

EFFECTO DEL ACIDO GIBERELICO Y DEL PREENFRIAMIENTO SOBRE LA RUPTURA DEL REPOSO EN SEMILLAS DE SALVIA (*Salvia splendens*)^{1/}

Bernardo de la Vega*
Ramiro Alizaga*

ABSTRACT

Effect of gibberellic acid and stratification on breaking seed dormancy in salvia (*Salvia splendens*). Doses of gibberellic acid from 50 to 200 ug/ml and stratification periods between 5 and 25 days were applied to dormant salvia (*Salvia splendens*) seeds. The best laboratory results in interrupting dormancy were obtained using 100 and 150 ug/ml of AG₃. No improvement on germination was obtained with the stratification treatments tested.

A significant increment in plant emergency in the greenhouse was obtained when the seeds were treated with AG₃ or an additional treatment with sulfuric acid (98%) for three minutes. In cultivars SB3, SB10 and 29471 emergency values were over 80% when treated with AG₃, sulfuric acid or their combination.

Polar germination inhibitors were detected in the embryonic axis and the seminal coat of dormant salvia seeds by using a standard procedure with lettuce seeds as indicators.

INTRODUCCION

La horticultura ornamental es una actividad que recientemente ha alcanzado gran importancia económica para nuestro país. En el caso específico de semilla de salvia, las exportaciones realizadas durante el período 1982-1983 alcanzaron la suma de \$ 120.800 y para 1983-1984 la suma de \$ 138.878.

Costa Rica por su situación geográfica, tiene grandes posibilidades de exportar plantas y semillas de ornamentales a los principales mercados consumidores pues debido a las condiciones climáticas existentes es posible mantener una producción constante durante todo el año y de esta forma satisfacer la demanda, especialmente en los meses en que los países importadores no pueden autoabastecer su demanda interna.

Uno de los principales problemas en la comercialización de semilla de salvia es que presenta

un marcado período de reposo, esto es, la incapacidad de una semilla viable de activar o iniciar el proceso de germinación cuando las condiciones del medio ambiente son favorables para que ocurra. En salvia el reposo se atribuye a la posible presencia de inhibidores de la germinación que normalmente se localizan en el embrión y en la cubierta seminal. Además, esta semilla al absorber agua se rodea de una capa mucilaginosa que según Ballard (1973) y Bewley y Black (1982) impide el intercambio gaseoso. Atwater (1980) considera que las semillas que presentan un exudado mucilaginoso, al excluir oxígeno, pueden requerir luz, bajas temperaturas o la adición de ácido giberélico para estimular su germinación.

Uno de los procedimientos más usados para inducir la germinación de semillas en reposo, es someterlas a bajas temperaturas y a condiciones de alta humedad (preenfriamiento). Al respecto Mayer y Poljakooff (1975) mencionan que las semillas hidratadas de muchas especies leñosas y herbáceas son liberadas del reposo cuando se someten a temperaturas entre 1 y 15 C. El tiempo de exposición a estas condiciones varía con la especie.

Otro método usado es la aplicación de giberelinas, que son consideradas como las promotoras

1/ Recibido para su publicación el 19 de noviembre de 1986.

* Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica.

más importantes de la germinación en semillas con requerimientos de preenfriamiento, de almacenamiento en seco, de luz y de oscuridad (Abdalla y McKelvie, 1980; Chen y Varner 1973; Gaspar *et al.*, 1975).

Debido a que la semilla de salvia presenta un período de reposo que obliga a mantenerlas en almacenamiento entre cuatro y seis meses, el objetivo de esta investigación fue encontrar un método adecuado para estimular una germinación rápida y homogénea en semillas de salvia de cosecha reciente.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica y en los invernaderos de la Compañía Linda Vista S. A., ubicados en Dulce Nombre de Cartago, en el período comprendido entre marzo de 1984 y agosto de 1985.

Se utilizaron semillas de salvia (*Salvia splendens*) en estado de reposo, cosechadas de 15 a 30 días antes de iniciar el ensayo.

Pruebas de laboratorio

En los tratamientos de laboratorio con ácido giberélico (AG₃), las semillas se colocaron sobre papel para germinación humedecido con distintas soluciones de AG₃. Las concentraciones empleadas fueron: 0, 50, 100, 150 y 200 ug/ml. En forma simultánea, se realizaon los tratamientos de preenfriamiento, que consistieron en colocar las semillas sobre papel humedecido en bandejas de metal para germinación, protegidas por una bolsa de plástico para evitar la desecación. Estas bandejas se introdujeron en una cámara con temperatura constante de 5 C. Los períodos de preenfriamiento fueron de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días. Posteriormente, tanto las semillas preenfriadas como las tratadas con AG₃, se colocaron en una cámara para germinación graduada a 30 C, donde permanecieron 12 días, al cabo de los cuales se procedió a evaluar la germinación. En ambos ensayos se usó un diseño irrestrictamente al azar con tres repeticiones; cada repetición constó de 100 semillas. Los cultivares de salvia utilizados fueron los siguientes: SB1, SB46, SB144 y 7300.

Las variables evaluadas en estos ensayos fueron: porcentaje de plántulas normales, porcentaje

de plántulas anormales, porcentaje de semillas en reposo, porcentaje de semillas muertas y altura promedio de plántulas. Las cuatro primeras variables se evaluaron de acuerdo con las reglas para análisis de calidad del ISTA (1976). Para determinar la altura promedio en cada tratamiento, se tomaron diez plántulas por repetición.

Ensayos de invernadero

Con base en los resultados obtenidos en el laboratorio, se seleccionaron los tratamientos más eficaces para estimular la germinación. Estos fueron evaluados bajo las condiciones de invernadero normalmente utilizadas para realizar las pruebas de emergencia. Las condiciones que imperaron durante el desarrollo de este ensayo fueron: una temperatura diurna promedio de 29,8 C y una humedad relativa de 74,2% ; en la noche se tuvo una temperatura promedio de 20,6 C y una humedad relativa promedio de 88,2% .

El sustrato utilizado para la siembra consistió en una mezcla de grana de arroz y tierra con un alto contenido de materia orgánica esterilizada a vapor.

En la prueba de invernadero, las semillas fueron sumergidas por períodos de 14, 28 y 42 horas, en soluciones de 100 y 150 ug/ml de AG₃. Además, se evaluó el efecto de la escarificación con ácido sulfúrico (H₂SO₄) en la ruptura del reposo, para lo cual, las semillas fueron sumergidas en una solución de H₂SO₄ concentrado (98%) durante un período de tres minutos y luego se lavaron con agua durante dos minutos. Las semillas tratadas con H₂SO₄, se colocaron en agua durante períodos de inmersión de 14, 28 y 42 horas y en las soluciones de 100 y 150 ug/ml de AG₃, por iguales períodos de inmersión.

Los cultivares de salvia empleados fueron los siguientes: SB3, SB10, SB11, 2071 y 29471. El diseño experimental fue un bloques completos al azar en un arreglo factorial 5x3x2x3 con cuatro repeticiones de 50 semillas cada una.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de plántulas emergidas y altura promedio de las mismas. Ambas evaluaciones se realizaron 12 días después de la siembra.

Bioensayo de inhibidores

Para determinar la presencia de posibles inhibidores de la germinación en las semillas en

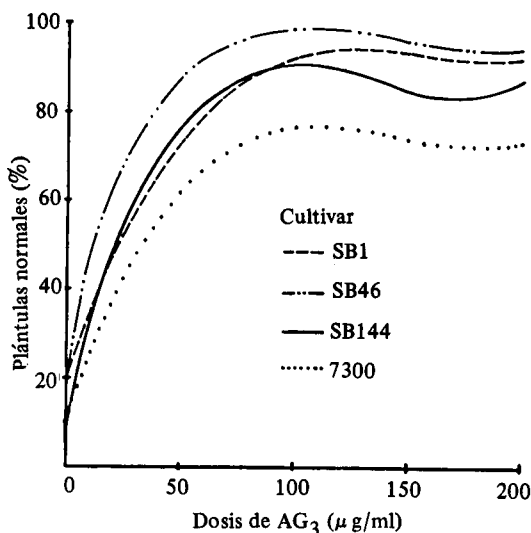


Fig. 1. Efecto de dosis de ácido giberélico (AG₃) sobre el porcentaje de plántulas normales en cuatro cultivares de salvia, en laboratorio.

reposo, se realizó un bioensayo con semillas de lechuga. Para esto, se separaron los embriones y las cubiertas seminales de las semillas de salvia y a cada una de estas partes se le hizo una extracción de sus componentes, mediante el método de percolación (UNA, 1983). Se utilizó hexano como medio de extracción de los constituyentes no polares, éter etílico para los medianamente polares y acetato de etilo para los polares.

Una vez extraídos los componentes, se colocó 50 semillas de lechuga en platos petri sobre papel de filtro humedecido con cada uno de los extractos obtenidos. Para cada extracto se hicieron tres repeticiones. Las semillas fueron puestas a germinar en una cámara a 20 C y ocho días después se evaluó la germinación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Pruebas de laboratorio

Tratamiento con ácido giberélico (AG₃). Las compañías internacionales encargadas de la compra y distribución de semillas de ornamentales, han establecido en 80 el porcentaje mínimo de plántulas normales para las pruebas de germinación. Cualquier tratamiento aplicado a semillas en reposo, deberá estimular la germinación hasta alcanzar un 80% de plántulas normales como mínimo.

Para determinar el efecto de las diferentes dosis de AG₃ sobre la germinación, se realizó una

prueba de regresión por polinomios ortogonales para cada uno de los cultivares utilizados. En la Figura 1, se destaca el notable incremento en la germinación de las semillas de salvia en reposo cuando se les aplicó AG₃. Este incremento inducido confirma a las giberelinas como unas de las promotoras más importantes de la germinación. Efectos similares han sido mencionados por Abdalla y McKelvie (1980), Mayer y Poljakooff (1975) y Villers (1972). Con la dosis de 50 µg/ml de AG₃ únicamente el cultivar SB46 superó el 80% de plántulas normales, lo cual indica que esta dosis no es suficiente para una estimulación eficaz de la germinación.

Los cultivares SB1, SB46 y SB144 superaron el 80% de plántulas normales con las dosis de 100 y 150 µg/ml de AG₃; mientras que el cultivar 7300 en ningún caso alcanzó un porcentaje de plántulas normales superior al estipulado como aceptable. Esto pudo deberse a que son necesarias dosis mayores de AG₃ para estimular la germinación de este cultivar o bien, a que el lote de semillas no tuviera una calidad comparable a la de los otros cultivares.

En general, los testigos presentaron un 13% como promedio de germinación, mientras que, con las dosis de 100 y 150 µg/ml de AG₃ se obtuvo un promedio de 87%, lo que representó un incremento de 74% en el número de plántulas normales.

Al evaluar el porcentaje de plántulas anormales se observó que el incremento promedio de las mismas fue de solo un 4%, por lo que se puede considerar que las dosis de AG₃ aplicadas no provocaron efectos negativos de importancia sobre el desarrollo normal de las plántulas. Esto se pudo deber a que las dosis de AG₃ probadas fueron bajas en comparación con las que se mencionan en la literatura (de 200 a 400 µg/ml) como inductoras de un aumento considerable en el porcentaje de anomalía (Gaspar *et al.*, 1975; Rowe y Gordon, 1981). Además, es lógico que en los tratamientos con AG₃, al incrementarse la germinación en una proporción tan apreciable, aumenta la probabilidad de que entre las semillas germinadas aparezcan plántulas anormales debido a factores intrínsecos de las mismas.

La mayor altura promedio para todos los cultivares, se presentó con la dosis de 100 µg/ml de AG₃ (Figura 2). En la literatura se informa que las plántulas provenientes de semillas tratadas

Cuadro 1. Efecto de los inhibidores de la germinación extraídos en embriones y cubiertas seminales de salvia sobre la germinación de semillas de lechuga.

Solventes	Embriones		Cubiertas	
	Semilla germinada %	Semilla en reposo %	Semilla germinada %	Semilla en reposo %
Testigo (H ₂ O)	85	10	93	6
Hexano	84	11	93	6
Extracto* de Hexano	64	32	93	7
Eter etílico	82	11	93	7
Extracto de éter etílico	53	38	83	17
Acetato de etilo	80	18	95	5
Extracto de acetato de etilo	0	95	54	46

* Extracto se refiere a los componentes extraídos con el solvente respectivo.

Totales inferiores a 100% son debidos a la presencia de semilla muerta.

con AG₃ experimentan una elongación considerable de sus tejidos debido al efecto hormonal de éste (Gaspar *et al.*, 1975, Rowe y Gordon, 1981); sin embargo, la diferencia obtenida en la altura de las plántulas probablemente se debió a que en las semillas tratadas con AG₃ la germinación se inició a los dos días mientras que en los testigos ésta se observó hasta los seis días. El retraso en la germinación de las semillas no tratadas se debió a la presencia de inhibidores endógenos de la germinación. Por otra parte, las plántulas provenientes de semillas tratadas con AG₃, posiblemente tuvieron una relación favorable en el balance hormonal inhibidor/promotor (Chen y Varner, 1973; Ke-tring, 1973).

Tratamiento de preenfriamiento. A pesar de que el preenfriamiento se recomienda como uno de los tratamientos más eficaces para la ruptura del reposo (Atwater, 1980; Bewley y Black, 1982), en el presente estudio, aún con el período máximo que fue de 25 días, el mayor porcentaje promedio de germinación que se obtuvo fue de un 35%, por lo que se puede concluir que esta metodología no presenta utilidad práctica.

Determinación de inhibidores de la germinación. La germinación de las semillas de lechuga se inhibió en un grado apreciable cuando se pusieron en contacto con los extractos obtenidos con acetato de etilo, procedentes tanto de la solución de em-

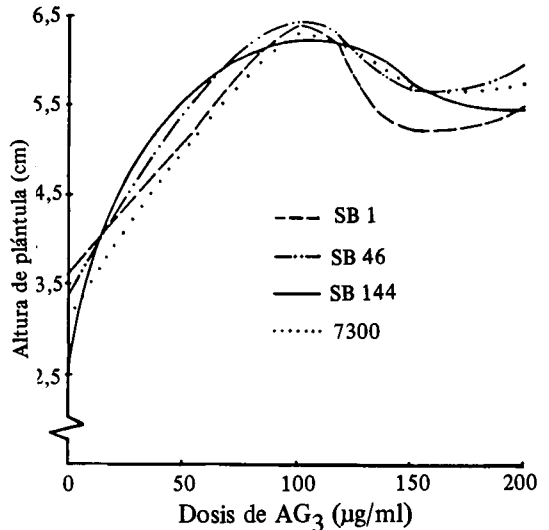


Fig. 2. Efecto de dosis de ácido giberélico (AG₃) sobre la altura de plántulas en cuatro cultivares de salvia, en laboratorio.

briones como de la solución de cubiertas seminales de semillas de salvia en reposo (Cuadro 1). Cuando el papel se humedeció con acetato de etilo puro y agua la germinación de las semillas de lechuga no se vio afectada, lo que indica que la germinación fue bloqueada por la existencia de inhibidores de tipo polar, los cuales se concentran principalmente en el embrión (cotiledones y eje embrionario) de las semillas en reposo. Los extractos obtenidos

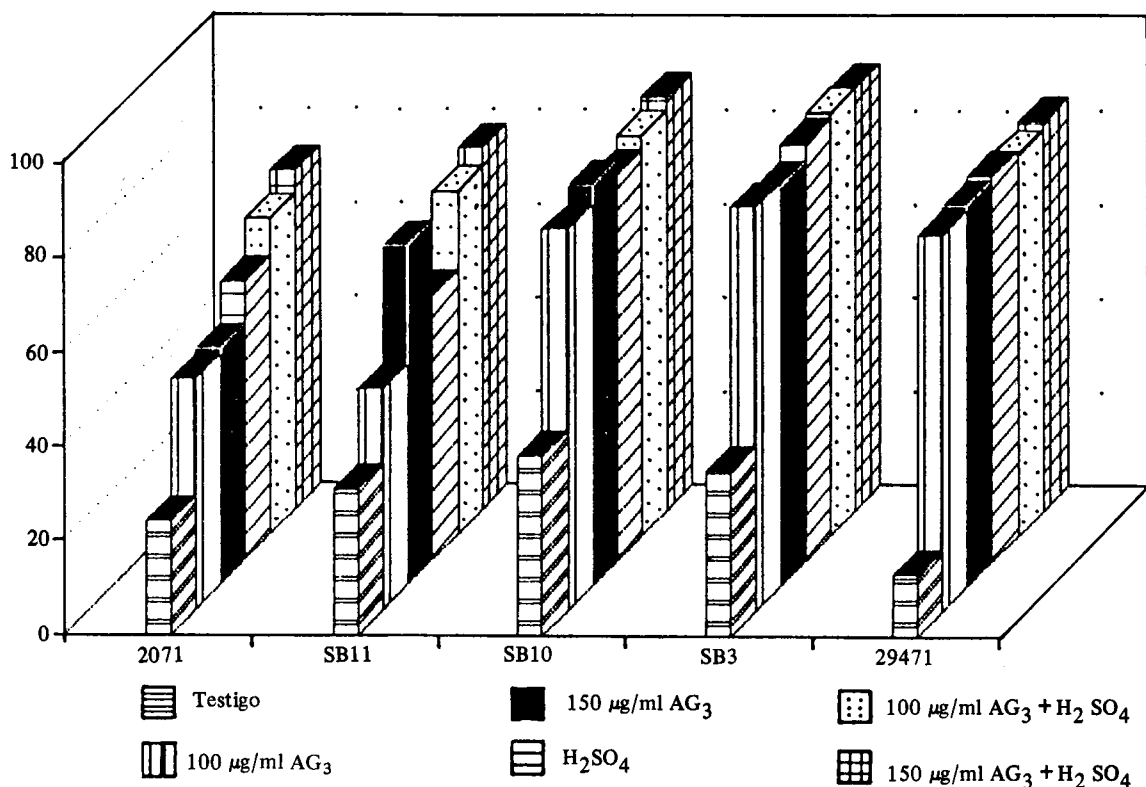


Fig. 3. Efecto de dosis de ácido giberélico (AG₃), de la escarificación con ácido sulfúrico y de su interacción sobre la emergencia de cinco cultivares de salvia, en invernadero.

con hexano y éter etílico apenas causaron una ligera inhibición de la germinación.

Pruebas de invernadero

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de laboratorio, los tratamientos seleccionados para ser probados en el invernadero fueron las concentraciones de 100 y 150 µg/ml de AG₃, con las cuales se obtuvo los mayores porcentajes de plántulas normales y a la vez, una mayor uniformidad de la germinación.

En condiciones de invernadero también fueron notables los incrementos en la emergencia que se lograron al tratar las semillas con AG₃. Los cultivares SB3, SB10 y 29471 superaron el 80% de emergencia de plántulas, presentando incrementos que variaron entre 24 y 36% respecto al testigo con la dosis de 150 µg/ml de AG₃ (Figura 3). Aunque los porcentajes de emergencia en los cultivares SB11 y 2071 mostraron incrementos de 15 y 30% respectivamente sobre el tratamiento control, no lograron alcanzar el mínimo aceptable de 80%.

La interacción cultivar x H₂SO₄ fue analiza-

da mediante una prueba de diferencia mínima significativa (DMS). Esta prueba mostró un efecto positivo del H₂SO₄ sobre la emergencia de plántulas en todos los cultivares. Como se observa en la Figura 3 siempre se obtuvo mayores porcentajes de emergencia cuando se trató las semillas con H₂SO₄, sin embargo, sólo los cultivares SB3, SB10 y 29471 superaron el 80% de emergencia.

Al comparar los promedios de emergencia entre el tratamiento individual con AG₃ y la combinación de los tratamientos AG₃ y escarificación, se obtuvo un 9% de incremento en el porcentaje de emergencia cuando se efectuaron ambos tratamientos (Figura 3). Al combinar los tratamientos de escarificación y 150 µg/ml de AG₃, los cultivares SB11 y 2071 presentaron incrementos en la emergencia de 46 y 48% respectivamente, en relación con el testigo, sin embargo, a pesar de esto no se logró alcanzar el 80% de emergencia.

El estímulo sobre la emergencia de plántulas que se logró mediante la escarificación con H₂SO₄ pudo deberse a la eliminación de la capa mucilaginosa y al ablandamiento de la cubierta. Esto hace

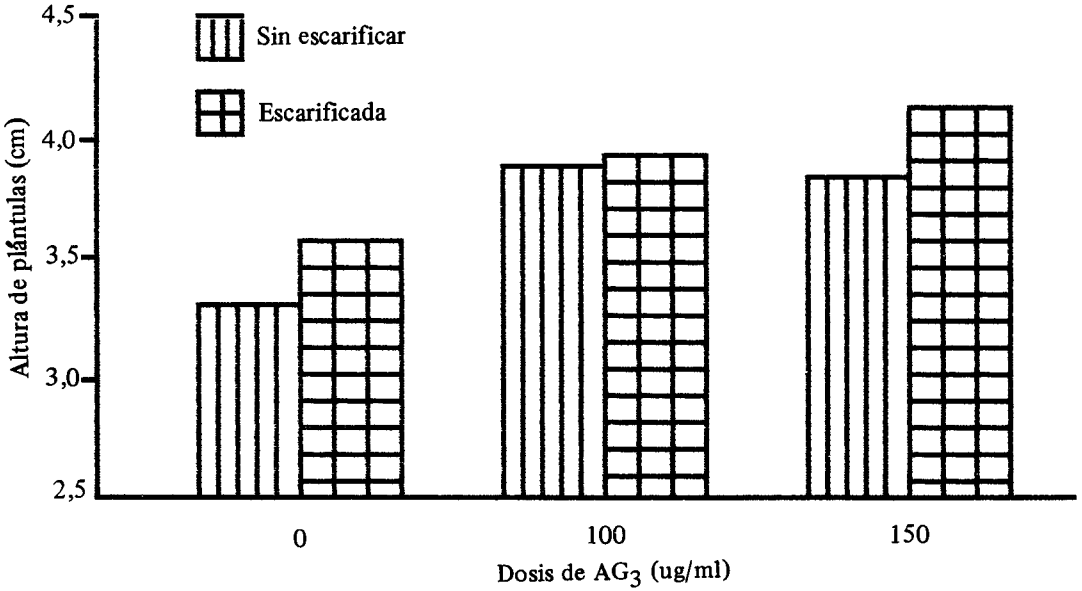


Fig. 4. Efecto de la escarificación con ácido sulfúrico sobre la altura de plántulas para cada dosis de ácido giberélico (AG₃) evaluada.

que la semilla se torne mucho más permeable al agua y al oxígeno, lo que facilita la remoción de posibles inhibidores endógenos de la germinación (Heydecker y Coolbear, 1977). Este efecto quedó confirmado con la emergencia más rápida y uniforme que se observó en las plántulas provenientes de semillas escarificadas.

El incremento provocado por los diferentes tiempos de inmersión en el porcentaje de emergencia y en la altura de plántulas, fue muy pequeño como para sacar conclusiones prácticas sobre su eficacia.

Con el fin de determinar el efecto que provocaron las diferentes concentraciones de AG₃ sobre la altura de plántulas, se realizó un análisis de regresión para cada cultivar. Se observó una mayor altura de las plántulas conforme aumentó la dosis de AG₃ (Figura 4). El mayor incremento promedio en la altura se obtuvo con 150 ug/ml de AG₃ y fue de un 24,8% (0,8 cm) con respecto al tratamiento testigo. Esto se debió a una emergencia más rápida de las plántulas cuando las semillas fueron tratadas con AG₃ o con H₂SO₄, ya que ésta se observó a los tres días de haber sido sembradas, mientras que en los testigos la emergencia se empezó a notar seis días después.

La escarificación con H₂SO₄ no produjo daños en las estructuras internas de las semillas,

pues no se obtuvieron diferencias al comparar los promedios de altura con los de plántulas provenientes de semillas tratadas con AG₃ (Figura 4). Esta observación comprueba que el tiempo de exposición al H₂SO₄ (3 min) fue eficaz para provocar la eliminación de la capa mucilaginosa y el ablandamiento de la cubierta seminal. Además, resulta evidente que el efecto mecánico de la escarificación química con H₂SO₄, no provocó daños al embrión. Debe mencionarse que períodos de escarificación con H₂SO₄ superiores a los 5 min causaron un aumento considerable en los porcentajes de plántulas anormales y de semillas muertas.

Los promedios de altura (Figura 4) observados en los tratamientos con 100 y 150 ug/ml de AG₃ fueron ligeramente mayores (3 mm) que los obtenidos cuando únicamente se escarificó con H₂SO₄; por lo que se puede considerar que el tratamiento con AG₃ no causó elongación de los tejidos y por lo tanto la mayor altura observada se debió a que las semillas tratadas con AG₃ germinaron en un período más corto.

RESUMEN

Dosis de ácido giberélico (AG₃) desde 50 hasta 200 ug/ml y períodos de preenfriamiento de 5 a 25 días se aplicaron a semillas de salvia

(*Salvia splendens*) para interrumpir su período de reposo en el laboratorio.

El mayor promedio general de plántulas normales en el laboratorio se obtuvo con las dosis de 100 y 150 ug/ml de AG₃, por lo que éstas fueron seleccionadas para ser probadas en el invernadero. Los períodos de preenfriamiento no fueron eficaces para la ruptura del reposo, ya que en ningún caso se obtuvo un promedio aceptable (80%), de germinación.

En las pruebas de invernadero se obtuvo incrementos entre 15 y 36% en la emergencia de las plántulas al tratar las semillas con las dosis de AG₃ seleccionadas y con un tratamiento adicional de escarificación con ácido sulfúrico concentrado al 98%. En los cultivares SB3, SB10 y 29471 se superó el 80% de emergencia cuando las semillas fueron tratadas con AG₃, con ácido sulfúrico o con la combinación de estos tratamientos.

Un bioensayo con semillas de lechuga mostró que en las semillas de salvia recién cosechadas existen inhibidores de la germinación de tipo polar tanto en el embrión como en la cubierta seminal.

LITERATURA CITADA

- ABDALLA, S. T.; McKELVIE, A. 1980. The interaction of chilling gibberellic acid on the germination of seeds of ornamental plants. *Seed Science and Technology* 8(2): 139-141.
- ATWATER, B. R. 1980. Germination, dormancy and morphology of the seeds of herbaceous ornamental plants. *Seed Science and Technology* 8(4): 523-573.
- BALLARD, L. A. 1973. Physical barriers to germination. *Seed Science and Technology* 1(3): 285-303.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds; in relation to germination. Berlín, Springer Verlag. v. 2, 375 p.
- CHEN, S.S.C.; VARNER, J. E. 1973. Hormones and seed dormancy. *Seed Science and Technology* 1(2): 325-338.
- GASPAR, S.S. C.; FASEKAS, J.; PETHO, A. 1975. Effects of gibberellic acid and prechilling on breaking dormancy in cereals. *Seed Science and Technology* 3(2): 555-563.
- HEYDECKER, W.; COOLBEAR, P. 1977. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *Seed Science and Technology* 5(2): 353-415.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1976. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 4(1): 1-77.
- KETRING, D. L. 1973. Germination inhibitors. *Seed Science and Technology* 1(2): 305-324.
- MAYER, A. M.; POLJAKOOFF MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. 2 ed. Oxford, Pergamon Press. 192 p.
- ROWE, D.C.F.; GORDON, A. G. 1981. Studies on the effects of pre-chilling periods or gibberellins used to stimulate seed germination of *Nothofagus obliqua* and *N. procera*. *Seed Science and Technology* 9(3): 823-838.
- UNIVERSIDAD NACIONAL. 1983. Prácticas de laboratorio de química orgánica. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 50 p.
- VILLERS, T. A. 1972. Seed dormancy. In *Seed Biology*. Ed. by T. T. Kowslosky. New York, Academic Press. v. 2, p. 220-276.