



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

**ESTUDIOS DE GERMINACION EN TRES ESPECIES
DEL GENERO *NOTHOSCORDUM***

por

Raúl VERNENGO

TESIS

2000

MONTEVIDEO

URUGUAY



**Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTUDIOS DE GERMINACIÓN EN
TRES ESPECIES DEL GÉNERO
*NOTHOSCORDUM***

Por

Raúl VERNENGO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

FACULTAD DE AGRONOMÍA



DEPARTAMENTO DE
DOCUMENTACIÓN Y
BIBLIOTECA

**Montevideo
URUGUAY
2000**

Página de Aprobación

Tesis aprobada por: Orfeo Crossa

Nombre completo y firma

Luis Viega

Nombre completo y firma

Daniel Bayce

Nombre completo y firma

Fecha: 11/07/2000

Autor: Raúl Veruego 

Nombre completo y firma

Agradecimientos:

A mis padres, en primer lugar por haberme traído al mundo por amor y con amor. A mi mamá por haberme enseñado su sensibilidad y la fuerza que lleva dentro. A mi papá por enseñarme la solidaridad y que vale la pena sacrificar lo que más se quiere por una causa justa.

Al Profesor Orfeo Crosa, por haberme propuesto un tema de tesis que, con el tiempo, ha resultado ser apasionante, y por su apoyo.

Al Profesor Roberto Benech-Arnold de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, gran investigador y mejor persona. Por su paciente y desinteresado apoyo a lo largo de todo el trabajo. En la vida uno se encuentra a veces con personas especiales que iluminan lo que está a su alrededor. Roberto es para mí una de esas personas.

A mis compañeros de la Cátedra de Genética: Mario, Cristina, Clara y Jorge, quienes me apoyaron en estos meses y me permitieron dedicarme a mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de la Unidad de Educación Permanente y Posgrados Roberto, David y Sandra, por su apoyo, comprensión y ayuda.

A algunos parientes y amigos que me ayudan a crecer: mi hermana Cecilia, David (de nuevo), Alfonso, Mauricio y Mariela, Marisa, Pilar, Heber, Fabián. Y muy especialmente a Pinio.

A Juan Burgueño y Jorge Franco de la Unidad de Estadística y Cómputos de nuestra facultad. Al primero por su ayuda en el diseño de los ensayos y al segundo por su colaboración en el análisis de los resultados obtenidos.

A Luis Viega y Mercedes Rivas, quienes me permitieron utilizar el equipamiento de sus laboratorios para la realización de los ensayos de la tesis.

Este trabajo lo dedico especialmente a las dos personas más maravillosas de mi mundo, Emiliano y Camilo, a quienes amo hasta la galaxia de Andrómeda, ida y vuelta, un millón de veces. Y también los amo el doble de eso, y el doble de lo anterior, y ...

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro 1. Tratamientos utilizados _____	24
Cuadro 2. Germinación de semillas de <i>Nothoscordum</i> sp. "Punta Colorada" __	26
Cuadro 3. Germinación de semillas de <i>Nothoscordum macrostemon</i> _____	28
Cuadro 4. Germinación de semillas de <i>Nothoscordum nudicaule</i> _____	29
Figura 1. Curvas típicas de germinación de semillas _____	5
Figura 2. Efecto de remoción de partes de los cotiledones en embriones aislados en dormición en manzana _____	13
Figura 3. Efecto del lavado en embriones de <i>Taxus bacata</i> _____	14
Figura 4. Ausencia de inducción de la dormición en mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> deficientes en ABA _____	15
Figura 5. Solapamiento de temperaturas ambientales y rango de temperatura de germinación en semillas de especies anuales estivales y especies anuales invernales _____	17
Figura 6. Curvas de germinación de semillas de <i>N. sp.</i> "Punta Colorada" _____	27
Figura 7. Curvas de germinación de semillas de <i>N. macrostemon</i> _____	28
Figura 8. Curvas de germinación de semillas de <i>N. nudicaule</i> _____	30
Figura 9. Porcentajes finales de germinación según tratamiento (tres especies) _____	31

TABLA DE CONTENIDO.

Página de Aprobación	I
Agradecimientos	II
Lista de cuadros e ilustraciones	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 GERMINACIÓN	3
2.1.1 Medición de la germinación	4
2.1.2 Control de la germinación por factores ambientales	6
2.1.2.1 Temperatura	6
2.1.2.2 Condiciones hídricas	7
2.1.2.3 Oxígeno	7
2.2 DORMICIÓN	9
2.2.1 Las definiciones de dormición	9
2.2.2 Especies cultivadas y dormición	11
2.2.3 Clasificación de la dormición	11
2.2.4 Causas de la dormición	13
2.2.4.1 Limitaciones del embrión y los cotiledones e inhibidores de la germinación	13
2.2.4.2 Las limitaciones dadas por la cubierta	14
2.2.5 Factores que afectan nivel y terminación de la dormición	16
2.2.5.1 Temperatura ambiental	16
2.2.5.2 Luz	19
2.2.5.3 Hipoxia	20
2.2.5.4 Temperaturas fluctuantes	20
2.2.5.5 Nitratos	21
2.2.5.6 Ambiente gaseoso	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL VEGETAL Y SEMILLAS	22
3.2 TRATAMIENTO PREVIO DE LAS SEMILLAS	22
3.3 TESTS DE GERMINACIÓN SEGÚN ALGORITMO DEL REAL JARDÍN BOTÁNICO DE WAKEHURST PLACE	22

3.3.1	<u>Temperaturas de germinación</u>	22
3.3.2	<u>Algoritmo para liliáceas</u>	23
3.4	TESTS DE GERMINACIÓN REALIZADOS EN EL TRABAJO	23
3.4.1	<u>Modificaciones del algoritmo</u>	23
3.5	MEDICIÓN DE LA GERMINACIÓN	25
3.6	INSTRUMENTOS ESTADÍSTICOS	25
4.	RESULTADOS	26
4.1	GERMINACIÓN POR ESPECIE	26
4.1.1	<u><i>Nothoscordum</i> sp. "Punta Colorada"</u>	26
4.1.2	<u><i>Nothoscordum macrostemon</i></u>	28
4.1.3	<u><i>Nothoscordum nudicaule</i></u>	29
4.2	COMPARACIÓN ENTRE ESPECIES SEGÚN TRATAMIENTO	31
5.	DISCUSIÓN	33
6.	CONCLUSIONES	36
7.	RESUMEN	38
8.	SUMMARY	40
9.	BIBLIOGRAFÍA	42
10.	ANEXOS	47
10.1	DIAGRAMA DE FLUJO SOBRE CAMBIOS DE DORMICIÓN Y TERMINACIÓN DE LA DORMICIÓN EN SEMILLAS Y FACTORES QUE AFECTARÍAN DICHOS PROCESOS	47
10.2	TEMPERATURA MEDIA DIARIA DURANTE LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE GERMINACIÓN	48
10.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
10.4	INTERVALOS DE CONFIANZA PARA PORCENTAJES DE GERMINACIÓN	51

1. INTRODUCCIÓN

La idea de iniciar el estudio de los fenómenos de dormición y germinación de las semillas en especies del género *Nothoscordum* surgió a partir de observaciones empíricas sobre la germinación de numerosas especies e híbridos interespecíficos pertenecientes a este género, que sugerían la existencia de un período de dormición durante el verano, la posibilidad de desarrollo de una dormición secundaria y la existencia de diferencias en los porcentajes de germinación de algunas especies. Estas observaciones fueron realizadas durante estudios biosistemáticos del género *Nothoscordum* que se desarrollan en la Cátedra de Genética.

Los temas de la germinación y de la dormición de semillas son de gran importancia en los estudios ecológicos de especies silvestres y de malezas, pero no ha sido un tema en que se haya puesto énfasis en el caso de las plantas cultivadas, que en general han perdido la dormición en el proceso de domesticación.

Nothoscordum es un género sudamericano de la tribu *Allieae*, constituido por hierbas perennes (geófitas bulbosas) de ciclo invernal y con período de dormición durante el verano, representado en Uruguay por numerosas especies.

Las tres especies seleccionadas para este estudio poseen las siguientes características: *N. sp.* "Punta Colorada" es endémica de las serranías del sureste del Uruguay, con flores nocturnas y una floración anual, en primavera. *N. macrostemon* es una especie del sur de Uruguay, provincia de Buenos Aires y Entre Ríos, donde crece preferentemente en suelos arcillosos húmedos. Es también de floración nocturna pero posee dos floraciones anuales, en primavera y otoño respectivamente. *Nothoscordum nudicaule* se halla en Buenos Aires, Entre Ríos, Uruguay y en el sur de Río Grande del Sur. Se encuentra en claros del monte de galería, y a diferencia de las otras dos especies es de flores diurnas. Como *N. macrostemon* posee dos floraciones anuales. Además de las diferencias en la biología floral y en las preferencias ecológicas se observaron diferencias importantes en la germinación de las semillas en condiciones de laboratorio (O. Crosa, com. pers.). Estos hechos y la disponibilidad de semillas de dichas especies nos decidieron a utilizarlas para un trabajo de esta naturaleza.

El estudio de la germinación y de la dormición de semillas es un tema que en la actualidad que es objeto de diversos estudios: la dormición de semillas es un fenómeno frecuente en la naturaleza -especialmente en especies de clima templado o desértico-, cuyos mecanismos básicos de establecimiento y levantamiento o atenuación no son conocidos aún completamente.

El presente estudio se llevó adelante sin saber en primera instancia si las diferencias en la germinación en las especies estudiadas se debían a la existencia de dormición o a las condiciones de germinación utilizadas.

El objetivo primario de este trabajo fue el de comenzar a conocer las condiciones de germinación en las semillas de estas especies utilizando diferentes regímenes térmicos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GERMINACIÓN

Las nuevas plantas formadas a través de la reproducción sexual comienzan como un embrión en la semilla que comienza a formarse en la planta madre, que se origina a su vez del óvulo. Al madurar las semillas, se transforman en el vehículo de dispersión. Para que estas semillas den origen a nuevas plantas debe darse la germinación, el pasaje de una semilla en reposo a una con alto nivel de metabolismo, que lleva a la emergencia de la nueva plántula.

Mayer *et al.* (1975) definen la germinación como los pasos consecutivos que hacen que una semilla quiescente (capaz de germinar pero en reposo), con un bajo nivel de humedad, muestre un aumento en su actividad metabólica general e iniciar el desarrollo de una plántula a partir del embrión. Agregan además que el momento en que termina la germinación y comienza el crecimiento es sumamente difícil de definir, ya que se identifica la germinación con la emergencia de una parte del embrión por fuera de la cubierta de la semilla.

Muchas veces se considera que la germinación es la emergencia de la plántula -la radícula o el epicótilo- de la semilla. Para Bewley y Black (1994), sin embargo, en términos estrictamente fisiológicos, "la germinación comienza con la absorción de agua por parte de la semilla (imbibición) y termina con el comienzo de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula".

Este proceso incluye numerosos eventos, como por ejemplo hidratación proteica, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular, pero ninguno de estos eventos es exclusivo de la germinación. En sentido estricto, cuando la plántula emerge y comienza a crecer, la germinación ya ha culminado. No obstante, es común que en tests de semillas y a nivel práctico se identifique la germinación con la emergencia, tanto a nivel de laboratorio como en el campo.

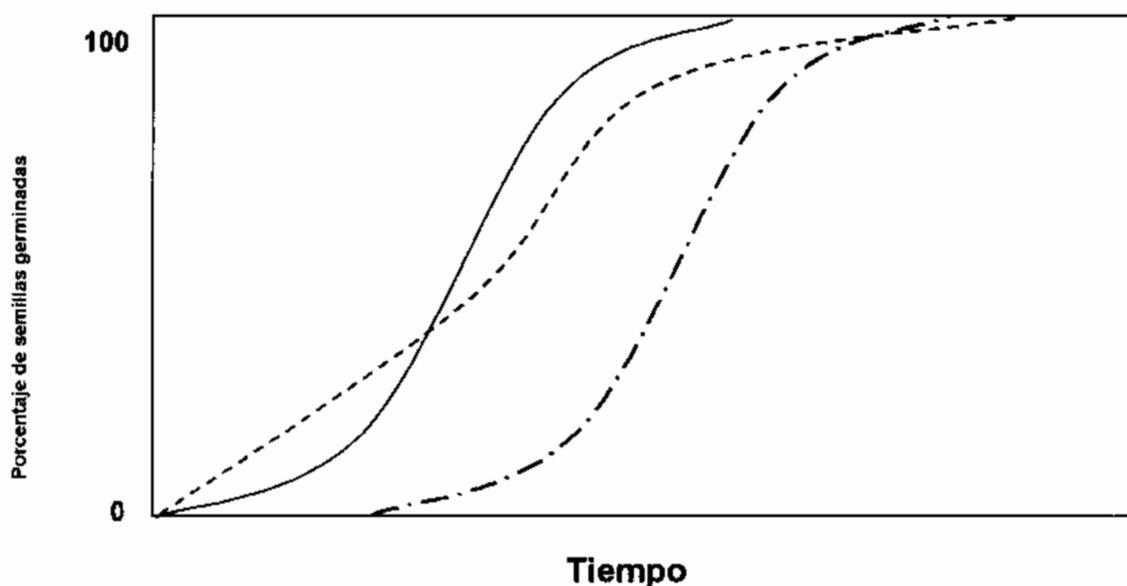
Se llaman quiescentes las semillas en las que no ocurre ninguno de los procesos típicos de la germinación. Las semillas quiescentes tienen por lo general un nivel de humedad muy bajo (5-15%) y un nivel de actividad metabólica prácticamente nulo. En muchos casos pueden permanecer en ese estado durante años para luego manifestar un metabolismo normal. Para que exista germinación se necesita que la semilla se hidrate, en condiciones favorables de temperatura y presencia de oxígeno. No obstante, pueden darse estas condiciones y aún no haber germinación. Cuando se dan las condiciones adecuadas para que una semilla germine (presencia de agua y de niveles adecuados de temperatura y oxígeno) y el proceso de germinación no se da, se dice que la semilla se encuentra en dormición (Bewley y Black, 1994). Nos referiremos a la dormición propiamente dicha en la segunda parte de la revisión bibliográfica.

2.1.1 Medición de la germinación

Algunos elementos, como la medición de la absorción de agua o de la respiración, brindan una idea aproximada del nivel del proceso de germinación de las semillas, pero no existen hasta el momento marcadores bioquímicos adecuados para medir el progreso del proceso de la germinación. El único evento que puede medirse con exactitud es la emergencia del eje embrionario de la semilla, justamente el momento en que la germinación ha terminado. Por ello, los tests de germinación que se realizan en todo el mundo miden justamente la emergencia del eje embrionario.

La forma de las curvas de germinación suele ser sigmoidea:

Figura 1: Curvas típicas de germinación de semillas.



Esto significa que sólo unas pocas semillas germinan en el inicio del proceso. La tasa de germinación aumenta progresivamente hasta que se completa el proceso de germinación en las últimas semillas.

A pesar de que por lo general las curvas de germinación tienen esta forma, muchas de ellas no llegan a altos niveles de germinación, y se dice que estas semillas tienen una baja capacidad de germinación, o sea que el porcentaje de semillas capaces de germinar es bajo. En caso de que las semillas sean todas viables, el bajo nivel de germinación puede deberse a la dormición o a condiciones ambientales inadecuadas para que se de el proceso.

Algunos factores que afectan la forma de una curva de germinación son la uniformidad de la población de semillas -la simultaneidad o sincronía- y la tasa de germinación.

2.1.2 Control de la germinación por factores ambientales

En semillas que no están en dormición existen tres factores que controlan la germinación: la temperatura, la disponibilidad de agua y la disponibilidad de oxígeno (Benech-Arnold et al., 2000).

2.1.2.1 Temperatura

Al referirse a la temperatura, es necesario tener en cuenta que este factor influye tanto en la dormición (en su levantamiento, en su establecimiento cuando se trata de dormición secundaria) como en la germinación en sí misma (Bewley y Black, 1994; Vleeshouwers et al., 1995, Benech-Arnold et al., 2000).

Una vez que la dormición ha sido eliminada, por lo general la germinación se da en un rango relativamente amplio de temperaturas, y dentro del rango de temperaturas en el que la germinación es máxima, las semillas responden a la temperatura únicamente con cambios en la tasa de germinación (Bewley y Black, 1994). A su vez, la tasa de germinación, definida como $1/t$ (la inversa del tiempo necesario para que cierta proporción de la población de semillas germine), aumenta por lo general en forma lineal con la temperatura en el rango de temperatura subóptimo (Bierhuizen y Wagenvoort, 1974).

Las semillas tienen para su germinación un rango de temperatura definido, que varía según las especies. Thompson (1973) investigó los rangos de temperaturas de germinación para *Gysophila perfoliata*, *Allium porrum* y *Lychnis flox-cuculi*, trabajando con temperaturas entre 2 y 42°C, y hallando rangos de temperaturas diferentes para cada especie para alcanzar una germinación del 100%.

A pesar de que las diferentes especies puedan tener un amplio rango de temperatura para alcanzar una germinación cercana al 100%, la tasa de germinación máxima se alcanza por lo general en un rango no mayor a los 2°C. (Bewley y Black, 1994)

En las malezas, el análisis del comportamiento de las semillas en función de la temperatura es complicado debido a que éstas tienen respuestas múltiples: la temperatura puede determinar la proporción de la

población de semillas que está en dormición (tanto induciéndola como atenuándola o eliminándola) y al mismo tiempo modular la germinación de la fracción de la población de semillas que no se encuentra en estado de dormición (Benech Arnold y Sánchez, 1995).

En el caso de semillas que necesiten de enfriamiento para eliminar la dormición, puede a veces producirse germinación a las mismas bajas temperaturas, pero muy lentamente. Las semillas no germinan a temperaturas más altas porque tienen dormición, y parecen tener un rango muy estrecho de temperaturas para la germinación (Bewley y Black, 1994; Benech-Arnold, com. pers.).

2.1.2.2 Condiciones hídricas

La falta de agua afecta tanto la tasa como el porcentaje de germinación de las semillas, y existen desde especies muy sensibles al estrés (la soja) hasta otras muy resistentes (Bewley y Black, 1994).

Según Probert (1992), aún teniendo en cuenta la importancia de otros factores como la temperatura y la luz en el control de la germinación, ésta está determinada en última instancia por la disponibilidad de agua.

Gummerson (1986) introdujo el concepto de tiempo hidrotermal, relacionando el potencial osmótico, la temperatura y el tiempo, y a partir de este concepto desarrolló una ecuación que permite predecir la germinación a través del tiempo en un amplio rango de temperaturas y potenciales de agua.

2.1.2.3 Oxígeno

Benech-Arnold (2000) señala que el oxígeno es uno de los requerimientos para la germinación de las semillas que no están en dormición, junto con la disponibilidad de agua y temperaturas adecuadas.

En la mayoría de las especies, la germinación se ve afectada negativamente con concentraciones de oxígeno menores a las existentes en el aire atmosférico. Además, altas concentraciones de dióxido de carbono (4% por ejemplo) impiden la germinación en muchas especies.

Por lo general, en el suelo las concentraciones bajas de oxígeno y altas de dióxido de carbono que afecten negativamente la germinación ocurren raramente (Bewley y Black, 1994).

2.2 DORMICIÓN

2.2.1 Las definiciones de dormición

Hobson (1981) sostiene que pueden haber tantas definiciones sobre la dormición como investigadores trabajando en el tema. Esta situación tiene que ver fundamentalmente con el desconocimiento que existe sobre los mecanismos inherentes al fenómeno.

Harper (1959) clasificó a las plantas que viven en una comunidad en dos tipos, las que están creciendo y las que están en dormición. Según esta definición, las plantas que no están germinando están en dormición (Vleeshouwers *et al.*, 1995). Esta definición de dormición ha sido adoptada por muchos autores posteriormente, que identifican la dormición con ausencia de germinación.

En el Manual de Tecnología de Semillas para Bancos de Germoplasma (1985) se le define en sentido amplio como el período desde que el embrión de la semilla discontinúa su crecimiento en la planta madre hasta que comienza a germinar, y en sentido estricto, para aquellos que trabajan en bancos de germoplasma, la definen como la condición de una semilla viable que le impide germinar aún cuando estén presentes los factores que normalmente se consideran adecuados para la germinación, como una temperatura adecuada, un medio con agua suficiente y a una atmósfera apropiada.

Salisbury y Ross (1992) distinguen dos situaciones diferentes, llamando quiescentes a las semillas incapaces de germinar simplemente porque no se dan las condiciones externas adecuadas y semillas en dormición a las que no son capaces de germinar a causa de condiciones internas, aunque se den condiciones externas (temperatura, humedad, atmósfera) adecuadas.

Más recientemente, Vleeshouwers *et al.* (1995) definen la dormición como una característica de la semilla, cuyo nivel determina las condiciones que deberían darse para que la semilla germine.

Benech-Arnold *et al.* (2000) definen la dormición en términos similares, como una condición interna de la semilla que impide su germinación en condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que de otra manera serían adecuadas para ello.

Estas discrepancias en la propia definición del fenómeno están relacionadas con la forma en que se consideran los factores internos y externos a la semilla que impiden la germinación.

Vleeshouwers *et al.* (1995) consideran al fenómeno clasificado por Harper como dormición como la incapacidad de las semillas de germinar, pero no como dormición. Reservan el término dormición únicamente para denominar al bloqueo o los bloqueos que existen dentro de la semilla para la germinación, distinguiéndolos de la ausencia de factores ambientales necesarios para la germinación.

Algunos autores como Simpson (1990) consideran que la dormición es "una falla temporal en la germinación de una semilla viable, luego de un período de tiempo determinado, en unas condiciones ambientales particulares que más adelante, cuando el estado restrictivo ha desaparecido por causas naturales o artificiales" permiten la germinación, lo que representa una continuación de la idea original de Harper.

Vegis (1964) introdujo el concepto de niveles de dormición en. Según esta idea, la dormición se atenúa y se refuerza a lo largo de un año, lo que hace variar los rangos térmicos de germinación, que son más amplios a medida que la dormición se atenúa. Esto introduce el concepto de que la dormición no es un fenómeno de "todo o nada", aunque la falla de las semillas en germinar, en condiciones determinadas, sí pueda considerarse de esa manera (Baskin & Baskin 1985).

Según Benech-Arnold *et al.* (2000), dormición y germinación son diferentes procesos, y debería ser posible predecirlos y analizarlos separadamente. Funcionan a escalas de tiempo diferentes y son afectados por factores ambientales diferentes. Aún en el caso de que esos factores actúen sobre ambos procesos, los valores son diferentes. En especies anuales estivales, por ejemplo, la atenuación de la dormición ocurre a bajas temperaturas, mientras que el óptimo para la germinación se da a temperaturas más altas. En forma análoga, es común que en

especies anuales invernales se de la atenuación de la dormición a altas temperaturas, mientras que las temperaturas óptimas de germinación son más bajas.

2.2.2 Especies Cultivadas y Dormición

Según Benech-Arnold *et al.* (2000), las plantas cultivadas han sido fuertemente seleccionadas en contra de la dormición, y por ello la emergencia de plántulas en estas especies puede ser fácilmente descripta en función de los factores que afectan únicamente la germinación de semillas no dormidas (temperatura, presencia de agua, disponibilidad de oxígeno). Según el mismo autor, la dormición es por el contrario una característica común en muchas especies silvestres, y entre ellas en las malezas, lo que dificulta la predicción de los tiempos y de la intensidad de la germinación en este tipo de especies. Las prácticas agrícolas suelen además afectar la dinámica y la intensidad de la ruptura de la dormición en malezas.

2.2.3 Clasificación de la dormición

Fenner (1985) reconoce, de acuerdo al concepto de Harper (1959) tres tipos de dormición en base al origen del fenómeno: dormición innata, dormición forzada y dormición inducida o secundaria. Llama dormición innata a la que las semillas poseen al ser liberadas de la planta madre, dormición forzada a la que ocurre cuando las semillas se ven privadas de las condiciones adecuadas (falta de humedad, oxígeno, temperatura adecuada) para la germinación y dormición inducida a la adquirida por semillas maduras (capaces de germinar) que no encuentran las condiciones adecuadas para ello.

Según Staniforth y Cavers (1979), en el caso de *Polygonum persicaria* las semillas que son dispersadas en otoño tienen dormición innata y requieren de un período de posmaduración que previene que germinen antes del invierno. Durante la época fría del invierno se produce según los autores una dormición forzada a raíz de las bajas temperaturas. Si algunas semillas no germinan en primavera por condiciones de altas temperaturas o de sequedad, se da una dormición inducida, que sólo puede levantarse con un segundo período de enfriamiento.

Baskin y Baskin (1985) hablan de dormición innata cuando las semillas no germinan en ninguna condición ambiental adecuada para ello y se refieren a semillas no dormidas a las que germinan en el rango más amplio de condiciones. Entre ambos extremos se da según los autores el proceso de posmaduración (afterripening), durante el que se da una dormición condicional. Esta implica que la germinación se da únicamente en un rango limitado de condiciones ambientales. Por otro lado se refieren a dormición primaria (la que tienen las semillas maduras en la planta madre) y a dormición secundaria como la que adquieren semillas maduras en las que se reinduce la dormición bajo ciertas condiciones.

Vleeshouwers *et al.* (1995) y Benech-Arnold *et al.* (2000) consideran que la dormición se clasifica en primaria (o innata, en semillas recién liberadas de la planta madre) y secundaria. Llaman dormición secundaria a la que se reinduce en semillas ya maduras a través de condiciones desfavorables para la germinación o para la terminación de la dormición.

Vegis (1964) introdujo el concepto de niveles de dormición relativa, relacionado con el hecho de que a medida de que la dormición es aliviada en las semillas, el rango de temperaturas para la germinación se amplía. Baskin *et al.* (1985, 1987) llaman a este fenómeno dormición condicional, mientras que otros autores como Karssen (1982) y Benech-Arnold *et al.* (2000) la llaman dormición relativa.

Benech-Arnold *et al.* (2000) se refieren a que la salida de semillas de la dormición primaria, seguida de una entrada en dormición secundaria, cuando existen las condiciones para que ello se de, puede llevar a ciclos de dormición de semillas, de los que hay evidencias en muchas especies. A partir de ello concluye que la persistencia de bancos de semillas en la naturaleza durante muchos años puede estar relacionada no sólo con el nivel de dormición primaria de las semillas al ser liberadas, sino además con la existencia de ciclos de dormición.

Más allá de las diferencias de denominaciones entre diferentes autores, en general existe coincidencia en cuanto a los conceptos: dormición innata y dormición primaria son equivalentes, al igual que los de dormición inducida y dormición secundaria y los de dormición condicional y dormición relativa.

2.2.4 Causas de la dormición

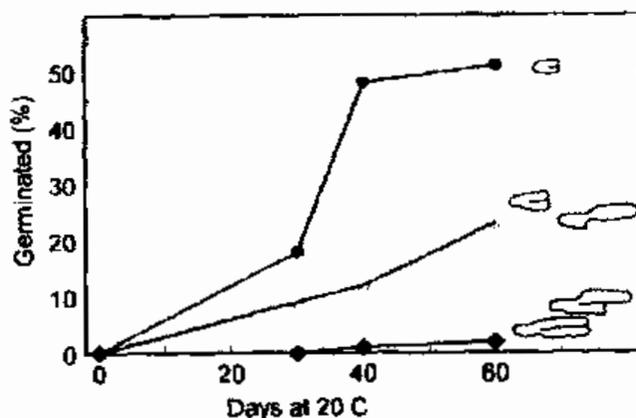
2.2.4.1 Limitaciones del embrión y los cotiledones e inhibidores de la germinación

Bewley y Black (1994) citan que se han estudiado pocos casos referentes a la dormición del embrión, pero que a partir de ellos se puede decir que al parecer son dos los factores involucrados: los cotiledones y los inhibidores de la germinación.

En manzana se ha encontrado que la dormición del embrión se reduce progresivamente a medida que se cortan porciones crecientes de tejido cotiledonario (ver Fig. 2)

Figura 2: Efecto de remoción de partes de los cotiledones en embriones aislados en dormición en manzana

Se extirparon porciones crecientes de los cotiledones en embriones de manzana, que fueron colocados a germinar en condiciones de humedad.

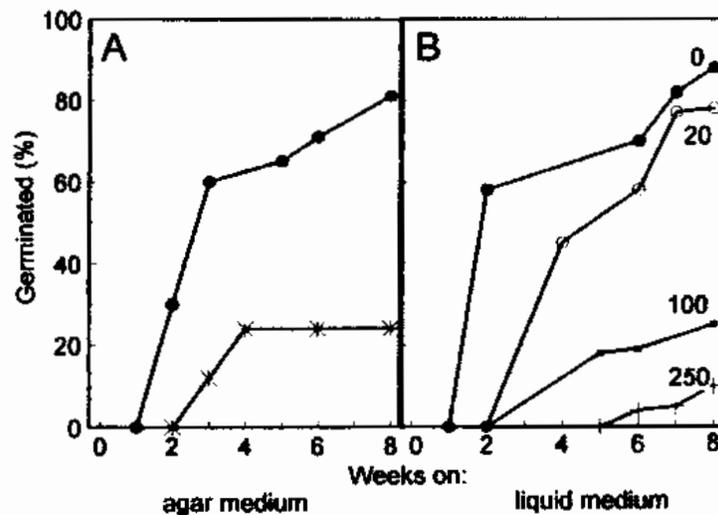


Fuente: Bewley y Black, 1994, adaptado de Thevenot y Côme (1973)

Se ha comprobado que el efecto inhibitorio de los cotiledones desaparece cuando estos están en contacto con el agua, lo que sugiere la presencia de un inhibidor químico en los cotiledones. En cotiledones de manzana existe fuerte evidencia de que este inhibidor químico es el ácido absísico (ABA). En trabajos realizados en manzana y *Taxus baccata* en

los que embriones se han colocado en medio acuoso se consigue la germinación luego de unos días, al tiempo que se detecta la presencia de distintas formas de ABA en el medio acuoso circundante (ver Fig. 3). Por otro lado se ha comprobado que la adición de ABA al medio acuoso reduce fuertemente la eficacia del tratamiento de lavado en el levantamiento de la dormición (Le Page-Devigry, 1973).

Figura 3: Efecto del lavado en embriones de *Taxus Bacata*. En (A) se colocaron embriones en agar líquido (∩) o sólido (∪), y se midió la germinación a 22°C durante varias semanas. En (B) los embriones se colocaron en medio líquido suplementado con ABA en las concentraciones indicadas (en ug/litro)



Fuente: Bewley y Black (1994), adaptado de Le Page-Devigry (1973)

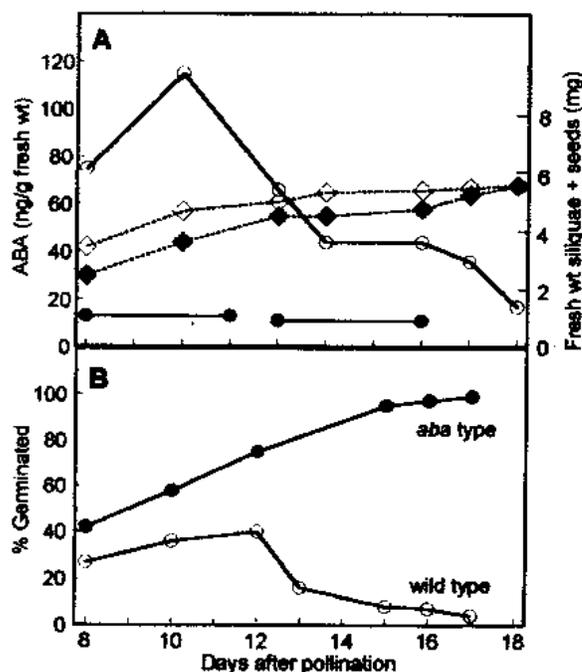
Según Salisbury y Ross (1992), la aplicación de ABA exógeno actúa como un potente inhibidor de la germinación en muchas especies, al tiempo que algunos estudios muestran que el nivel de ABA en semillas intactas decrece cuando se atenúa la dormición a través de diferentes tratamientos (por ejemplo, frío o exposición a la luz).

Algunas de las conclusiones más importantes sobre el papel del ABA se han extraído del estudio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en ABA (Karssen *et al.*, 1983).

En el tipo salvaje de *Arabidopsis*, la dormición se establece a mitad del período de desarrollo de la semilla, pero en los mutantes deficientes

en ABA no aparece dormición en absoluto. En el tipo salvaje, el contenido de ABA de las semillas crece hasta la mitad del período de desarrollo de las semillas, que cuando maduran no contienen prácticamente nada de ABA. A partir de esto se supone que la dormición es iniciada por el ABA durante el desarrollo de la semilla, pero que su presencia no es necesaria después.

Figura 4: Ausencia de inducción de la dormición en mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en ABA. (A) Contenido de ABA en las semillas (círculos) y peso fresco (rombos) de frutas que contienen semillas en diferentes momentos luego de la polinización en *Arabidopsis* de tipo salvaje (símbolos blancos) y en mutantes deficientes en ABA (símbolos oscuros). (B) Germinación luego de 14 días de semillas mutantes y normales en diferentes estados de desarrollo. Se evidencia un menor porcentaje de germinación y una entrada en dormición completa luego de 16 días en las semillas de tipo salvaje.



Fuente: Bewley y Black (1994), adaptado de Karssen et al. (1983)

Cruzamientos genéticos entre el tipo salvaje productor de ABA (Aba) y el mutante no productor (aba) y retrocruzamientos de la F1 (que produce ABA) con el tipo mutante producen en la descendencia semillas que tienen embriones aba/aba (no productor de ABA) rodeados de tejido materno Aba/aba. Otras semillas (producto de los mismos cruzamientos) tienen embriones Aba/aba. Al comparar el comportamiento entre los

diferentes tipos, se halló que la dormición se induce únicamente cuando los embriones tienen el alelo *Aba* (producen ABA), más allá de la constitución genética de los tejidos maternos. Por ello, se concluye que la dormición se da por el ABA producido en el embrión.

No se conoce concretamente la acción del ABA en el establecimiento de la dormición, pero se sabe que esta fitohormona actúa como reguladora de muchos genes vegetales.

2.2.4.2 Las limitaciones dadas por la cubierta

La cubierta de la semilla puede prevenir la germinación a través de uno o varios de los siguientes mecanismos: interferencia en la absorción de agua, actuando como una barrera mecánica para el crecimiento del eje embrionario, a través de la interferencia en el intercambio gaseoso, actuando como bloqueo para la salida de inhibidores o suministrando inhibidores a los embriones. (Bewley y Black, 1994)

2.2.5 Factores que afectan nivel y terminación de la dormición

En concordancia con el concepto actual de que la dormición es un proceso continuo, con períodos de reforzamiento y atenuación, se habla de atenuación y terminación de la dormición, y no de su eliminación. Benech-Arnold *et al.* (2000) distinguen entre los factores que modifican el nivel de dormición en una población de semillas (temperatura, condición hídrica, luz) de los factores que terminan la dormición una vez que su nivel es bajo (luz, temperaturas fluctuantes, concentración de nitratos) (Ver Anexo 10.2).

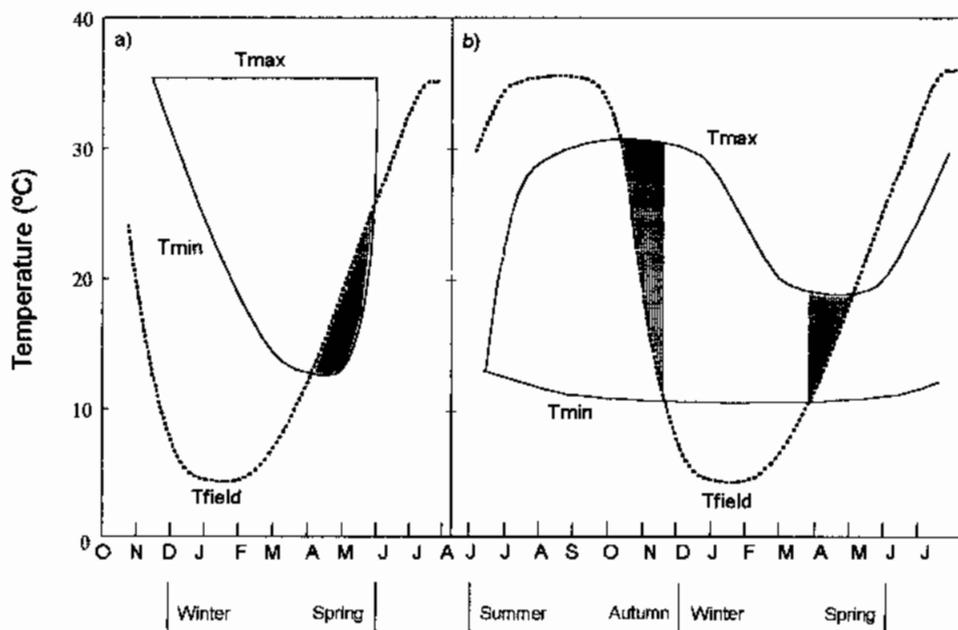
2.2.5.1 Temperatura ambiental

Vegis (1964), introdujo el concepto de que a medida de que la dormición es aliviada en la estación previa a la germinación y al crecimiento de las plántulas, el rango de temperatura para la germinación se amplía hasta hacerse máximo y que, por el contrario, a medida que se induce la dormición el rango de temperaturas para la germinación se

estrecha, hasta que la germinación ya no es posible cuando la dormición es máxima.

Karssen (1982), en concordancia con Vegis, propuso que la periodicidad en la emergencia de plantas anuales es la combinación de la periodicidad estacional de las temperaturas ambientales y de los rangos de temperatura adecuados para la germinación. Por ello, la germinación se da sólo cuando la temperatura ambiental y el rango adecuado para la germinación se solapan (ver Fig. 5).

Figura 5: Solapamiento de temperaturas ambientales y rango de temperatura de germinación en semillas de especies anuales estivales (a) y especies anuales invernales (b)



Fuente: Benech-Arnold (1999), según Karssen (1982)

Según lo propuesto por Karssen, tanto en las especies anuales estivales como en las especies anuales invernales, las semillas al ser liberadas tienen un alto nivel de dormición y no germinan a ninguna temperatura. A medida que la dormición de las semillas es atenuada, el rango de temperatura para la germinación se amplía, pero de manera diferente. En las especies anuales estivales (cuyas semillas son liberadas en otoño, germinando y desarrollándose a partir de la primavera y el

verano) se da por una disminución de la temperatura mínima para la germinación, mientras que en las anuales invernales (cuyas semillas son liberadas en primavera para germinar en otoño/invierno) se da por un aumento de la temperatura máxima. Estos rangos se estrechan luego a medida que se induce la dormición secundaria (Karssen, 1982, Benech-Arnold, 2000).

En especies estivales se ha encontrado este tipo de comportamiento en *Cyperus inflexus* (Baskin y Baskin, 1978a), *Barbarea vulgaris* (Taylorson, 1970), *Polygonum aviculare* (Courtney, 1968; Kruk y Benech-Arnold, 1998), *P. persicaria* (Karssen 1980/81; Bouwmeester y Karssen, 1992) y *Ambrosia artemisiifolia* (Willemsen, 1975; Baskin y Baskin, 1980). En todos estos casos se sugiere que la atenuación o el levantamiento de la dormición es promovida por las bajas temperaturas invernales, mientras que las altas temperaturas estivales reinducen la dormición (secundaria).

El efecto de las bajas temperaturas en la germinación de semillas con humedad relativamente alta ha sido conocido por siglos. Probert (1992) señala que ya en 1664 Evelyn recomendaba que para la siembra primaveral de especies forestales como *Acer* y *Fagus*, las semillas debían ser sembradas en tierra o arena y colocadas a la intemperie durante el invierno. Más recientemente se ha difundido una enorme cantidad de informes sobre el efecto de las bajas temperaturas en el levantamiento de la dormición. Estos están resumidos en revisiones como las de Lewak y Rudnicki (1977) y Nikolaeva (1977).

En el caso de las especies anuales invernales, la dormición debe ser atenuada durante el verano para permitir la germinación en otoño (Karssen, 1982). Según Probert (1992) en este tipo de especies los patrones de dormición son exactamente inversos a los de las estivales. En las anuales invernales las semillas son liberadas en primavera/inicios del verano en estado de dormición completa o relativa. En el caso de dormición relativa, las semillas germinan únicamente en un rango muy estrecho de bajas temperaturas, que no se dan en esa época del año. En el verano se da un proceso de levantamiento o atenuación de la dormición por posmaduración en condiciones secas de altas temperaturas, de manera que que la máxima temperatura para la germinación va aumentando. En el otoño, el descenso de la temperatura ambiental hace

que ésta se solape con el rango temperaturas para la germinación, que entonces puede ocurrir.

Baskin y Baskin (1976) mostraron para las anuales invernales *Stellaria media*, *Valerianella umbilicata* y *Phacelia purshii* que la dormición es levantada cuando las semillas son almacenadas a altas temperaturas, independientemente de si es en condiciones secas o húmedas.

En el invierno la temperatura del suelo estaría por debajo de la temperatura mínima para la germinación (Fig.5), y estas mismas bajas temperaturas inducirían dormición secundaria. En las invernales estrictas el descenso de la temperatura máxima para la germinación sería pronunciado, por lo que la germinación se da sólo en otoño. En las facultativas un descenso menos pronunciado en la temperatura máxima permitiría condiciones de germinación en primavera.

Algunas de las especies invernales facultativas cuyo comportamiento ha sido estudiado son *Lamium amplexicale* (Baskin y Baskin, 1981) y *Aphanes arvensis* (Roberts y Neilson, 1982). En estos casos se ha comprobado que la dormición secundaria no es absoluta, y que las semillas pueden germinar en un estrecho rango de temperaturas durante la primavera.

En especies invernales estrictas como *Arabidopsis thaliana* (Baskin y Baskin, 1983) y *Lamium purpureum* (Baskin y Baskin, 1984), las temperaturas bajas del invierno provocan la inducción de dormición secundaria, evidenciada por un progresivo descenso en la temperatura máxima para la germinación.

2.2.5.2 Luz

En los últimos años, el modelo propuesto por Karssen inicialmente sólo para las temperaturas (la germinación de las semillas ocurre sólo cuando se solapan la temperatura ambiental y el rango en el que se puede dar la germinación, determinado por el nivel de dormición de las semillas) fue extendido a la luz, a partir de investigaciones realizadas por Derkx y Karssen en *Sisymbrium officinale* (Vleeshouwers *et al.*, 1995). Estos trabajos mostraron que los cambios en los niveles de dormición de las semillas implican cambios en los requerimientos de luz: a medida que

la dormición se atenúa, la sensibilidad de las semillas hacia la luz se incrementa, y disminuye a medida que la dormición es inducida.

Por otro lado la terminación de la dormición puede ser disparada por la luz. Según Benech-Arnold *et al.* (2000), desde que se descubrió la acción de los fitocromos se ha acumulado gran cantidad de información. La acción de la luz (su composición espectral, la irradiancia, la duración) puede promover o inhibir la germinación, dependiendo del estado de dormición de las semillas y de otras condiciones ambientales.

2.2.5.3 Hipoxia

Según Benech-Arnold *et al.* (2000), a pesar de que la concentración de oxígeno raramente está por debajo del 19% en el suelo, puede ocurrir que por exceso de humedad la concentración de oxígeno baje considerablemente en la vecindad de una semilla. Según los mismos autores, se ha observado inducción de dormición secundaria a causa de hipoxia en semillas de *Xanthum pensylvanicum*, *Veronica hederaefolia* y *Veronica persica*.

Se ha encontrado que bajas concentraciones de oxígeno previenen la inducción de dormición secundaria a altas temperaturas en *Sisymbrium officinale* (Karssen, 1980/81).

2.2.5.4 Temperaturas fluctuantes

Según Benech-Arnold *et al.* (2000) en muchas especies la salida de la dormición se completa únicamente luego de que las semillas han sido expuestas a temperaturas fluctuantes.

Hace ya años, Steinbauer y Grigsby (1957) encontraron al estudiar 85 especies de 15 familias que en el 80% de estas especies se registraba mayor germinación a temperaturas alternantes en comparación con temperaturas constantes.

Se han señalado (Benech-Arnold *et al.*, 2000) nueve características de los ciclos de temperaturas diurnas que serían responsables de la

actividad estimuladora: el número de ciclos, la amplitud de los mismos, la temperatura más alta, la temperatura más baja, el período transcurrido en la temperatura más baja y el período transcurrido en la más alta, la tasa de calentamiento, la tasa de enfriamiento y la sincronización de ciclos respecto al inicio de la imbibición de las semillas.

2.2.5.5 Nitratos

La presencia de nitratos es según Benech-Arnold (2000) un requerimiento para terminar la dormición en muchas especies. Se ha postulado que se trata de un mecanismo de detección por parte de las semillas de superficies libres de vegetación, desde el momento en que la mineralización de la materia orgánica (que aumenta la concentración de nitratos en el suelo) es mayor en superficies no cubiertas por la vegetación.

Según Karssen *et al.* (1992), aunque los mecanismos por los que los nitratos estimulan la salida de la dormición son en general desconocidos, se cree que podrían actuar a nivel de las membranas celulares.

2.2.5.6 Ambiente gaseoso

Como ya se dijo, el oxígeno es uno de los requerimientos para la germinación de semillas no dormidas, y por otro lado bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) varían el nivel de dormición de las semillas.

Por otro lado, el nivel de CO₂ en el suelo raramente excede el 0.5-1% (Karssen, 1980/81). Según Benech-Arnold *et al.* (2000), en estas concentraciones se ha encontrado que el CO₂ tiene un efecto de ruptura de la dormición en semillas de algunas especies, mientras que concentraciones de hasta 5-8% (en suelos inundados, luego de la descomposición de la materia orgánica) puede inhibir la germinación en algunas especies.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y SEMILLAS

Para los tests de germinación se utilizaron semillas de tres especies diferentes del género *Nothoscordum*: *Nothoscordum* sp. "Punta colorada", *N. nudicaule* y *N. macrostemon*, colectadas a partir de plantas recogidas en la naturaleza por el Profesor Orfeo Crosa (Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía) y cultivadas en invernáculo. Se dispuso de semillas cosechadas en la primavera del año 1998.

Las semillas fueron almacenadas desde noviembre de 1998 en bolsas de papel a temperatura ambiente en el laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía hasta el inicio de los tests de germinación en mayo de 1999.

3.2 TRATAMIENTO PREVIO DE SEMILLAS

Antes de realizar los tests de germinación, las semillas fueron desinfectadas durante tres minutos en una solución al 10% de hipoclorito de sodio comercial.

3.3 TESTS DE GERMINACIÓN SEGÚN ALGORITMO DEL REAL JARDÍN BOTÁNICO DE WAKEHURST PLACE

3.3.1 Temperaturas de germinación

Para los tests de germinación se utilizó el algoritmo del Real Jardín Botánico de Wakehurst Place (Handbook of Seed Technology for Genebanks, 1985), con modificaciones.

Este algoritmo fue creado por este jardín botánico a raíz de que desde su apertura en 1974 trabaja fundamentalmente con especies silvestres, por lo que no se conocen las mejores temperaturas de germinación de las semillas de las especies que llegan al lugar.

La realización de ensayos de germinación a temperaturas diferentes llevó a la elaboración de algoritmos basados en el uso de temperaturas contrastantes -uso de temperaturas diferentes en pasos sucesivos- hasta llegar a determinar las mejores condiciones térmicas de germinación de las semillas. Se comienza a trabajar con dos temperaturas contrastantes en una primera instancia, y los pasos (pruebas de germinación) subsiguientes dependen de los resultados obtenidos en primera instancia.

3.3.2 Algoritmo para liliáceas

El Real Jardín Botánico de Wakehurst Place ha elaborado algoritmos específicos por familias vegetales.

En el caso de las liliáceas, el algoritmo recomienda un primer paso consistente en realizar tests de germinación a 11°C y 26°C constantes, con 12 horas de luz diarias. Si no se consigue una germinación total a ninguna de esas temperaturas (se considera germinación total cuando es mayor al 85%), se debe realizar nuevos ensayos, a temperatura más extrema respecto al tratamiento más exitoso. Por ejemplo, si se logra la mayor germinación (pero inferior al 85%) a 11°C, se debe realizar tests a temperaturas más bajas. En las liliáceas se recomienda 6°C (con 12 horas de luz diarias) en caso de haber sido 11°C la temperatura con mejor resultado en primera instancia.

Si no se consigue germinación total en el primer paso del algoritmo después de haber realizado las variaciones de temperatura requeridas, se indica un tratamiento de preenfriado ("chilling") de una muestra de semillas a una temperatura entre 2 y 6°C durante ocho semanas, para después realizar pruebas de germinación a la temperatura constante más exitosa del primer paso del algoritmo.

3.4 TESTS DE GERMINACIÓN REALIZADOS EN EL TRABAJO

3.4.1 Modificaciones del algoritmo

Al no haber mayores limitantes en el número de semillas de las diferentes especies, se decidió utilizar simultáneamente varias de las temperaturas recomendadas en el algoritmo para Liliáceas (ver 3.3.2), en

las pruebas de germinación iniciadas el 26 de mayo de 1999. En esa fecha se colocan a germinar semillas de *Nothoscordum* sp. "Punta Colorada", *N. macrostemon* y *N. nudicaule* a cuatro regímenes de temperatura diferentes: 1) Temperatura ambiente en mesa de laboratorio; 2) 6°C constantes, sin luz (en heladera doméstica); 3) 11°C constantes, 12 horas de luz diarias; 4) 26°C constantes, con luz variable por las condiciones del equipamiento utilizado: una vitrina de fabricación casera cuya fuente de luz (una lámpara de filamento) es a la vez única fuente de calor (el encendido y apagado se regula por un termostato), por lo que las horas diarias de luz dependen en última instancia de las necesidades de conservar la temperatura constante (en este caso 26°C).

Para el segundo tratamiento (6°C) se utilizó una heladera doméstica, donde se midió la temperatura al inicio y durante las pruebas de germinación. En el caso del tercer tratamiento (11°C) se utilizó una cámara de crecimiento de plantas (Biotronette-Plant Growth Chamber) de Lab-Line Instruments, Inc., con control de temperatura y luz.

En cada uno de los tratamientos se sembraron 60 semillas de cada uno de los cinco grupos (a no ser a temperatura ambiente, en el que se utilizaron 40 semillas), en dos placas de Petri con papel humedecido con una solución de agua destilada con Benomyl (10 ppm) para contrarrestar la proliferación de hongos.

A modo de resumen, la tabla siguiente muestra los tratamientos aplicados a los materiales.

Cuadro1: Tratamientos utilizados

<i>Tratamiento 1 (control)</i>	Temperatura ambiente en mesa de laboratorio, con luz natural.
<i>Tratamiento 2</i>	Temperatura 6°C constantes, sin luz (por el tipo de equipamiento).
<i>Tratamiento 3</i>	Temperatura 11°C constantes, 12 horas diarias de luz.
<i>Tratamiento 4</i>	Temperatura 26°C constantes, con luz variable. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ En el día 58 de los tests, al no registrarse germinación en ninguna de las especies a 26°C, las semillas fueron colocadas a temperatura ambiente, en mesa de laboratorio.

3.5 MEDICIÓN DE LA GERMINACIÓN

En todos los casos se midió la cantidad de semillas germinadas a lo largo de los tests, tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). La medición se realizó hasta que se registró una detención en el proceso de germinación durante unas dos semanas.

Se consideró que las semillas germinaban cuando emergía una parte del eje embrionario, en este caso la radícula. Como ya se dijo (sección 2.1), cuando emerge una parte del eje embrionario la germinación en sí ya terminó, pero se adoptó este criterio (que es el utilizado normalmente en todas las pruebas de germinación) porque no se contaba en este caso con medios adecuados para medir el comienzo (cuando las semillas comienzan a absorber agua) y el fin de la germinación (cuando comienza la elongación del eje embrionario).

La tasa de germinación se midió como la inversa del tiempo necesario para la germinación del 50% de las semillas ($1/T_{50\%}$).

Por otro lado, las semillas que fueron atacadas por hongos durante las pruebas de germinación fueron retiradas de las placas sólo cuando el micelio se extendía de manera de poder afectar semillas sanas aún no germinadas.

3.6 INSTRUMENTOS ESTADÍSTICOS

La comparación de los porcentajes de germinación se realizó utilizando un modelo lineal generalizado con una función logit según Mc Cullagh *et al.* (1993). En los análisis se utilizó el procedimiento GENMOD de SAS (1993).

Por otro lado, se calcularon los intervalos de confianza para los porcentajes finales de germinación según la tabla Z (ver Anexo 10.4)

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los tests de germinación realizados con diferentes tratamientos de temperatura se analizaron desde distintos puntos de vista. Por un lado se evaluó el comportamiento de cada especie en diferentes condiciones de temperatura, tomando en cuenta los porcentajes finales de germinación en cada caso. Por otro lado se analizó cómo se dio la germinación para cada especie a lo largo de las pruebas, tomando en cuenta la tasa de germinación.

De acuerdo al criterio utilizado para terminar las pruebas de germinación (ver sección 2.5) y debido a que las semillas colocadas a 26°C no germinaron en ninguna de las especies estudiadas a los 58 días de iniciados los tests (23 de julio de 1999), estas fueron retiradas del tratamiento en esa fecha.

4.1 GERMINACIÓN POR ESPECIE

4.1.1 *Nothoscordum* sp. "Punta Colorada"

Cuadro 2: Germinación de semillas de *Nothoscordum* sp. "Punta Colorada"

	Temp. Ambiente	6°C	11°C	26°C ⁽²⁾	26°C- Ambiente ⁽³⁾
Germinación (%) ⁽¹⁾	82,5	63,3 ^b	43,3 ^c	0 ^d	35,0

⁽¹⁾ La duración de los tests de germinación fue de 111 días, desde el 26/5/99 al 14/9/99. Se utilizaron 60 semillas en cada caso, a no ser en el primer tratamiento (temperatura ambiente), en el que se utilizaron 40 semillas.

⁽²⁾ Germinación registrada hasta el día 58 de los tests.

⁽³⁾ Germinación registrada desde el día 58 hasta el fin de los tests.

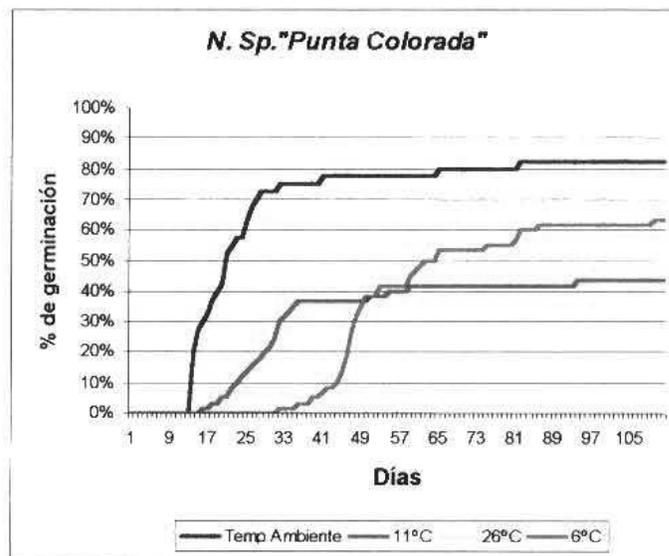
La germinación en *Nothoscordum* sp. "Punta Colorada" fue máxima a temperatura ambiente, seguida por las colocadas a 4°C y las colocadas a 11°C constantes (ver Cuadro 2)

Es de hacer notar además que en el caso de las semillas colocadas a temperatura ambiente la germinación se dio mucho más rápidamente, con 75% de semillas germinadas ya en el día 31 de los tests.

En el caso de las semillas de *N. sp.* "Punta Colorada" se incluyen los resultados de germinación de las semillas quitadas del tratamiento de 26°C y colocadas a temperatura ambiente a partir del día 58 de las pruebas. En el caso de las demás especies no se registró germinación luego de quitar las semillas de este tratamiento.

Desde el punto de vista estadístico se registraron diferencias significativas entre los tratamientos 1 (temperatura ambiente) y 2 (6°C constantes) y entre el 2 y el 3 (11°C constantes), mientras que se dieron diferencias muy significativas en los demás casos (1vs.3, 1vs.4, 2vs.4 y 3vs.4). (ver Anexo 10.3)

Figura 6: Curvas de germinación de semillas de *N. sp.* "Punta Colorada"



Respecto a las tasas de germinación, la mayor ($1/T=0,05$) se obtuvo a temperatura ambiente, mientras que en el tratamiento de 6°C constantes la tasa fue de 0,0164. En este mismo tratamiento la germinación comenzó luego de 31 días de iniciadas las pruebas, mientras que a temperatura ambiente comenzó a los 12 días (ver Figura 6).

4.1.2 *Nothoscordum macrostemon*

Cuadro 3: Germinación de semillas de *Nothoscordum macrostemon*

	Temp. Ambiente	6°C	11°C	26°C	26°C-ambiente
Germinación (%) ⁽¹⁾	17,5 ^a	91,7 ^b	86,7 ^b	0 ^c	0 ^c

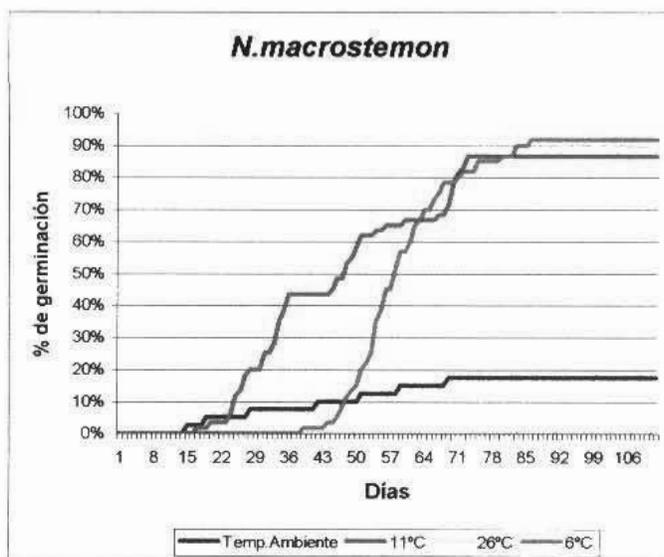
⁽¹⁾ La duración de los tests de germinación fue de 111 días, desde el 26/5/99 al 14/9/99. Se utilizaron 60 semillas en cada caso, a no ser en el primer tratamiento (temperatura ambiente), en el que se utilizaron 40 semillas.

Estadísticamente se registraron diferencias significativas entre todos los tratamientos excepto entre el 2 (6°C constantes) y el 3 (11°C constantes). En este último caso no se dieron diferencias significativas (ver Anexo 10.3)

Los niveles más altos de germinación se dieron a 11°C constantes y a 6°C constantes (ver Cuadro 3), sin que se registraran diferencias significativas entre estos dos tratamientos (ver análisis estadístico en anexo 10.3).

No obstante, el comportamiento fue muy diferente en estas dos condiciones de temperatura, ya que en el día 45 de los tests, a 11°C constantes se había llegado ya a un 48,3% de las semillas germinadas, mientras que en esa misma fecha a 6°C había germinado sólo 5% de las semillas.

Figura 7: Curvas de germinación de semillas de *N. macrostemon*



En este caso la tasa de germinación para 50% de las semillas fue de 0,021 para el tratamiento de 11°C constantes y de 0,017 para el tratamiento de 6°C constantes (ver Figura 7). Al igual que en el caso de las semillas de *N. sp.* "Punta Colorada", la germinación comenzó mucho más tardíamente (día 38 desde el inicio de las pruebas) a 6°C, respecto al inicio a temperatura ambiente (día 14) y a 11°C (día 16 desde el inicio de los tests).

4.1.3 *Nothoscordum nudicaule*

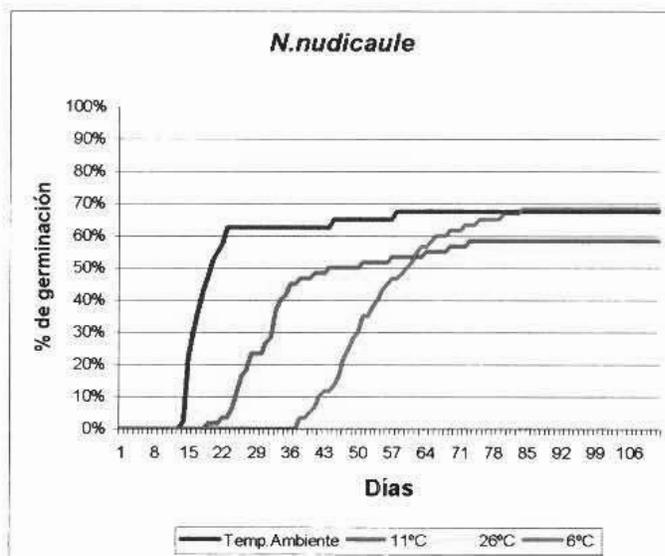
Cuadro 4: Germinación de semillas de *Nothoscordum nudicaule*

	Temp. Ambiente	6°C	11°C	26°C
Germinación (%) ⁽¹⁾	67,5 ^a	68,3 ^a	58,3 ^a	0 ^b

⁽¹⁾ La duración de los tests de germinación fue de 111 días, desde el 26/5/99 al 14/9/99. Se utilizaron 60 semillas en cada caso, a no ser en el primer tratamiento (temperatura ambiente), en el que se utilizaron 40 semillas.

Los niveles más altos de germinación se lograron a temperatura ambiente y a 6°C. A 11°C germinó 58,3% de las semillas y a 26°C constantes no se registró germinación (ver Cuadro 4). No obstante, desde el punto de vista estadístico (ver Anexo 10.3) no se registraron diferencias significativas en el nivel de germinación en los primeros tres tratamientos (temperatura ambiente, 6°C y 11°C).

Figura 8: Curvas de germinación de semillas de *N. nudicaule*

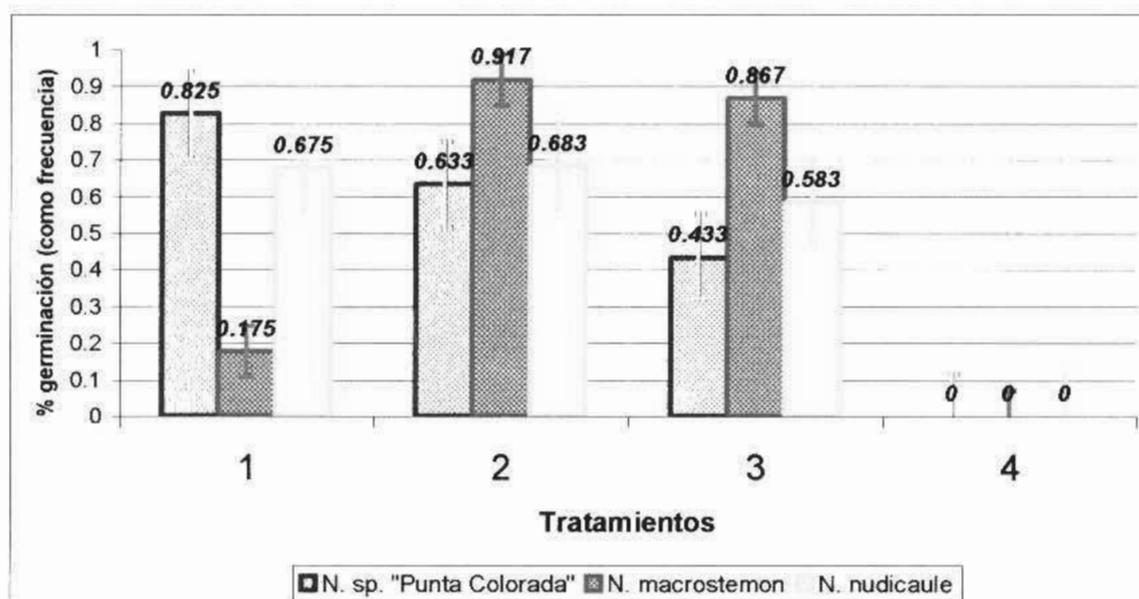


En el caso de *N. nudicaule*, las tasas de germinación (para 50% de semillas germinadas) fueron de 0,053 para el primer tratamiento (temperatura ambiente), 0,017 para 6°C constantes y de 0,023 para 11°C constantes. Al igual que en las demás especies, en el tratamiento más frío la germinación comenzó más tardíamente (día 37 desde el inicio de las pruebas, mientras que ese tiempo fue de 13 días para el primer tratamiento y de 18 días para el tratamiento de 11°C constantes) (ver Figura 8).

Al igual que en el caso de *Nothoscordum* sp. "Punta Colorada", la germinación se dio mucho más tempranamente a temperatura ambiente respecto a las condiciones más frías (6°C), a pesar de que el nivel de germinación final haya sido similar.

4.2 COMPARACIÓN ENTRE ESPECIES SEGÚN TRATAMIENTO

Figura 9: Porcentajes finales de germinación según tratamiento (tres especies)



Tratamientos:

- 1 Temperatura ambiente (mesa de laboratorio)
- 2 6°C constante
- 3 11°C constante
- 4 26°C constante

Se calcularon los intervalos de confianza para los porcentajes de germinación de las semillas de cada una de las especies utilizadas y para cada uno de los cuatro tratamientos (ver Anexo 10.4).

Según este análisis, no se registraron diferencias en los porcentajes de germinación de las semillas de *N. sp. "Punta Colorada"* y *N. nudicaule* en ninguno de los cuatro tratamientos. Por otro lado, estas dos especies

tuvieron niveles de germinación claramente diferentes al de *N. macrostemon* en todos los tratamientos a no ser el de 26°C constantes, en el que no se registró germinación en ninguna de las especies consideradas hasta el día 58 de las pruebas. Como ya se dijo anteriormente, en el caso de *N. sp.* "Punta Colorada" se registró germinación cuando las semillas colocadas inicialmente a 26°C fueron puestas a temperatura ambiente, hasta el fin de las pruebas.

5. DISCUSIÓN

El modelo de Karssen (Karssen, 1982) sobre germinación y dormición de semillas está referido a especies anuales y no a perennes, como las utilizadas en este trabajo (ver sección 2.5.1.1). Según Benech-Arnold (com. pers.) es de esperar que el comportamiento de las semillas en especies anuales y perennes respecto a la dormición sea similar.

En estos estudios se dio germinación en las semillas de todas las especies, a niveles diferentes según las condiciones térmicas. De acuerdo a lo considerado en la sección 2.2.5, cuando las semillas se encuentran en un estado de dormición absoluta no germinan en ninguna condición ambiental (Vegis, 1964; Karssen, 1982; Vleeshouwers *et al.*, 1995; Benech-Arnold *et al.*, 2000). Por lo tanto se puede considerar que en ninguna de las especies estudiadas las semillas estaban en condiciones de dormición absoluta.

No sabemos si las semillas estudiadas tenían ausencia de dormición (cuando el rango térmico para la germinación es máximo, ver Sección 2.2.5.1) o se encontraban en un estado de dormición relativa (cuando el rango de temperaturas para la germinación no es el máximo posible). Para distinguir entre ambas situaciones habría que realizar estudios complementarios.

N. sp. "Punta Colorada" tuvo su nivel más alto de germinación a temperatura ambiente (que fue el único tratamiento con temperatura no constante), seguido por los tratamientos de 6°C constantes y 11°C constantes. Esto coincide con observaciones empíricas anteriores (O.Crosa, com.pers.) en cuanto a que este material tiene un alto porcentaje de germinación a temperatura ambiente. La mayor germinación con temperaturas fluctuantes podría estar relacionada, en esta especie, al papel de las temperaturas alternantes en la terminación de la dormición (Sección 2.2.5.4).

N. macrostemon tuvo su germinación más alta en las condiciones más frías, a 6°C y 11°C constantes (de aproximadamente 90% en ambos casos), sin que se registraran diferencias significativas entre los dos tratamientos. En este caso no consideramos que el frío haya actuado

como factor atenuador de la dormición por consideraciones que haremos más adelante en este capítulo.

N. nudicaule tuvo un nivel similar de germinación en todos los tratamientos excepto a 26°C constantes (en el que no se registró germinación alguna). En ninguno de los demás tratamientos el porcentaje final de germinación superó el 70%. Estos resultados no permiten extraer conclusiones acerca de las condiciones térmicas para una alta germinación en esta especie.

Estas especies son invernales, y según el modelo propuesto originalmente por Karssen (1982), en las semillas de este tipo de especies la dormición se eliminaría o atenuaría durante el verano, a causa de las altas temperaturas. Se ha comprobado en varias especies de ciclo invernal (*Lamium amplexicale*, *Aphanes arvensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Lamium purpureum*) que el frío no atenúa la dormición, sino que induce dormición secundaria (ver sección 2.2.5.1). Por ello, el hecho de que las semillas de *N. macrostemon* tengan una buena germinación a temperaturas relativamente bajas no se debería a que las bajas temperaturas eliminan o atenúan la dormición en este caso, sino a que esta especie tendría temperaturas óptimas de germinación más bajas que las otras dos especies estudiadas, *N. sp.* "Punta Colorada" y *N. nudicaule*. (Benech-Arnold, com.pers.)

Además, este mismo factor (las bajas temperaturas) actúa a escalas diferentes y con diferentes tiempos en la germinación y en la dormición. En el caso de la atenuación de la dormición, las bajas temperaturas ("chilling") son muy efectivas en muchas especies estivales (y no en invernales, como es este caso), pero por lo general es necesario un período prolongado de tiempo para atenuar la dormición (por lo general ocho semanas o más), y luego las semillas deben ser puestas en condiciones de temperatura más altas para poder germinar (Benech-Arnold *et al.*, 1995; Benech-Arnold *et al.*, 2000, Benech-Arnold, com.pers.). En el caso de *N. macrostemon*, la germinación en condiciones frías comenzó antes de transcurrido un plazo tan largo y además se alcanzó un alto nivel de germinación a la misma baja temperatura. Por ello, no sería este un caso de atenuación de la dormición, sino que esta especie tendría un rango óptimo de temperaturas de germinación más bajas que

Nothoscordum sp. "Punta Colorada", que alcanzó su mayor nivel de germinación a temperatura ambiente.

Para obtener mayor información en semillas de estas especies se podría realizar pruebas de germinación a diferentes regímenes térmicos durante un año, con colocación de semillas a germinar en intervalos regulares. Si las semillas son mantenidas hasta la siembra en condiciones ambientales naturales (desde el punto de vista térmico) se podría determinar tanto la entrada como la salida de la dormición (momento del año, condiciones de temperatura) como las mejores condiciones térmicas para la germinación, en cada época.

La dormición no es un fenómeno de "todo o nada" sino un proceso cuya profundidad puede evaluarse a través de la amplitud de las condiciones térmicas de germinación: a medida que se atenúa la dormición, las semillas tienen un rango de temperaturas más amplio de germinación y, por el contrario, a medida que se refuerza la dormición el rango de temperaturas para la germinación se estrecha hasta que las semillas no germinan a ninguna temperatura, cuando la dormición es máxima (Vegis, 1964; Karssen, 1982; Baskin y Baskin, 1978, 1980, 1981, 1985; Benech-Arnold *et al.*, 1995, 2000; Vleeshouwers *et al.*, 1995).

El hecho de que se de germinación a ciertas temperaturas pero no a otras podría atribuirse a que las semillas de las tres especies estudiadas tienen diferentes rangos térmicos de germinación. Otra interpretación posible es que las diferencias podrían deberse a que alguna o algunas de las semillas de las especies estudiadas tenían aún un grado de dormición, por lo que la germinación se dio en ellas en un rango más estrecho de temperaturas.

Otros aspectos de la ecofisiología de la germinación y de la dormición de estas especies pueden ser estudiados en trabajos posteriores. Es posible que se pueda atenuar o eliminar la dormición en las semillas recién cosechadas, utilizando calor (temperaturas mayores a 30°C) en condiciones secas (Probert, 1992; Benech-Arnold, com. pers.). Este tipo de tratamiento ha sido exitoso en otras especies de ciclo invernal (Baskin y Baskin, 1976). Por otro lado se puede evaluar el nivel de dormición en semillas recién cosechadas en primavera, realizando tests de germinación en primavera/verano a temperaturas bajas. De esta

manera se podría comprobar si las semillas están o no en un estado de dormición absoluta al momento de ser liberadas. Se puede además llegar a conocer más en profundidad el comportamiento de estas especies utilizando temperaturas alternantes en lugar de temperaturas constantes, ya que se ha comprobado en muchas especies que se obtienen mayores niveles de germinación con temperaturas alternantes respecto a las temperaturas constantes (Steinbauer *et al.*, 1957, Benech-Arnold *et al.*, 2000). Asimismo podría estudiarse la eventual entrada -en invierno- de las semillas en dormición secundaria, debido a las bajas temperaturas, como ocurre con otras especies de ciclo invernal (Baskin y Baskin, 1983, 1984), aunque observaciones empíricas anteriores (O. Crosa, com pers.) indican que las semillas de estas especies germinan a lo largo de todo el invierno para dejar de hacerlo recién a fines de primavera e inicio del verano.

En este estudio hemos visto que en la germinación de semillas existen diferencias entre las tres especies estudiadas. ¿En qué medida estas diferencias se deben a adaptaciones ecológicas de cada una de ellas? Esta y otras preguntas requieren de estudios complementarios que arrojen más luz sobre los ciclos de dormición, las temperaturas óptimas de germinación en una época dada y también en diferentes momentos del año.

6. CONCLUSIONES

Mediante los tests de germinación realizados en diferentes condiciones térmicas se comprobó que las semillas de las diferentes especies tienen requerimientos de temperatura diferentes para la germinación, lo que podría estar asociado a adaptaciones ambientales diferentes.

Las semillas de *N. macrostemon* tuvieron los mayores niveles de germinación a las temperaturas más bajas entre las utilizadas (aproximadamente 90% a 6°C constantes y 11°C constantes), pero muy baja a temperatura ambiente y nula a 26°C. Las semillas no estaban en dormición absoluta porque en tal caso no habrían germinado en ningún tratamiento.

En el caso de *N. sp.* "Punta Colorada" se registró un alto nivel de germinación a temperatura ambiente (superior al 80%) y menor a 6°C y 11°C constantes. Por lo tanto se puede concluir que las semillas no se encontraban en dormición, a pesar del bajo nivel de germinación en ciertas condiciones térmicas.

En el caso de *N. nudicaule*, en cambio, sólo puede concluirse que las semillas no estaban en dormición absoluta, porque sí se dio germinación en todos los tratamientos a no ser a 26°C, pero el hecho de no haber alcanzado el 70% de germinación en ningún tratamiento podría deberse tanto a la existencia de dormición como a que las condiciones térmicas más adecuadas para la germinación en este caso no se encontraban entre los tratamientos utilizados.

En el presente estudio no se registró en el tratamiento de 26°C constantes germinación alguna de las semillas de ninguna de las especies utilizadas, pero las semillas de los mismos lotes sí tuvieron germinación a otras temperaturas.

7. RESUMEN

La germinación y la dormición de semillas son fenómenos biológicos cuya comprensión es de gran importancia para conocer el comportamiento y la adaptación evolutiva de las especies vegetales silvestres, para el manejo de las malezas de muchos cultivos y para la resolución de algunos problemas que se presentan en cultivos de importancia para el hombre, como la pregerminación en trigo, o la falta de sincronización en la emergencia.

En este trabajo se estudió la germinación de tres especies distintas del género *Nothoscordum*, (*N. sp.* "Punta Colorada", *Nothoscordum macrostemon* y *Nothoscordum nudicaule*) a raíz de la detección de bajos niveles de germinación en una de ellas, *N. macrostemon*, en trabajos sobre Biosistemática realizados en la Cátedra de Genética de la Facultad de Agronomía.

Se realizaron pruebas de germinación a diferentes temperaturas constantes y a temperatura ambiente en mesa de laboratorio, con el fin de detectar diferencias en los niveles de germinación y tratamientos térmicos óptimos (entre los utilizados) para las semillas de las diferentes especies.

Los tratamientos térmicos para las pruebas de germinación fueron definidos a partir de algoritmos –pruebas de germinación a temperaturas contrastantes, en pasos sucesivos- creados por el Real Jardín Botánico de Wakehurst Place (Londres) para determinar las mejores condiciones térmicas de germinación de semillas de especies silvestres.

Las pruebas de germinación se realizaron entre mayo y setiembre de 1999 con semillas de las tres especies, utilizando semillas cosechadas en 1998, y se midió en todos los casos la germinación a lo largo de las pruebas y el porcentaje final de germinación.

Se registraron diferencias significativas en la germinación dentro de cada especie según los tratamientos, y también entre especies en cada tratamiento.

En el caso de *N. sp* "Punta Colorada" los más altos niveles de germinación se alcanzaron a temperatura ambiente. Las semillas de *N. macrostemon* tuvieron la germinación más alta en los tratamientos más fríos (6°C y 11°C constantes) y *N. nudicaule* tuvo un nivel de germinación similar en todos los tratamientos. A 26°C no se registró germinación en las semillas de ninguna de las especies estudiadas.

A través de los resultados se pudo comprobar que las semillas de cada especie tienen diferentes requerimientos de temperatura para la germinación, y que el hecho de que no registre germinación a un régimen determinado de temperatura no quiere decir que las semillas se encuentren en dormición absoluta. Estos resultados coinciden con el concepto más reciente de la dormición, que sostiene justamente esto: el hecho de que no registre germinación no implica necesariamente que exista dormición absoluta, sino quizá que las semillas no cuentan con las condiciones más adecuadas para la germinación.

Estudios posteriores sobre la germinación y la dormición de semillas de estas especies, en diferentes épocas del año y considerando otras condiciones de temperatura podrán arrojar más luz sobre su comportamiento en la naturaleza y su adaptación a los ambientes en que viven.

8. SUMMARY

The comprehension of seed germination and dormancy is of great importance in the understanding of the behavior and evolutionary adaptation of wild plant species, weed management, and the solution of many problems which appear in important crops, such as pregermination in wheat, or asynchrony in plant emergence.

Seed germination of three species of *Nothoscordum* (*N. sp.* "Punta Colorada", *N. macrostemon*, and *N. nudicaule*) was studied in the present work. This study was motivated by the low levels of germination detected in *N. macrostemon*, during biosystematic studies carried out by the Department of Genetics of the Faculty of Agronomy.

Germination trials at different constant temperatures and room temperature were carried out in order to detect differences in the levels of germination, and identify optimal thermal conditions (among those assayed) for seed of the different species analyzed.

Temperature treatments for germination tests were set based on the algorithms - germination trials at contrasting temperatures in successive steps- created by the Royal Botanic Gardens at Wakehurst (London) to determine the best temperature conditions for the germination of wild species.

Germination tests were performed between May and September 1999 using seeds harvested in 1998. Germination during the test and final germination percentages were recorded in all cases.

Significant differences in germination were detected within all species according to treatments and between species in each treatment.

For *N. sp.* "Punta Colorada" highest germination levels were reached at room temperature. Germination of *N. macrostemon* seeds was highest in the coldest treatments (6°C and 11°C), while *N. nudicaule* showed similar germination levels at all treatments. At 26°C no germination was recorded for any of the species analyzed.

Results showed that temperature requirements for germination were different for the different species, and that the fact that no germination at all is detected at a given temperature regime does not imply that that seeds are in absolute dormancy. These results agree with the present

concept of seed dormancy: the fact that no germination is observed does not mean that there is absolute dormancy, but that seeds are not in the most adequate conditions for their germination.

Further studies on seed dormancy and germination of these species, in different times of the year, and considering other temperature conditions may shed more light on their behavior in Nature and their adaptation to their specific environments

9. BIBLIOGRAFÍA

1. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C., 1976. High temperature requirement for afterripening in seeds of winter annuals. *New Phytologist* 1976 (77): 619-624
2. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C., 1978. Seasonal changes in the germination response of *Cyperus inflexus* seed to temperature and their ecological significance. *Botanical Gazette*, 139: 321-235
3. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C., 1980. Ecophysiology of secondary dormancy in seeds of *Ambrosia artemisiifolia*. *Ecology* 61: 475-480
4. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C., 1981. Seasonal changes in the germination responses of buried *Lamium amplexicale* seeds. *Weed Research* 21, 299-306
5. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. 1983. Seasonal changes in the germination responses of buried seeds of *Arabidopsis thaliana* and ecological interpretation. *Botanical Gazette* 144: 540-543
6. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. 1984. Role of temperature in regulating timing of germination in soil seed reserves of *Lamium purpureum* L. *Weed Research* 24: 341-349
7. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. 1985. The Annual Dormancy Cycle in Buried Weed Seeds. A continuum. *Bioscience*, 35 (8), 492-498
8. BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C., 1987. Temperature requirement for afterripening in buried seeds of four summer annuals weeds. *Weed Research* 27: 385-389.
9. BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M., 1988. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. *American Journal of Botany*, 75: 286-305
10. BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M.. 1998. Ecology of seed dormancy and germination in grasses. In Population biology of grasses. Cheplick,

- G.P., Bradshaw, A.D. (eds.). Cambridge. Cambridge University Press. pp 30-83.
11. BENECH-ARNOLD, R.L.; SÁNCHEZ, R.A., 1995. Modeling Weed Seed Germination. *In* Seed Development and Germination. Kigel, J. y Galili, G. (eds.). Nueva York. Marcel Dekker. pp 545-566.
 12. BENECH-ARNOLD, R.L.; SÁNCHEZ R.A.; FORCELLA, F.; KRUK, B.C.; GHERSA, C.M., 2000 Environmental control of dormancy in weed soil seed banks. *Field Crops Research*. 2000 (3883): 1-18
 13. BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1994 *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2ª. ed. Nueva York. Plenum Press. 445 p.
 14. BIERHUIZEN, J.F. y WAGENVOORT, W.A., 1974. Some aspects of seed germination in vegetables. I. The determination and application of heat sums and minimum temperature for germination. *Scientiae Horticulturae* 2: 213-219
 15. BOUWMEESTER, H.J., 1990. The effect of environmental conditions on the seasonal dormancy pattern and germination of weed seeds. Tesis Ph.D.. Agricultural University, Wageningen, Holanda. 157 p.
 16. BOUWMEESTER, H.J., KARSSSEN, C.M., 1992. The dual role of temperature in the regulation of the seasonal changes in dormancy and germination of seeds of *Polygonum persicaria* L. *Oecologia* 1992 (90): 88-94
 17. COURTNEY, A.D., 1968. Seed dormancy and field emergency in *Polygonum aviculare*. *Journal of Applied Ecology* 1968 (5): 675-684
 18. FENNER, M. 1985. *Seed Ecology*. Londres, Chapman & Hall. 151 p.
 19. FENNER, M. 1992. *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford. CAB International. 373 p.
 20. GROOT, S.P.C., and KARSSSEN, C.M., 1992. Dormancy and Germination of Abscisic Acid-Deficient Tomato Seeds. Studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiol*. 1992 (99): 952-958

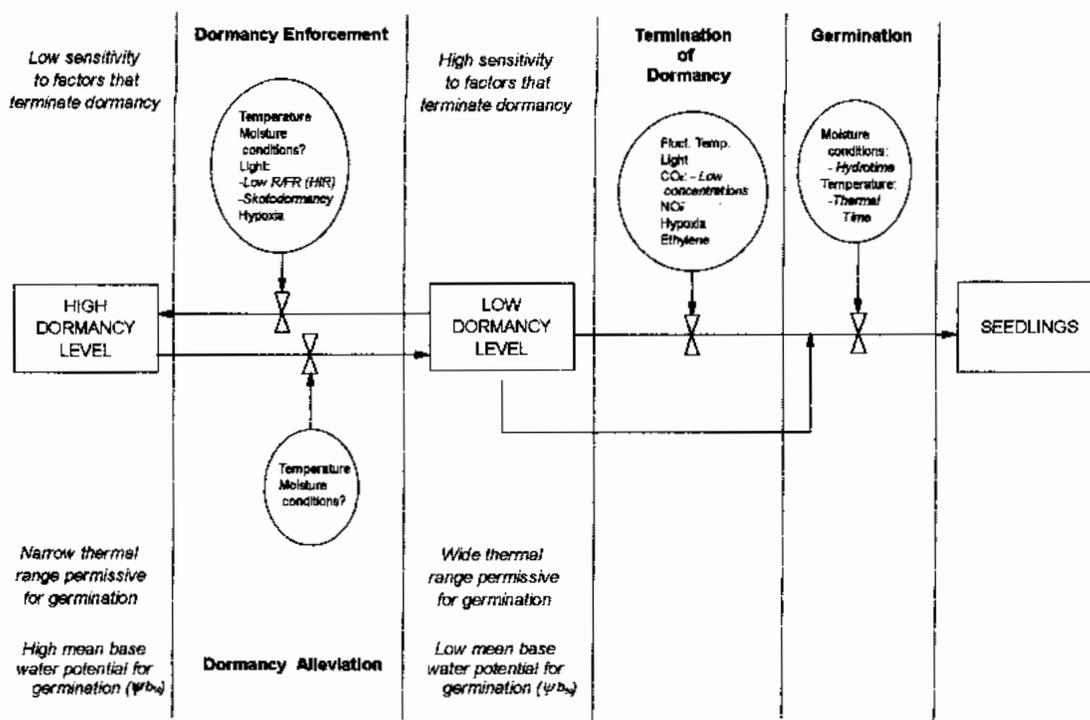
21. GUMMERSON, R.J. 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany*. 37: 729-741.
22. HARPER, J.L. 1959. The Ecological significance of dormancy and its importance in weed control. *International Congress of Crop Protection (4th, 1957, Proceedings)*, Hamburg. Selbstverlag des IV Internationalen Pflanzenschutz-Kongresses, Braunschweig. v.1, pp. 415-420
23. HOBSON, G.E. 1981. Changes in mitochondrial composition and behavior in relation to dormancy. *Annals of Applied Biology*, 98: 541-544
24. INTERNATIONAL BOARD OF PLANT GENETIC RESOURCES. 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volume II*. Roma. 667p. (Handbooks for Genebanks: N°3)
25. KARSSSEN, C.M., 1982. Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. *In* *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Khan, A. (Ed.). Amsterdam. Elsevier Biomedical Press, pp. 243-270
26. KARSSSEN, C.M., 1980/81. Patterns of change in dormancy during burial of seeds in soil. *Israel Journal of Botany* 29: 65-73
27. KARSSSEN, C.M., BRINKHORST-VAN DER SWAN, D.L.C., BREEKLAND, A.E.; KOORNEEF, M.. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 1983 (157): 158-165
28. KARSSSEN, C.M.; HILLHORST, H.W.M., 1992. Effect of chemical environment on seed germination. *In* *Seeds. The Ecology of regeneration in plant communities*. Fenner, M. (ed.) CAB International, Wallingford. pp 327-348

29. KIGEL, J.; GALILI, G. 1995. Seed development and germination. Nueva York. Marcel Dekker, Inc. 853 p.
30. KRUK, B.C.; BENECH ARNOLD, R.L., 1998. Functional and quantitative analysis of seed thermal responses in prostrate knotweed (*Polygonum aviculare*) and common purslane (*Portulaca oleracea*). *Weed Science*. 46: 83-90.
31. LEWAK, S.; RUDNICKI, R.M. (1977) Afterripening in cold-requiring seeds. *In*: Khan, A.A. (ed.), *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. North Holland Publishing, Amsterdam, pp. 193-217
32. LE PAGE-DEVIGRY, M.T.. 1973. Étude en culture *in vitro* de la dormance embryonnaire chez *Taxus baccata* L. *Biologia Plantarum* 15 (4): 264-269
33. MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975 *The germination of seeds*. 2^a ed. Oxford, Pergamon Press Ltd.. 192 p.
34. Mc CULLAGH, P.; NELDER, J.A. 1989. *Generalized Linear Models*. London. Chapman and Hall
35. NIKOLAEVA. M.G. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. *In* *The Physiology and Biochemistry of Seed dormancy and Germination*. Khan, A.A. (ed.). Amsterdam. North Holland Publishing, pp. 51-74
36. PROBERT, R.J., 1992. The role of temperature in germination ecophysiology. *In* *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (M.Fenner ed.). Wallingford. CAB International. pp 285-325.
37. ROBERTS, H.A. y NEILSON, J.E. 1982. Seasonal changes in the temperature requirements for germination of buried seeds of *Aphanes arvensis*. *New Phytologist* 92, 159-166.
38. SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 1992. *Plant Physiology*, 4^a ed. Belmont, EE.UU. Wadsworth Publishing Company. 682 p.

39. SAS INSTITUTE, INC. 1993. SAS® Technical Report P-243, SAS/STAT Software: The Genmode Procedure, Release 6.09. Cary, N.C. 88 pp.
40. SIMPSON, G.M. 1990 Seed dormancy in Grasses. Cambridge, Cambridge University Press. 307 pp.
41. STANIFORTH, R.J. and CAVERS, P.B. (1979) Field and laboratory germination responses of achenes of *Polygonum lapathifolium*, *P. pennsylvanicum* and *P. persicaria*. Can. J. Bot. (57): 877-885
42. STEINBAUER, G.P. y GRIGSBY, B., 1957. Interactions of temperature, light and moistening agent in the germination of weed seeds. Weeds. 5 (3): 681-688
43. TAYLORSON, R.B., 1970. Changes in dormancy and viability of weed seeds in soils. Weed Science 18: 265-269
44. THOMPSON, P.A., 1973, in: Seed Ecology (W.Heydecker, ed.), Butterworths, Londres, pp. 31-58
45. VEGIS, A. 1964. Dormancy in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 15: 185-224
46. VLEESHOUWERS, L.M.; BOUWMEESTER, H.J.; KARSSSEN, C.M.. 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. Journal of Ecology 83: 1031-1037.
47. WILLEMSSEN, R.W., 1975. Effect of stratification temperature and germination temperature on germination and the induction of secondary dormancy in common ragweed seeds. American Journal of Botany. 62: 1-5

10. Anexos

10.1 Diagrama de flujo sobre cambios en los niveles de dormición y terminación de la dormición en semillas y de los factores que afectarían dichos procesos.



Fuente: Benech-Arnold et al. (2000)

10.2 Temperatura media diaria durante realización de pruebas de germinación

(Datos de Estación Meteorológica de la Facultad de Agronomía, Sayago)

07-Ene-99	19,9	12-Mar-99	17,6	15-May-99	14,2	18-Jul-99	6,3
08-Ene-99	22,1	13-Mar-99	20,6	16-May-99	14,1	19-Jul-99	8,6
09-Ene-99	15,3	14-Mar-99	22,9	17-May-99	13,2	20-Jul-99	11,2
10-Ene-99	17,5	15-Mar-99	24,1	18-May-99	12,1	21-Jul-99	10,5
11-Ene-99	18,0	16-Mar-99	23,4	19-May-99	11,0	22-Jul-99	7,6
12-Ene-99	18,4	17-Mar-99	22,7	20-May-99	12,7	23-Jul-99	8,9
13-Ene-99	19,5	18-Mar-99	21,9	21-May-99	11,1	24-Jul-99	12,1
14-Ene-99	18,2	19-Mar-99	22,0	22-May-99	11,2	25-Jul-99	14,3
15-Ene-99	19,6	20-Mar-99	21,8	23-May-99	11,8	26-Jul-99	15,5
16-Ene-99	18,9	21-Mar-99	19,7	24-May-99	12,1	27-Jul-99	10,7
17-Ene-99	23,2	22-Mar-99	21,2	25-May-99	11,0	28-Jul-99	10,4
18-Ene-99	24,0	23-Mar-99	23,7	26-May-99	11,7	29-Jul-99	13,1
19-Ene-99	22,3	24-Mar-99	19,8	27-May-99	11,8	30-Jul-99	9,9
20-Ene-99	18,6	25-Mar-99	19,2	28-May-99	11,9	31-Jul-99	9,6
21-Ene-99	23,2	26-Mar-99	15,9	29-May-99	12,9	01-Ago-99	11,7
22-Ene-99	19,5	27-Mar-99	17,3	30-May-99	11,2	02-Ago-99	12,3
23-Ene-99	24,8	28-Mar-99	15,6	31-May-99	9,0	03-Ago-99	15,5
24-Ene-99	24,0	29-Mar-99	17,6	01-Jun-99	9,8	04-Ago-99	14,3
25-Ene-99	22,2	30-Mar-99	17,8	02-Jun-99	8,9	05-Ago-99	17,7
26-Ene-99	21,4	31-Mar-99	17,6	03-Jun-99	7,3	06-Ago-99	11,4
27-Ene-99	22,2	01-Abr-99	17,3	04-Jun-99	9,0	07-Ago-99	9,4
28-Ene-99	22,3	02-Abr-99	17,0	05-Jun-99	6,6	08-Ago-99	8,9
29-Ene-99	21,5	03-Abr-99	19,1	06-Jun-99	7,4	09-Ago-99	13,1
30-Ene-99	23,1	04-Abr-99	17,1	07-Jun-99	10,2	10-Ago-99	17,2
31-Ene-99	18,2	05-Abr-99	19,8	08-Jun-99	8,7	11-Ago-99	13,9
01-Feb-99	16,2	06-Abr-99	15,3	09-Jun-99	10,0	12-Ago-99	10,6
02-Feb-99		07-Abr-99	13,6	10-Jun-99	9,2	13-Ago-99	6,6
03-Feb-99		08-Abr-99	14,1	11-Jun-99	11,2	14-Ago-99	6,7
04-Feb-99	19,1	09-Abr-99	13,9	12-Jun-99	10,0	15-Ago-99	6,7
05-Feb-99	22,5	10-Abr-99	15,1	13-Jun-99	9,4	16-Ago-99	7,2
06-Feb-99	21,1	11-Abr-99	18,5	14-Jun-99	10,3	17-Ago-99	11,3
07-Feb-99	18,5	12-Abr-99	17,9	15-Jun-99	12,3	18-Ago-99	14,2
08-Feb-99	16,4	13-Abr-99	16,0	16-Jun-99	12,4	19-Ago-99	17,7
09-Feb-99	18,5	14-Abr-99	17,6	17-Jun-99	9,8	20-Ago-99	21,4
10-Feb-99	21,6	15-Abr-99	12,5	18-Jun-99	10,5	21-Ago-99	19,1
11-Feb-99	17,3	16-Abr-99	10,3	19-Jun-99	10,5	22-Ago-99	10,8
12-Feb-99	16,5	17-Abr-99	12,3	20-Jun-99	11,9	23-Ago-99	10,9
13-Feb-99	22,2	18-Abr-99	14,6	21-Jun-99	12,4	24-Ago-99	12,2
14-Feb-99	21,3	19-Abr-99	14,0	22-Jun-99	14,9	25-Ago-99	10,4
15-Feb-99		20-Abr-99	13,8	23-Jun-99	14,2	26-Ago-99	12,1
16-Feb-99		21-Abr-99	16,5	24-Jun-99	12,1	27-Ago-99	14,4
17-Feb-99	24,5	22-Abr-99	17,8	25-Jun-99	12,9	28-Ago-99	14,8
18-Feb-99	25,0	23-Abr-99	19,2	26-Jun-99	12,0	29-Ago-99	14,1
19-Feb-99	26,8	24-Abr-99	12,3	27-Jun-99	12,2	30-Ago-99	16,9
20-Feb-99	27,0	25-Abr-99	10,0	28-Jun-99	10,1	31-Ago-99	14,6
21-Feb-99	25,3	26-Abr-99	17,4	29-Jun-99	10,0	01-Sep-99	14,0
22-Feb-99	23,9	27-Abr-99	16,4	30-Jun-99	8,0	02-Sep-99	14,65
23-Feb-99		28-Abr-99	15,0	01-Jul-99	7,8	03-Sep-99	14,15
24-Feb-99		29-Abr-99	14,0	02-Jul-99	9,4	04-Sep-99	14,25
25-Feb-99	22,5	30-Abr-99	16,3	03-Jul-99	9,8	05-Sep-99	14,05
26-Feb-99	22,7	01-May-99	17,5	04-Jul-99	8,1	06-Sep-99	15,95
27-Feb-99	23,0	02-May-99	21,1	05-Jul-99	7,0	07-Sep-99	14,6
28-Feb-99	23,5	03-May-99	20,7	06-Jul-99	8,4	08-Sep-99	13,3
01-Mar-99	24,3	04-May-99	16,2	07-Jul-99	9,4	09-Sep-99	11,65
02-Mar-99	24,0	05-May-99	13,7	08-Jul-99	8,5	10-Sep-99	9,85
03-Mar-99	24,0	06-May-99	13,5	09-Jul-99	8,0	11-Sep-99	11,4
04-Mar-99	25,0	07-May-99	13,2	10-Jul-99	15,7	12-Sep-99	14,0
05-Mar-99	26,8	08-May-99	14,0	11-Jul-99	16,9		
06-Mar-99	26,0	09-May-99	16,0	12-Jul-99	18,2		
07-Mar-99	26,8	10-May-99	15,6	13-Jul-99	13,5		
08-Mar-99	27,0	11-May-99	14,9	14-Jul-99	12,6		
09-Mar-99	22,3	12-May-99	13,6	15-Jul-99	10,0		
10-Mar-99	19,5	13-May-99	10,9	16-Jul-99	8,3		
11-Mar-99	20,4	14-May-99	12,1	17-Jul-99	7,4		

10.3 Análisis estadístico

Tratamiento 1: temperatura ambiente en laboratorio
 Tratamiento 2: 6°C constantes
 Tratamiento 3: 11°C constantes
 Tratamiento 4: 26°C constantes

Esp 1: *N. Sp.* "Punta Colorada"
 Esp 2: *N. Macrostemon*
 Esp 3: *N. nudicaule*

Análisis por año, año=1998

Class Level Information

Class	Levels	Values
ESP	3	1 2 3
TRA	4	1 2 3 4

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
ESP	2	18.5360	0.0001 **
TRA	3	217.6244	0.0001 **
ESP*TRA	6	132.4845	0.0001 **

CONTRAST Statement Results (entre todos los trats y entre todas las esp)

Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
t1 vs t2	1	10.9916	0.0009	LR **
t1 vs t3	1	1.9788	0.1595	LR ns
t1 vs t4	1	74.8779	0.0001	LR **
t2 vs t3	1	4.9660	0.0259	LR *
t2 vs t4	1	194.8782	0.0001	LR **
t3 vs t4	1	140.7407	0.0001	LR **
e1 vs e2	1	7.7232	0.0055	LR **
e1 vs e3	1	14.4672	0.0001	LR **
e2 vs e3	1	0.0000	1.0000	LR ns

Especie: *N. Sp.* "Punta Colorada" (semillas cosechadas en 1998)

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRA	3	1 2 3

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
TRA	2	16.4619	0.0003

CONTRAST Statement Results

Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
t1 vs t2	1	4.4733	0.0344	LR *
t1 vs t3	1	16.1658	0.0001	LR **
t2 vs t3	1	4.8549	0.0276	LR *

Especie: N. macrostemon (semillas cosechadas en 1998)

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRA	4	1 2 3 4

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
TRA	3	186.0544	0.0001

CONTRAST Statement Results

Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
t1 vs t2	1	61.2944	0.0001	LR **
t1 vs t3	1	51.1527	0.0001	LR **
t1 vs t4	1	13.6297	0.0002	LR **
t2 vs t3	1	0.7827	0.3763	LR ns
t2 vs t4	1	131.1007	0.0001	LR **
t3 vs t4	1	117.0947	0.0001	LR **

Especie: N. nudicaulis

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRA	4	1 2 3 4

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
TRA	3	97.2238	0.0001

CONTRAST Statement Results

Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
t1 vs t2	1	0.0077	0.9303	LR ns
t1 vs t3	1	0.8632	0.3529	LR ns
t1 vs t4	1	66.2053	0.0001	LR **
t2 vs t3	1	1.2949	0.2551	LR ns
t2 vs t4	1	79.1926	0.0001	LR **
t3 vs t4	1	63.3697	0.0001	LR **

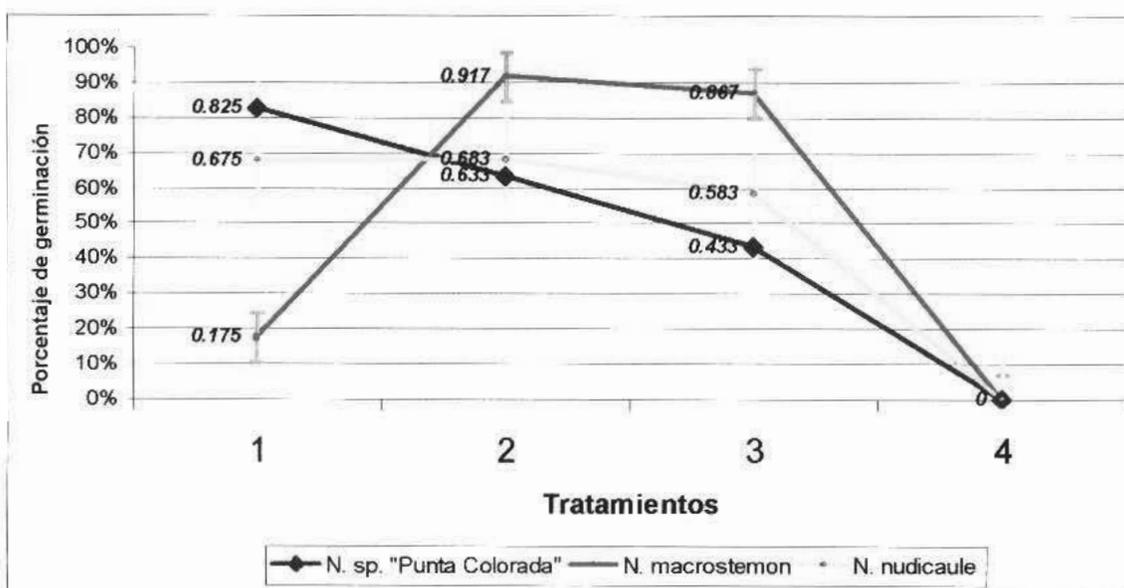
10.4 Intervalos de confianza para porcentajes de germinación

Se calcularon los intervalos de confianza (I.C.) para para la proporción "p" de una variable aleatoria binomial (n,p) con distribución binomial utilizando la aproximación normal (tabla de Z). Los I.C. fueron calculados para los porcentajes finales de germinación de cada una de las tres especies, y para cada uno de los cuatro tratamientos diferentes, según la siguiente fórmula:

$$I.C. (.95)p = \bar{p} \pm 1.96 \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n}}$$

en la que \bar{p} es la proporción de semillas germinadas sobre el total y n el número total de semillas de cada especie en cada uno de los tratamientos. De esta manera se calcula un I.C. para cada especie y tratamiento. Cuando los I.C. de especies diferentes en un mismo tratamiento se solapan, no existen diferencias entre las especies en este tratamiento.

Gráficamente se expresa así:



Tratamientos:

- 5 Temperatura ambiente (mesa de laboratorio)
- 6 6°C constante
- 7 11°C constante
- 8 26°C constante