tipificada por el valor más alto de la velocidad de emergencia diaria durante la prueba (Czabator, 1962).

g) Tasa de emergencia (TE) expresada en porcentaje de emergencia.d⁻¹ (El-Kassaby, Edwards y Taylor 1992).

- Days for the beginning of emergence –BE– (Edwards, 1980).
- Final emergence percentage for the test period –Emer– (Perry, 1984).
- Peak day: in which the highest number of emerged seedlings was observed –PD– (Murillo, 1998).
- Peak emergence: maximum emergence percentage observed in the same day –EP– (Murillo, 1998).
- Germination value (VG), determined through the formula proposed by Djavanshir and Purbeik (1976).

$$VG = \left(\sum_{i=1}^n Ved_i \right) \left(\frac{Ef}{10N} \right)$$

Where:

Ved: rate of daily emergence, calculated as the percentage of the cumulative emergence between the number of days since the beginning of the test.

N: frequency or number of *Ved* which were calculated during the test.

Ef: emergence percentage of the seedlings at the end of the test.

f) Germination energy (Ener), typified by the highest value of the daily emergence rate during the test (Czabator, 1962).

g) Emergence rate (ER) expressed in emergence percentage.d⁻¹ (El-Kassaby, Edwards y Taylor 1992).

Second phase: seedling growth

a) Seedling height (cm): a graduated ruler was used.

b) Length of the root system (cm): like the above-explained.

c) Hypocotyl length (cm): a caliper was used.

d) Fresh weight of the root system (g): an analytical balance with 0,001 g accuracy was used and the data were expressed in grams per seedling.

e) Fresh weight of the aerial part (g): like the above-explained.

Such variables were selected from the criteria of different authors (who were dispersed in literature) about the relationship of each one of

Segunda fase: crecimiento de las plántulas.

- a) Altura de la plántula (cm): se utilizó una regla graduada.
- b) Largo del sistema radicular (cm): igual al anterior.
- c) Longitud del hipocótilo (cm): se utilizó un pie de rey.
- d) Peso fresco del sistema radicular (g): se empleó una balanza analítica con precisión de 0,001 g y los datos se expresaron en gramos por plántula.
- e) Peso fresco de la parte aérea (g): igual al anterior.

Dichas variables se seleccionaron a partir de los criterios de diferentes autores (los cuales se encontraban dispersos en la literatura) sobre la relación de cada una de ellas con la expresión del vigor de las semillas y, por ende, con la calidad.

Esta relación se basa en que ellas describen y caracterizan el desempeño de las semillas en las condiciones reales de siembra. Asimismo, permiten estimar el potencial de emergencia de las plántulas en el campo, con el inevitable efecto de las condiciones ambientales; este aspecto, si no se considera, podría limitar el resultado cierto, en función de la expresión dinámica del crecimiento y el desarrollo vistos en el tiempo.

- 3) Germinación o capacidad de emergencia de las semillas al ser expuestas a condiciones de estrés.

En el caso de la germinación o capacidad de emergencia de las semillas también se introdujeron elementos novedosos. La técnica para provocarles estrés, sin necesidad de utilizar cámaras de envejecimiento ni soluciones salinas o bajas temperaturas, fue simple. El almacenamiento al ambiente y los tiempos evaluados (desde 0 hasta 12 meses) constituyeron el método estresante, basado en que, como mecanismo natural para asegurar las sucesiones vegetales (según planteó Walters, 1998), las semillas impermeabilizan sus cubiertas (pérdida del agua intracelular) y con ello provocan una mayor resistencia a la renovación del crecimiento. Esto se relaciona con el tiempo de almacenamiento.

them to the expression of seed vigor and, thus, to quality. This relationship is based on the fact that they describe and characterize seed performance under real planting conditions. Likewise, they allow estimating the emergence potential of seedlings in the field, with the unavoidable effect of environmental conditions; this aspect, if not considered, could limit the accurate result, regarding the dynamic expression of growth and development seen in time.

- 3) Germination or emergence capacity of seeds when exposed to stress conditions

In the case of seed germination or emergence capacity novelty elements were also introduced. The technique for causing them stress, using neither ageing chambers nor saline solutions or low temperatures, was simple. Ambient storage and the evaluated times (from 0 to 12 months) constituted the stressing method, based on the fact that as natural mechanism to ensure plant successions (according to Walters, 1998), seeds make their coats impermeable (loss of intracellular water) and with it they cause higher resistance to growth renewal. This is related to storage time.

On the other hand, the ambient conditions of the store house are linked to the changes in moisture content (MC), due to the hygroscopic seed feature (Taiz and Zeiger, 2006), that is, they constantly try to balance their MC with the environmental relative humidity (Chai, Ma, Li y Du, 1998) It is known that by increasing MC the deterioration or ageing phenomenon may appear more rapidly (McDonald, 2006), with the subsequent change in their physiology (decrease of reserve substances, chromosomal aberrations, among others), in addition to being exposed to pest attacks in the storehouse. All this was described and exemplified by Harrington (1972).

In Cuban storehouses, which have ambient conditions, seeds are exposed to changes in environmental temperature and relative humidity (Navarro and Lezcano, 2007), because the used receptacles are permeable.

Por otra parte, las condiciones ambientales del almacén están vinculadas con los cambios en el contenido de humedad (CH), debido a la propiedad de las semillas de ser higroscópicas (Taiz y Zeiger, 2006), es decir, tratan constantemente de equilibrar su CH con la humedad relativa ambiental (Chai, Ma, Li y Du, 1998). Se conoce que al aumentar el CH se puede presentar más aceleradamente el fenómeno de deterioro o envejecimiento (McDonald, 2006), con el subsiguiente cambio en su fisiología (merma de sustancias de reserva, aberraciones cromosómicas, entre otras), además de estar expuestas al ataque de plagas de almacén. Todo ello fue descrito y ejemplificado por Harrington (1972).

En los almacenes de Cuba, que poseen condiciones ambientales, las semillas están expuestas a los cambios de temperatura y humedad relativa del ambiente (Navarro y Lezcano, 2007), debido a que los envases que se emplean son permeables.

Procedimiento y secuencia de trabajo

- Viabilidad

De acuerdo con Besnier (1965), la viabilidad es la capacidad de las semillas para germinar en condiciones adecuadas de temperatura, agua, oxígeno y luz. Para hacer una estimación rápida de este indicador se utilizó el ensayo topográfico de tetrazolium (AOSA, 2005). Se empleó como reactivo para esta prueba una solución acuosa de cloruro de 2,3,5-triphenyl tetrazolium (pH 6,5-7,5) al 1,0% de concentración. Se establecieron cuatro repeticiones de 100 semillas cada una, las cuales se colocaron a embeber en dicha solución acuosa, que actuó como un indicador de los procesos de reducción que tienen lugar dentro de las células vivas. En la evaluación de la viabilidad, para el cálculo y la expresión de los resultados, se consideraron las reglas internacionales que rigen el trabajo en esta prueba bioquímica (ISTA, 1999). La evaluación se basó en la coloración que toman las diferentes estructuras embrionarias.

- Germinación

La germinación puede definirse como aquellos eventos que comienzan con la captación de

Work procedure and sequence

- Viability

According to Besnier (1965), viability is the capacity of seeds to germinate under adequate temperature, water, oxygen and light conditions. To make a quick estimation of this indicator the tetrazolium topographic test was used (AOSA, 2005). The reagent used for this test was an aqueous solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (pH 6,5-7,5) at 1,0% concentration. Four repetitions were established of 100 seeds each, which were put to imbibe in such aqueous solution, which acted as an indicator of the reduction processes which occur within living cells. In the evaluation of viability, for the calculation and expression of the results, the international rules which rule the work in this biochemical test (ISTA, 1999) were considered. The evaluation was based on the color taken by the different embryonic structures.

- Germination

Germination can be defined as those events which begin with water capture by the seed and end with the elongation of embryonic axes, that is, the radicle and the plumule (Bewley, 1997). Radicle emergence through the seed coat is the first visible indication of germination (Nonogaki, 2006).

For setting up the germination test Petri dishes or other adequate recipient were used, with 184 grams of river sand –washed and disinfected– as inert substratum and, at the moment of seeding, 48 mL of water (at room temperature) were applied, a quantity which is adjusted to the saturation capacity value of sand. In each evaluation the dishes were kept in cabins, under controlled conditions (light, temperature and humidity) during 21 days, according to ISTA rules (1999) for tropical tree and shrub seeds. Four repetitions with no more than 100 seeds each were used. As the seed germinated it was eliminated from the dish.

In each evaluation the position of the Petri dishes was changed every three days, in order to decrease experimental errors (Murillo, 1998; Yang, Lovett-Doust and Lovett-Doust, 1999). The methodology can be developed in nursery.

agua por la semilla y finalizan con la elongación de los ejes embrionarios, es decir, la radícula y la plúmula (Bewley, 1997). La aparición de la radícula a través de las cubiertas seminales es el primer indicio visible de la germinación (Nonogaki, 2006).

Para el montaje de la prueba de germinación se emplearon cápsulas de Petri u otro recipiente adecuado, con 184 gramos de arena de río –lavada y desinfectada– como sustrato inerte y, en el momento de la siembra, se aplicaron 48 mL de agua (a temperatura ambiente), cantidad que se ajusta al valor de la capacidad de saturación de la arena. En cada evaluación las cápsulas se mantuvieron en cabinas, en condiciones controladas (luz, temperatura y humedad) durante 21 días, de acuerdo con lo normado por el ISTA (1999) para las semillas de árboles y arbustos tropicales. Se usaron cuatro repeticiones de no más de 100 semillas cada una. A medida que la semilla germinó se eliminó de la cápsula.

En cada evaluación la posición de las cápsulas de Petri se cambió cada tres días, con el fin de disminuir los errores experimentales (Murillo, 1998; Yang, Lovett-Doust y Lovett-Doust, 1999). La metodología puede desarrollarse en vivero.

- Emergencia

Se considera que la plántula está emergida cuando en la superficie del sustrato se observan los cotiledones fuera de la envoltura seminal, debido al alargamiento y erección del hipocótilo (Besnier, 1965).

Para evaluar la emergencia de las plántulas se realizaron siembras en el vivero, en bolsas que contenían un sustrato compuesto por una mezcla de suelo Ferralítico Rojo y estiércol ovino totalmente descompuesto y seco, en partes iguales (1:1), u otro material orgánico. En cada evaluación se emplearon cuatro réplicas (bolsas) de 100 semillas y se realizaron conteos diarios durante 21 días; el riego se hizo a saturación. Se aplicaron los tratamientos de escarificación húmeda y seca propuestos por Navarro, Febles, Torres y Noda (2010a).

- Crecimiento de las plántulas

Para las mediciones durante el crecimiento y desarrollo inicial de las plántulas se sembró en el

- Emergence

The seedling is considered emerged when the cotyledons outside the seed coat are observed on the substratum surface, due to the enlargement and erection of the hypocotyl (Besnier, 1965).

To evaluate seedling emergence seeding was conducted in nursery, in bags which contained a substratum composed by a mixture of Ferralitic Red soil and decomposed and dried sheep manure, in equal parts (1:1), or other organic material. In each evaluation four replications (bags) were used of 100 seeds and daily counts were made for 21 days; saturation irrigation was applied. The moist and dry scarification treatments proposed by Navarro, Febles, Torres y Noda (2010a) were applied.

- Seedling growth

For the measurements during seedling growth and initial development planting was conducted in the nursery and the same procedure described in the emergence test was followed, with the difference that all the variables were measured 30 days after planting; for such purpose 10 seedlings were selected in each of the four repetitions in each evaluation (storage time), for the pre-planting scarification methods described by Navarro, Febles, Torres y Noda (2010b).

Stages for integrated vigor analysis

An original and integrated procedure was developed for the evaluation of seed vigor, generated by the measurements made to the variables in nursery during the emergence test of the seedlings (first phase) and their growth test (second phase), which consisted in:

1. Selecting the variables related to vigor, which are described below, according to the integrated criteria from diverse authors.
2. Characterizing the performance of the most adequate pre-planting methods and which are aimed at eliminating dormancy.
3. Evaluating each variable, at an initial moment and during the subsequent six months (storage period). The first one represented the beginning of storage (newly harvested seeds), and the later ones represented the stored seeds under

vivero y se siguió el mismo procedimiento descrito en la prueba de emergencia, con la diferencia de que todas las variables se midieron a los 30 días posteriores a la siembra; para ello se seleccionaron 10 plántulas en cada una de las cuatro repeticiones en cada evaluación (tiempo de almacenamiento), para los métodos de escarificación presiembra descritos por Navarro, Febles, Torres y Noda (2010b).

Etapas para el análisis integrado del vigor

Se desarrolló un procedimiento original e integrado para la evaluación del vigor de las semillas, generado por las mediciones realizadas a las variables en el vivero durante la prueba de emergencia de las plántulas (primera fase) y la prueba de crecimiento de estas (segunda fase), el cual consistió en:

1. Seleccionar las variables relacionadas con el vigor, que aparecen descritas posteriormente, según el criterio integrado de diversos autores.
2. Caracterizar el comportamiento de los métodos de escarificación presiembra más adecuados y que están destinados a eliminar la dormancia.
3. Evaluar cada variable, en un momento inicial y durante los 12 meses subsiguientes (periodo de almacenamiento). El primero representó el inicio del almacenamiento (semillas recién cosechadas), y los posteriores, las semillas almacenadas en condiciones ambientales no controladas, etapa en la cual fue de interés evaluar la eficiencia de los tratamientos presiembra y su relación con el vigor de las semillas.
4. Comparar los cambios ocurridos en el vigor (calidad) durante el almacenamiento de las semillas, a partir de las variables.

Modelo estadístico

Para el procesamiento de la información en las dos fases anteriores, se utilizó la adecuación del modelo de Torres, Benitez, Lizazo y Álvarez (2007). Se empleó la combinación de dos técnicas multivariadas para explicar la variabilidad y la expresión del vigor, según los pasos siguientes:

uncontrolled environmental conditions, stage in which it was interesting to evaluate the efficiency of pre-planting treatments and their relation to seed vigor.

4. Comparing the changes occurred in vigor (quality) during seed storage, from the variables.

Statistical model

For processing information in the two previous phases, the adaptation of the model proposed by Torres, Benitez, Lizazo y Álvarez (2007) was used. The combination of two multivariate techniques was used to explain vigor variability and expression, according to the following steps:

- a. With the data obtained from the evaluations in nursery during a year the data matrix to be processed was constructed.
- b. The application premises of the multivariate methods were tested.
- c. Identification of variable ranking in the explanation of vigor variability.
- d. Classification of the evaluations, according to the scarification methods (pre-planting), according to the criteria: efficiency index and group formation.

Interpretation of the results

Vigor evaluation during germination, seedling emergence and growth has two parts: punctual vigor expression and vigor seen in time through storage, which conjugation was achieved with the development of an index called "efficiency index"; it indicates, through mathematical multivariate artifices, the relation between the performance of the measured variables and the storage periods. Thus the efficiency of the used pre-planting treatments also provides the information about vigor performance, after the application of one or the other indistinctly.

In order to learn the importance and efficiency of the global performance of the variables for each storage time, independently from the scarification method, it was decided that the statistical term called by Torres *et al.*, (2007) "impact index" should be interpreted as efficiency index of the variables evaluated in the storage times, in their relation to vigor variability.

- a. Con los datos obtenidos de las evaluaciones en el vivero durante un año se construyó la matriz de datos a procesar.
- b. Comprobación de las premisas de aplicación de los métodos multivariados.
- c. Identificación del orden de importancia de las variables en la explicación de la variabilidad del vigor.
- d. Clasificación de las evaluaciones, según los métodos de escarificación (presiembra), de acuerdo con los criterios: índice de eficiencia y formación de los grupos.

Interpretación de los resultados

La evaluación del vigor durante la germinación, la emergencia y el crecimiento de las plántulas consta de dos partes: la expresión del vigor puntualmente y el vigor visto en el tiempo a través del almacenamiento, cuya conjugación se logró con el desarrollo de un índice denominado “índice de eficiencia”; este indica, mediante artificios matemáticos multivariados, la relación entre el desenvolvimiento de las variables medidas y los períodos de almacenamiento. Es así que la eficiencia de los tratamientos presiembra empleados también proporciona la información acerca del comportamiento del vigor, luego de la aplicación de uno u otro indistintamente.

Para conocer la importancia y la eficiencia del comportamiento global de las variables para cada tiempo de almacenamiento, independientemente del método de escarificación, se decidió que el término estadístico denominado por Torres *et al.*, (2007) como “índice de impacto” se debe interpretar como índice de eficiencia de las variables evaluadas en los tiempos de almacenamiento, en su relación con la variabilidad del vigor.

El índice de eficiencia fortaleció y amplió la concepción y los resultados de este trabajo en la estimación del vigor; en él se creó una combinación de los tiempos de almacenamiento evaluados dentro de cada método presiembra. Este índice depende de las variables de mayor preponderancia; los valores positivos más altos indican cuáles tienen más influencia en cada

The efficiency index enhanced and widened the conception and results of this work in vigor estimation; in it a combination of the evaluated storage times within each pre-planting method was created. This index depends on the higher preponderance variables; the highest positive values indicate which have more influence on each particular storage time for each studied pre-planting method. The highest negative values indicate the contrary.

Around the highest positive efficiency value, which is in correspondence with a certain storage time, the other times must appear, which may show a similar and acceptable vigor performance. To verify this consideration, a cluster analysis must be made, which groups the storage times, according to the better or worse performance of the variables. Hence groups are formed, and in each the expression of these variables is observed. At this level, the researcher is more likely to choose, globally and integrally, which specific pre-planting treatment should be given –or not– to his/her seed lots, with a higher degree of reliability and logic for the relation of this selection with vigor.

The highest vigor seeds are those which, in the evaluations, show the best expressions of the variables identified as the ones with higher preponderance in the PCA, that is, the highest positive values for the efficiency index (EfPC); as well as the highest averages of such variables within the group in which they were placed, according to the cluster analysis. The contrary occurs in those with lower vigor, and those of moderate vigor have a moderate performance. Until now and while an interactive program (software) which allows automatically processing all these steps is not designed, the appreciation of the evaluator is determinant.

From all the above-expressed it is derived that vigor is always present in different intensity degrees. Hence the seeds were classified as high, moderate and low vigor seeds.

Through the biological variables of germination and emergence, and with the use of mathematical mechanisms, for every pre-planting treatment the following could be defined:

tiempo de almacenamiento particular para cada método presiembra estudiado. Los valores negativos más altos indican lo contrario.

Alrededor del valor del índice de eficiencia positivo más alto, que se corresponde con un tiempo de almacenamiento determinado, deben estar los otros tiempos, que pueden presentar un comportamiento similar y aceptable del vigor. Para verificar esta consideración hay que hacer un análisis de conglomerados, que agrupa los tiempos de almacenamiento, según el mejor o peor comportamiento de las variables. A partir de aquí se conforman grupos y en cada uno se aprecia la expresión de estas variables. A este nivel, el investigador tiene más probabilidad de elegir, de manera global e integral, cuál tratamiento presiembra específico debe dar a –o no– a sus lotes de semillas, con un mayor grado de confiabilidad y lógica por la relación de esta selección con el vigor.

Las semillas de mayor vigor son aquellas que, en las evaluaciones, presentan las mejores expresiones de las variables identificadas como de mayor preponderancia en el ACP, es decir, los valores positivos más altos para el índice de eficiencia (EfCP); así como los promedios más altos de dichas variables dentro del grupo en que se ubicaron, según el análisis de conglomerados. Lo contrario ocurre en las de menor vigor, y las de vigor medio tienen un comportamiento intermedio. Hasta el momento, y mientras no se diseñe un programa interactivo (*software*) que permita procesar automáticamente todos estos pasos, la apreciación del evaluador es determinante.

De todo lo anterior se deriva que el vigor siempre está presente en diferente grado de intensidad. De ahí que las semillas se clasificaran en las de vigor alto, medio y bajo.

Mediante las variables biológicas de la germinación y la emergencia, y con el empleo de mecanismos matemáticos, se logró definir para cada tratamiento presiembra:

1. Cuáles son las variables más relacionadas con el vigor.
2. En qué momento del almacenamiento de la semilla existe una mayor contribución de las variables seleccionadas.

1. The most vigor-related variables.
2. At what seed storage time there is higher contribution of the selected variables.
3. The groups, regarding storage time (evaluations), with a similar performance regarding vigor.

These three arguments indicate that vigor measurement is applicable to seeds from any species and different storage times. In addition, they allow deciding which pre-planting treatment may be used and, as a consequence, have more safety and success in the planting done with each seed lot.

Considerations about the new approach for vigor analysis

The experiments had integrating vision and strategy, which constitutes an original and novel approach for vigor estimation; this is based on the following considerations.

The accelerated ageing test (AA) to determine vigor is one of the most widely used at international level, and it is necessary to standardize it for each species. The key is in the period of seed exposure to ageing, which is achieved through assays with several temperatures and numbers of permanence hours in the ageing chamber. One of its deficiencies lies on the fact that, depending on the species – for a same temperature-, the increase of the exposure period provides gains in the water content percentages of seeds. To counteract this factor, the use of saturated salt solutions (NaCl, KCl or NaBr) during the test, is recommended in order to reduce relative humidity within the individual compartments, with which water absorption by the seed is delayed. This modification is called “saturated salt accelerated ageing” (SSAA) and it was proposed by Jianhua and McDonald (1996).

In spite of the diverse studies regarding temperature and adequate exposure periods of the AA test, no agreement has been reached among researchers and there is a lack of information about several economically important species (Marcos Filho, 1999) and regarding how to standardize the different parts of the method.

3. Cuáles fueron los grupos, en cuanto a tiempo de almacenamiento (evaluaciones), con un comportamiento similar en cuanto al vigor.

Los tres razonamientos anteriores indican que la medición del vigor es aplicable a semillas de cualquier especie y con diferentes tiempos de almacenamiento. Además, permiten decidir qué tratamiento presiembra se debe utilizar y, como consecuencia, tener más seguridad y éxito en la plantación que se realice con cada lote de semilla.

Consideraciones sobre el nuevo enfoque para el análisis del vigor

Los experimentos tuvieron una visión y una estrategia integradoras, lo que constituye un enfoque original y novedoso para la estimación del vigor; esto se basa en las siguientes consideraciones.

La prueba de envejecimiento acelerado (EA) para determinar el vigor es una de las que más se realizan a nivel internacional, y es necesario estandarizarla para cada especie. La clave está en el período de exposición de las semillas al envejecimiento, lo cual se logra mediante ensayos con varias temperaturas y números de horas de permanencia en la cámara de envejecimiento. Una de sus deficiencias radica en que, en dependencia de la especie –para una misma temperatura–, el aumento del período de exposición proporciona ganancias en los porcentajes del contenido de agua de las simientes. Para contrarrestar este factor, se sugiere el uso de soluciones saturadas de sales (NaCl, KCl o NaBr) durante la realización de la prueba, con el objetivo de reducir la humedad relativa en el interior de los compartimientos individuales, con lo que se retarda la absorción de agua por la semilla. Esta modificación se denomina “test de envejecimiento acelerado con uso de soluciones saturadas de sal” (SSAA por sus siglas en inglés) y fue propuesto por Jianhua y McDonald (1996).

A pesar de los diversos estudios en cuanto a la temperatura y los períodos adecuados de exposición de la prueba de EA, no se ha llegado al consenso entre los investigadores y existe una carencia de información sobre varias especies de interés económico (Marcos Filho, 1999) y

In literature, studies prevail in which the use of several exposure periods indicated differences of vigor among the evaluated samples, because a certain period can cause much more drastic stress degrees than the ones faced by seeds during transportation and storage, and under field planting conditions (Lima, Athanázio and Bellettini, 2006).

It is necessary to eliminate these inconveniences, and it is important to achieve stress degrees in correspondence with the conditions to which the seeds and seedlings will be exposed during seeding and establishment. Storage under ambient conditions seen in time, or equally, monthly analyzed from beginning to end, is approached as different stress degrees. The performance of the seedling emergence test in nurseries under full sunlight –in the farm itself or in the seed bank–, the measurement of variables closely connected to seed vigor and, afterwards, the integrating analysis of results will lead to more accurate results about seed vigor and, thus, their storage and quality potential. From this it is deduced that the expression rate of the variables is essential to estimate vigor.

Conclusions

The results allowed having more objective and accurate knowledge about vigor, because an acceptable balance was achieved between the biological and mathematical elements used. This new approach for vigor estimation allowed arriving at an integrated and dynamic concept, in which this indicator can be considered as the interaction of those biotic and abiotic properties (the expressions of viability, dormancy, germination and emergence) which influence seeds and determine the level of activity and their performance in time. For such reason, vigor cannot be dissociated from seed quality.

To continue the studies on this topic is recommended, to develop a work methodology for estimating the vigor of seeds accessible to technicians of farms or seedbanks, which allow them making decisions regarding the application –or not– of a pre-planting treatment in the field.

--End of the English version--

acerca de cómo estandarizar las diferentes partes del método.

En la literatura predominan investigaciones en las que el uso de varios períodos de exposición indicó diferencias de vigor entre las muestras evaluadas, debido a que un período determinado puede causar grados de estrés mucho más drásticos que los enfrentados por las semillas durante el transporte y el almacenamiento, y en las condiciones de siembra en campo (Lima, Athanázio y Bellettini, 2006).

Es necesario eliminar estos inconvenientes, y resulta importante lograr grados de estrés en correspondencia con las condiciones a las que serán expuestas las semillas y las plántulas durante la siembra y el establecimiento. El almacenamiento en condiciones ambientales visto en el tiempo, o lo que es igual, analizado mensualmente de inicio a fin, se enfoca como diferentes grados de estrés. La conducción de la prueba de emergencia de plántulas en viveros a pleno sol –en la propia finca o en el banco–, la medición de variables estrechamente interconectadas con el vigor de las semillas y, posteriormente, el análisis integrador de los resultados conducirán a resultados más precisos sobre el vigor de las semillas y, por ende, a su potencial de almacenamiento y calidad. De ello se deduce que la velocidad de expresión de las variables es fundamental para estimar el vigor.

Conclusiones

Los resultados permitieron tener un conocimiento más objetivo y preciso del vigor, debido a que se logró un equilibrio aceptable entre los elementos biológicos y matemáticos utilizados. Este nuevo enfoque para la estimación del vigor permitió llegar a un concepto integrado y dinámico, en el que este indicador puede ser considerado como la interacción de aquellas propiedades bióticas y abióticas (las expresiones de la viabilidad, la dormancia, la germinación y la emergencia) que influyen en las semillas y determinan el nivel de actividad y su comportamiento en el tiempo. Por ello, el vigor no se puede desvincular de la calidad de las semillas.

Se recomienda continuar los estudios en esta temática, para desarrollar una metodología de

trabajo de estimación del vigor de las semillas asequible a los técnicos de las fincas y bancos de semilla, que les permita tomar decisiones en la aplicación –o no– de un tratamiento presiembra en el campo.

Referencias bibliográficas

- Alizaga, R.; Sterling, F. & Herrera, J. 1992. Evaluación del vigor en semillas de maíz y su relación con el comportamiento en el campo. *Agronomía Costarricense*. 16 (2):203
- AOSA. 2005. Tetrazolium testing handbook. Contribution No. 29 (Ed. J. Peters). Association of Official Seed Analysts. Ithaca, USA. 32 p.
- Barros, D.I.; Nunes, H.V.; Fernandes, D.C. & Bhering, M.C. 2002. Comparação entre testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de tomate. *Rev. Bras. Sem.* 24 (2):12
- Bennett, M.A. 2002. Saturated salt accelerated ageing (SSAA) and other vigor test for vegetable seeds. In: Seeds: trade, production and technology. Proceedings International Seed Seminar (Eds. M.B. McDonald y S. Contreras). Colección de Extensión. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. p. 188
- Besnier, F. 1965. Semillas: biología y tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 394 p.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. 9:1055
- Bonner, F.T. 1998. Testing tree seeds for vigor: a review. *Seed Technology*. 20:5
- Chai, J.; Ma, R.; Li, L. & Du, Y. 1998. Optimum moisture contents of seed stored at ambient temperatures. In: Seed storage behaviour (Eds. J. Engels and F. Engelmann). CAB International. United Kingdom.
- Costa, P. de S.C. & Carvalho, M.L.M. 2006. Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.). *Ciê. Agrotec.* 30 (1):92
- Czabator, F.J. 1962. Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science*. 8:386
- Delouche, J.C. 1976. Standardization of vigor tests. *Journal of Seed Technology*. 1 (2):75
- Djavanshir, K. & Pourbeik, H. 1976. Germination value –A new formula. *Silvae Genetica*. 25:79
- Edwards, D.G.W. 1980. Maturity and quality of tree seeds –A state of the art–. Review. *Seed Sci. Technol.* 8:625
- El-Kassaby, Y.A.; Edwards, D.G.W. & Taylor, D.W. 1992. Genetic control of germination in Douglas-fir

- and its importance for domestication. *Silvae Genetica*. 41:48
- Ferguson, J. 1995. An introduction to seed vigour testing. In: Seed vigour testing seminar (Ed. H.A. van de Venter). International Seed Testing Association. Zúrich, Switzerland. p. 14
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. In: Seed Biology. Vol. 3. (Ed. T.T. Kozłowski). Academic Press, London, United Kingdom. p. 145
- ISTA. 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zúrich, Switzerland. 117 p.
- ISTA. 1999. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 27 (Supplement).
- ISTA. 2001. International Seed Testing Association Rules Amendments 2001. *Seed Sci. Technol.* 29 (Supplement).
- Jianhua, Z. & McDonald, M.B. 1996. The saturated salt accelerated ageing test for small-seeded crops. *Seed Sci. Technol.* 25 (1):123
- Lima, C.B.; Athanázio, J.C. & Bellettini, N.M.T. 2006. Germinação e vigor de sementes de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) submetidas ao envelhecimento acelerado. *Ciências Agrárias*. 27 (2):159
- McDonald, M.B. 1980. Assessment of seed quality. *HortScience*. 15:784
- McDonald, M.B. 2006. Physiological causes of seed deterioration in storage. Crop Science Society American Annual Meeting. Indianapolis, USA.
- Marcos Filho, J. 1999. Testes de vigor: importância e utilização. Em: Vigor de sementes: conceitos e testes. (Eds. F.C. Krzyzanowski, R.D. Vieira e J.B. França Neto). ABRATES. Londrina, Brasil. p. 24
- Murcia, M.; Peretti, A.; San Martín, S. & Pereyra, V. 2001. Vigor de semillas y emergencia a campo de girasol (*Helianthus annuus* L.) en siembras anticipadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Rev. Bras. Sem.* 23 (2):263
- Murillo, O. 1998. Variación en parámetros de germinación de una población natural de *Alnus acuminata* de Guatemala. *Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales*. 19:4
- Navarro, Marlen. 2009. Comportamiento interactivo de la germinación, la dormancia, la emergencia y el crecimiento inicial como atributos biológicos para evaluar el vigor de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 101 p.
- Navarro, Marlen.; Febles, G.; Torres, Verena. & Noda, Aida. 2010a. Efecto de los tratamientos presiembra en el comportamiento de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. durante el almacenamiento. I. Capacidad germinativa. *Pastos y Forrajes*. 33:187
- Navarro, Marlen; Febles, G.; Torres, Verena. & Noda, Aida. 2010b. Efecto de los tratamientos presiembra en el comportamiento de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. durante el almacenamiento. II Emergencia de plántulas. *Pastos y Forrajes*. 33:263
- Navarro, Marlen & Lezcano, J.C. 2007. Efecto del método de secado en la longevidad y calidad de las semillas de *Bauhinia purpurea*. I. Almacenamiento en condiciones ambientales. *Pastos y Forrajes*. 30:437
- Navarro, Marlen & Mesa, A.R. 2005. Estudio del germoplasma arbóreo forrajero en Cuba: conservación de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. BIOTAM Nueva Serie. Revista Científica del Instituto de Ecología y Alimentos, Universidad Autónoma de Tamaulipas, edición especial. t. I. p. 494
- Nonogaki, H. 2006. Seed germination –The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science*. 56:93
- Perry, D.A. 1981. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zúrich, Switzerland. 72 p.
- Perry, D.A. 1984. Manual de métodos de ensayos de vigor. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 56 p.
- Shah, F.S.; Watson, C.E. & Cabrera, E.R. 2002. Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. *Research Report*. 23 (2):1
- Steiner, J.J. 1990. Seed physiology, production and technology. *Crop Sci.* 30:1264
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA 705 p.
- Tekrony, D.M. 2003. Review: precision is an essential component of seed vigour testing. *Seed Sci. Technol.* 31:435
- Tekrony, D.M. 2006. Seeds: the delivery system for crop science. *Crop Sci.* 46:2263
- Torres, Verena; Benítez, D.; Lizazo, D. & Álvarez, A. 2007. Modelo estadístico para la medición del impacto de la innovación o transferencia tecnológica en la rama agropecuaria. XI Conferencia Española de Biometría y I Encuentro Iberoamericano de Biometría. Universidad de Salamanca, España
- Walters, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8:223
- Yang, J.; Lovett-Doust, J. & Lovett-Doust, L. 1999. Seed germination patterns in green dragon (*Arisaema dracontium*, Araceae). *Amer. J. Bot.* 86:1160

Recibido el 12 de diciembre del 2011

Aceptado el 28 de mayo del 2012