

TÍTULO: “Promoción de la emergencia en *Delonix regia* y *Enterolobium contortisiliquum*, especies de interés para la arboricultura urbana”.

ALUMNO: ROMINA PORGER.

DIRECTOR: Dra. Claudia Luna.

INTRODUCCIÓN

La calidad de la semilla es un concepto formado por diferentes atributos, que son de interés para el semillero, el productor, las autoridades de certificación y el gobierno o agencia responsable del control. En esta instancia, la calidad de la semilla se define en función de las siguientes variables: pureza fisico-botánica, contenido de humedad, peso de 1.000 semillas, viabilidad, germinación, vigor y estado sanitario (Alzugaray *et al.*, 2007).

La propagación por semilla es el método más frecuente para la producción de muchas leñosas; sin embargo, comúnmente existen problemas de latencia que dificultan la germinación y emergencia. La latencia seminal es uno de los principales problemas para la producción de plántulas forestales (Oliveira *et al.*, 2003). En muchas especies, la baja germinación de las semillas está asociada al endurecimiento de las cubiertas seminales (Piroli *et al.*, 2005; Zida *et al.*, 2005) lo que las hace casi impermeables a la entrada de oxígeno y agua, y en algunas especies pueden ser una barrera mecánica a la germinación o pueden contener compuestos químicos que inhiben el proceso (Bewley y Black, 1994).

La latencia asegura la sobrevivencia de la mayor proporción posible de las semillas caídas al suelo en condiciones naturales (Bewley y Black, 1994), pero representa un problema para obtener una emergencia rápida y uniforme en los viveros y por lo tanto se requiere aplicar tratamientos pregerminativos para superarla.

La escarificación es uno de los tratamientos que se realiza con la finalidad de modificar las cubiertas seminales duras o impermeables, mediante cualquier proceso que permita la ruptura, rayado o alteración mecánica de la semilla para hacerlas permeables al agua y/o gases, liberar compuestos químicos inhibitorios o restricciones al embrión y de esta forma mejorar la germinación y acelerar la obtención de plántulas. La escarificación puede ser mecánica, química o física, entre otras y su nivel óptimo varía entre especies y debe ser determinado empíricamente . Para el productor es importante determinar un método simple, eficaz, de bajo costo y seguro, y que no ocasione daños al personal y/o al ambiente (Zida *et al.*, 2005).

Tratamientos mecánicos tan variados como lijado, cortes o punzados han mostrado ser efectivos para romper las cubiertas seminales e incrementar los valores de germinación (Piroli *et al.*, 2005; Zida *et al.*, 2005); sin embargo, la escarificación mecánica con lija o elementos cortantes pueden ser lentos y engorrosos cuando se emplea a gran escala (Oliveira *et al.*, 2003; Sacheti y Al-Rawahy, 1998).

Por otra parte, la validación de las características biométricas de frutos y semillas de una determinada especie brinda información sobre la variabilidad de esas características entre individuos de un área establecida (Souto *et al.*, 2008); también la clasificación de las semillas por tamaño para determinar la

calidad fisiológica, ha sido ampliamente utilizada en la reproducción de diferentes especies de plantas (Alves *et al.*, 2005).

Por ello el objetivo de este trabajo es determinar un sistema de clasificación y evaluar el efecto de tratamientos pregerminativos de semillas de *Delonix regia* y *Enterolobium contortisiliquum* para promover la emergencia de las plántulas.

Objetivos particulares

- Determinación de viabilidad/daños por métodos destructivos y no destructivos.
- Determinación de la variabilidad morfométrica/colorimétrica de semillas provenientes de diferentes individuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal.

Se seleccionaron árboles urbanos *D. regia* y *E. contortisiliquum* (Cosecha 2014-2015), con apariencia sana, y que se encontraban espaciados a una distancia mayor a 50 m entre sí. De cada árbol se colectaron 8 frutos y se obtuvieron las semillas para realizar a los diferentes ensayos.

Pruebas de viabilidad

Ensayos de viabilidad por métodos destructivos.

Prueba Topográfica por Tetrazolio: La evaluación de la calidad de las semillas a través de esta prueba se basa en la tinción de los tejidos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifenil Tetrazolio, que permite distinguir en las semillas a las áreas vivas (áreas de color rojo) de las áreas muertas que no poseen coloración (Hampton y Tekrony, 1995).

Se trabajó con 4 repeticiones de 25 semillas que se acondicionaron realizando una imbibición durante 48 h. Para realizar la tinción, se utilizaron frascos de vidrio de 100 ml con tapa hermética, donde se colocaron las semillas totalmente sumergidas en la solución de Tetrazolio. Estos frascos se incubaron en estufa a 28°C y en oscuridad durante 24 h. Una vez concluida la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron las observaciones sobre cada semilla individualmente.

Los resultados se expresaron en % de semillas viables (semillas mayormente teñidas) y semillas no viables (embrión sin tinción).

Prueba del índigo carmín: En esta prueba se produce la coloración del tejido muerto de la semilla. Se ha reportado como una técnica útil para especies de pináceas y no hay constancias de su utilización en muchas otras especies (Benito-Matías *et al.*, 2004).

Se tomaron 4 repeticiones de 25 semillas, y se las sumergieron 18 h en agua destilada para reblanecer el tegumento. Posteriormente se incubaron en la solución de índigo carmín durante 3 h a temperatura ambiente. Se lavaron y se clasificaron en viables/sin daño (blancos o con pocas manchas azules nunca localizadas en la radícula) y no viables/con daño (zona de la radícula totalmente teñida y/o embrión teñido).

Detección de daño en semillas por método no destructivo.

Prueba de Rayos X: es una metodología utilizadas para evaluar la calidad de las semillas, no destructiva para el análisis interno de las propiedades de las semillas: anatomía, defectos morfológicos, cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración y ataque de insectos entre otros. Las áreas claras representan las partes mucho más densas del objeto, dificultando el paso de la radiación. Las semillas se pegaron a una placa de plástico autoadherible de polipropileno, la que se colocó sobre una placa de acrílico transparente en la cámara de irradiación no digital (Faxitron X-Ray modelo MX-20; Specimen

Radiography System®, Illinois, USA) y se sometió a exposiciones a 18 kV por 10 s. Posteriormente, las placas se revelaron en una impresora digital para rayos X (procesador Hope X Ray; Micro-Max modelo 319®).

Clasificación de semillas

Biometría de semillas.

Para la biometría de semillas se siguió la metodología de Bravato (1974) que establece el tamaño de las semillas a partir de mediciones de longitud y ancho. Se incluyó la medición del espesor de las simientes tomada en la parte central de las mismas. A partir de los datos obtenidos se calculó la relación longitud-ancho (L/A) y volumen (V). Para definir la forma de la semilla se siguió lo indicado por Murley (1951). Las mediciones se realizaron sobre 100 semillas de cada procedencia tomadas al azar y mediante el uso de un calibre de precisión de 0,1 mm.

Se complementó con el análisis de imágenes propuesto por Verdugo *et al.* (2007), donde se obtuvieron imágenes con 4.800 píxeles de resolución, por medio del escáner Hewlett Packard 7450 tipo “flat bed”. Las imágenes obtenidas se procesaron con los programas Photoshop 5.0, para obtener las características morfométricas de tamaño (área, largo, ancho y volumen).

Caracterización colorimétrica de las semillas.

La estimación del color de la cubierta seminal se realizó sobre 100 semillas de cada especie mediante el empleo de la carta de colores “Munsell” (1975).

Ensayos de tratamientos pregerminativos para la promoción de la emergencia

- Escarificado físico

T1- Sumergir las semillas en agua a 100 °C y dejarlas en remojo por 24 horas permitiendo que el agua se enfrié naturalmente,

T2- Sumergir por 15 minutos en agua a 100 °C, sacar las semillas y dejarlas enfriar a exposición natural de aire;

T3- Sumergir por 30 minutos en agua a 100 °C, sacar las semillas y dejarlas enfriar a exposición natural de aire;

T4- Sumergir las semillas en agua a temperatura ambiente y dejarlas en remojo por 24 horas.

- Escarificado mecánico

T5- ruptura física de las semillas mediante licuado a baja velocidad por 15 segundos.

T6- ruptura física de las semillas mediante licuado a baja velocidad por 30 segundos.

T7- ruptura física de las semillas con papel de lija N° 80 hasta dejar expuesto el endosperma (Control, tomado del trabajo práctico de “Fisiología Vegetal”).

- Escarificado físico-mecánico

T8-Sumergir las semillas en agua a 100 °C y dejarlas en remojo por 24 horas permitiendo que el agua se enfrié naturalmente, y luego realizar un corte al tegumento seminal con bisturí.

El sustrato empleado fue arena esterilizada contenida en bandejas plásticas rectangulares de 43 x 37 x 17 cm de largo, ancho y profundidad, respectivamente. En ambas especies la profundidad de siembra fue de aproximadamente 0,5 cm. Las bandejas se mantuvieron en cámara de incubación a una temperatura promedio de 27 °C.

Parámetros de crecimiento:

Para cada especie se determinó el porcentaje de emergencia total (% E), tiempo para iniciar la emergencia (TI), tiempo para alcanzar el 50 % de la emergencia total (TE 50) y lapso entre la ocurrencia del 10 y 90 % de la emergencia total (TE 10-90), todos con base en los valores promedios.

Análisis estadístico y diseño experimental:

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones de 25 semillas cada uno. La emergencia se consideró al aparecer la plúmula sobre el sustrato con la apertura completa de los cotiledones, ya que en ambas especies la germinación es epígea. Los conteos se realizaron cada dos días luego de iniciado el proceso de emergencia y se mantendrán hasta que los valores permanezcan constantes por 10 días.

Los datos fueron transformados ($y = \log_e x$) y analizados estadísticamente con el software Infostat versión 2008. Se realizó el análisis de la varianza comparando las medias de los tratamientos a través de la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$). Para las variables color, se analizó la distribución de frecuencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de viabilidad

Ensayos de viabilidad por métodos destructivos.

En referencia al patrón elaborado para las semillas de ambas especies (Figura 1 A y B ver Anexo) por Pivaral Leiva (1999), se determinaron los porcentajes de viabilidad para ambos métodos destructivos.

Con el test de tetrazolio se identificó un $73,49\% \pm 1,60$ de semillas de *D. regia* (Figura 2-A ver Anexo) y un $55,83\% \pm 0,75$ para *E. contortisiliquum*, viables (Figura 2-B ver Anexo; Tabla 1).

En ocasiones se recomienda este test como buen predictor de la germinación, tanto para semillas de *Quercus* como de otras especies forestales; aunque presenta algunos inconvenientes (Bonner, 1984; ISTA, 1999; Moreno Álvarez *et al.*, 2001); posiblemente la mayor dificultad es encontrar un protocolo adaptado a cada especie, de forma que las tinciones sean lo suficientemente homogéneas para asegurar una buena interpretación de los resultados, que en ocasiones se ven afectados por la cantidad de lípidos, tiempo de tinción, condiciones de temperatura en las que se lleva a cabo la reacción, o incluso experiencia del analizador en dicha especie y en el método (Benito-Matías *et al.*, 2004).

Si bien esta prueba ha sido utilizada en numerosas especies forestales como ser *Bombacopsis quinata* y *Tabebuia rosea* (Cordero, 1994); *Enterolobium cyclocarpum*, *Gliricida sepium* y *Delonix regia* (Pivaral Leiva, 1999), *Pinus pinea* (Benito-Matías, 2004); *Schinopsis balansae* (Alzugaray *et al.*, 2005); *Acacia melanoxylon* (Velásquez, 2006); *Aspidosperma quebracho-blanco* (Alzugaray *et al.*, 2006); *Rubia fruticosa* (Marrero *et al.*, 2007); *Maytenus vitis-idaea* (Bueno *et al.*, 2009) entre otras; para las especies en estudio existen pocos reportes acerca de su uso.

En la prueba del índigo carmín, las partes teñidas son las muertas; la mejor respuesta que obtenemos puede deberse a la facilidad para considerar los daños. En los ensayos realizados se observó que el $48,78\% \pm 1,73$ de las semillas de *D. regia* (Figura 2-A ver Anexo) y el $58,82\% \pm 1,41$ de las de *E. contortisiliquum* no son viables (Figura 2-B ver Anexo; Tabla 1).

Teniendo estos test una fuerte carga de subjetividad en la interpretación de los resultados, basada principalmente en la experiencia del analizador, podemos suponer que es más difícil interpretar zonas de las semillas donde el tejido está muerto, que pobemente teñidas por el tetrazolio. Siempre puede deberse a la falta de tonalidad o errores en la manipulación, siendo difícil interpretar la importancia de zonas que pueden ser básicas para el desarrollo del embrión y posterior germinación de las semillas. Esta duda es menos frecuente en el caso del índigo ya que la tinción de las zonas muertas define claramente cómo se encuentra la semilla (Moreno Álvarez *et al.*, 2001; Prieto Méndez *et al.*, 2011).

Tabla 1: Porcentaje de viabilidad/daño por métodos destructivos: Prueba del índigo carmín y Prueba Topográfica por Tetrazolio. Referencias: **V**: viables y **NV**: no viables; según patrón de referencia tomado de Pivaral Leiva, 1999.

Método	<i>D. regia</i>		<i>E. contortisiliquum</i>	
	V	NV	V	NV
Índigo carmín	51,21%±0,83	48,78%±1,73	41,17%±1	58,82%±1,41
Tetrazolio	73,49%±1,60	26,50%±1,37	55,83%±0,75	44,16%±0,54

Detección de daño en semillas por método no destructivo

A través de imágenes radiográficas se han identificado propiedades estrechamente relacionadas con la viabilidad y el vigor de las semillas. Cuando los rayos X pasan a través del objeto, se absorbe esta radiación primaria en distinto grado por el objeto, dependiendo de su espesor, densidad, composición química y de la longitud de onda de la radiación. Los rayos X pasan a través del objeto creando la imagen radiográfica del espécimen sobre un film fotográfico, platina o cámara fluorescente. Las áreas que aparecen oscuras en la imagen obtenida son las más fácilmente penetradas por los rayos, o sea que representan las áreas del espécimen a través de las cuales ha pasado relativamente más radiación, oscureciendo el film. Las áreas claras representan las partes mucho más densas del objeto, es decir con algún daño, dificultando el paso de la radiación (Alzugaray *et al.*, 2006; Corona Mora, 2015).

Los estudios para la detección de daño de esta población permitió constatar la existencia de un elevado porcentaje semillas sin daño con la técnica de rayos X para *D. regia* y *E. contortisiliquum* (86,16%±5,93 y 87%±2,30, respectivamente); en comparación con la técnica de Índigo carmín (51,21%±0,83 y 58,82%±1,41, respectivamente), que define claramente daño en la semilla (Moreno Álvarez *et al.*, 2001; Prieto Méndez *et al.*, 2011); aunque como las especies en estudio poseen testa muy dura, no se descarta que en la remoción de la misma para el acondicionamiento de la prueba de Índigo carmín, se hayan dañado las semillas, lo que se tradujo en un porcentaje menor de semillas sin daño.

Por ello se confirma en este trabajo, la utilidad que reviste el empleo de los análisis radiográficos en el estudio de la viabilidad/estado de las semillas lo cual ha sido puesto de manifiesto para otras especies forestales (Nieto de Pascual, 1995; Solís, 2002). Esta prueba proporciona un análisis rápido y bastante preciso de las estructuras internas de la semilla, identificando aquellas semillas vacías, dañadas por insectos o pobemente desarrolladas (Bonner, 1998; Cicero *et al.*, 1998). Sin embargo, no brinda tan clara resolución de las estructuras internas como el análisis de imágenes provenientes del uso de los métodos de resonancia magnética y tomografía computarizada (Iglesias *et al.*, 2006).

Tabla 2: Porcentaje de viabilidad/daño por métodos destructivos/no destructivos: Prueba del índigo carmín y Placas radiográficas. Referencias: **C/D-S/D**: Con daño y sin daño respectivamente. Se trabajó con los promedios de ambos áboles.

Método	<i>D. regia</i>		<i>E. contortisiliquum</i>	
	S/D	C/D	S/D	C/D
Índigo carmín	51,21%±0,83	48,78%±1,73	58,82%±1,41	41,17%±1
RX	86,16%±5,93	13,81%±2,15	87%±2,30	13,13%±1,56

La precisión de las estimaciones se determinó mediante una matriz de confusión que es una forma de verificar la exactitud de los métodos utilizados; la coincidencia hace referencia al porcentaje de semillas que fue correctamente asignada a las diferentes categorías (semillas con daño y sin daño).

En la tabla 3 se presenta la evaluación de la clasificación final de las semillas con la matriz de confusión mediante dos métodos que pueden detectar daños en las semillas, como lo son prueba del índigo carmín y de rayos X; los resultados obtenidos muestran que la coincidencia en semillas sin daño es del 68,26% y 47,90% (Tabla 3) para *D. regia* y *E. contortisiliquum* respectivamente; mientras que comparando las técnicas en semillas con daño se obtuvo un alto porcentaje de coincidencia (68,10%) en *E. contortisiliquum* para semillas con daño; lo que podría ser considerado como aceptable, sobre todo en ésta última especie y para esta categorización, ya que ambas técnicas poseen el mismo principio de identificación. Es decir que son confiables los resultados de ambas técnicas para caracterizar semillas sin daño en *D. regia* y semillas con daño para *E. contortisiliquum*.

Tabla 3: Evaluación de la clasificación final del sistema de determinación de viabilidad/daño por método destructivo/no destructivo en semillas de *D. regia* y *E. contortisiliquum* (con daño/sin daño), por matriz de confusión.

	Clasificación Índigo carmín	Clasificación Rayos X	Coincidencia %
<i>D. regia</i>			
		Sin daño	Con daño
Sin daño 51,21		86,16	34,95
Con daño 48,78		13,81	34,97
			68,26%
			71,68%
<i>E. contortisiliquum</i>			
		Sin daño	Con daño
Sin daño 58,82		87	28,18
Con daño 41,17		13,13	45,69
			47,90%
			68,10%

Clasificación de semillas

Biometría de semillas.

Se realizó biometría de semillas para determinar si es posible utilizarlo como un sistema de clasificación para las especies en estudio, debido a que no se han encontrados antecedentes al respecto; pero si los hay para otras especies forestales donde la morfometría de semillas resulta una herramienta útil para la clasificación de las mismas (Fontana *et al.*, 2015).

La morfometría ha sido cercana a la estadística o al álgebra más que a la morfología misma, y en cierto sentido esa percepción es correcta ya que la morfometría es una rama del análisis matemático de la forma (Atchley *et al.*, 1976; Corruccini, 1977; Albrecht, 1978). Una limitación de la morfometría tradicional es que las medidas no transmiten información sobre la estructura geométrica, sino que se trata usualmente de segmentos lineales (Atchley y Anderson, 1978; Hills, 1978; Dodson, 1978). En respuesta a estas limitaciones surgió lo que conocemos como Morfometría geométrica, descripta como “una fusión

empírica de la geometría con la biología” (Bookstein, 1982); en ella no ha sido posible analizar separadamente la “forma” del “tamaño”, debido a que son características biológicas que están íntimamente ligadas (Zeldicht *et al.*, 2004), es decir, organismos de diferentes tamaños tendrán diferentes formas aunque sean de la misma especie, lo que se debe al desarrollo y crecimiento natural u ontogenético de los organismos vivos.

Actualmente no se cuenta con suficientes estudios que aborden de manera integral el análisis de la calidad en relación con los niveles de variación morfométrica de las semillas, particularmente de las especies en cuestión. Las variables frecuentemente evaluadas en la descripción morfológica de semillas puede lograrse mediante análisis de imagen, que se centran en aspectos biométricos como la longitud y el ancho (Illipronti *et al.*, 1997, 1999; Dehghan-Shoar *et al.*, 1998; Chtioui *et al.*, 1998), el área (Chtioui *et al.*, 1998; Dehghan-Shoar *et al.*, 1998), la forma (Sahoo *et al.*, 2000) de acuerdo a figuras geométricas o adecuación a modelos matemáticos (Chtioui *et al.*, 1998; Ohsawa *et al.*, 1998; Illipronti *et al.* 1999), y peculiaridades morfológicas (Dehghan-Shoar *et al.*, 1998). Hay informes de mediciones específicas en testas, como estudio del color (Casady *et al.*, 1992; Sahoo *et al.*, 2000), textura (Sahoo *et al.*, 2000) y aspectos tridimensionales (Chtioui *et al.*, 1998). La variable tamaño de las semillas induce a clasificaciones de poca precisión, mientras que la forma categoriza mejor, pues se asocia más con el genotipo (Sahoo *et al.*, 2000), logra alta discriminación de especies al realizar ajustes matemáticos (Neuman *et al.*, 1987; Sapirstein *et al.*, 1987) y se describe como un factor de interés útil para el sistemático (Bengoechea y Gómez Campo 1975). De este modo, la forma constituye un importante descriptor en la evaluación de recursos genéticos y para discriminar entre los distintos vegetales (Illipronti *et al.*, 1997; Ohsawa *et al.*, 1998).

En la tabla 4 y 5 puede observarse el número de semillas por vaina en promedio, que es similar para ambos arboles tanto en *D. regia* como en *E. contortisiliquum*; en tanto que en las semillas de *D. regia* para las medidas analizadas longitud, ancho, relación longitud/ancho se encontraron diferencias significativas entre árboles y entre vainas; mientras que la variable área se mantiene constante sin diferencias entre las vainas del árbol 2; lo mismo ocurre para longitud de las semillas del árbol 2 y área de las semillas del árbol 1 de *E. contortisiliquum*. Para poder afirmar que algunas de las medidas tomadas en este ensayo, es útil para determinar un sistema de clasificación de semillas, serían necesarias mayores mediciones (mayor cantidad de árboles y vainas por árbol), pero sin duda la caracterización morfométrica de las semillas ofrece una herramienta interesante para la determinación de calidad u homogenización de lotes.

Tabla 4: Caracterización morfométrica de las semillas de *D. regia*. Tamaño (longitud, ancho), relación longitud/ancho (L/A) y área expresados en mm y mm². Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

<i>D. regia</i>		Nº de semillas/vaina	Longitud(L)	Ancho(A)	L/A	área(a)
Árbol 1	V1	14	18,86±3,61bc	7,21±3,75bc	13,07±0,92bc	1,41±0,1b
	V2	27	17,30±1,61ab	4,80±1,13a	11,20±1,27abc	1,25±0,16b
	V3	30	17,60±2,08ab	4,80±1,13ab	11,20±1,27abc	0,71±0,12a
	V4	20	18,80±1,79bc	6,15±0,93bc	12,48±1,32a	0,92±0,17a
	V5	28	17,54±3,06ab	5,50±3,06ab	11,25±1,43ab	1,14±0,2b
	V6	27	17,74±2,47bc	5,41±0,69bc	11,57±1,28abc	1,02±0,19ab
	V7	27	20,85±0,72d	6,22±0,58d	13,74±0,53c	1,32±0,09b
	V8	31	19,84±1,07c	5,68±0,60c	12,68±0,70bc	1,02±0,11ab

	\bar{X}	25,5				
Árbol 2	V1	22	19,18±1,92bc	6,36±0,66ab	12,59±1,22ab	1,12±0,14a
	V2	20	19,35±2,21c	6,05±0,83ab	12,60±1,27ab	0,99±0,21a
	V3	27	17,96±1,51a	5,89±0,80a	12,04±0,98ab	0,7±0,11a
	V4	24	19,79±1,44bc	6,75±0,79b	13,27±0,87ab	1,32±0,2a
	V5	23	18,35±158b	6,39±0,84ab	12,26±1,05ab	0,92±0,13a
	V6	25	17,64±1,98a	5,72±0,84a	11,68±1,41a	0,98±0,23a
	V7	33	18,61±1,66b	5,85±0,71a	12,23±0,96b	1±0,2a
	V8	30	19,36±14,7c	6,17±0,70ab	12,9±0,96ab	1,3±0,26a
	\bar{X}	25,5				

Tabla 5: Caracterización morfométrica de las semillas de *E. contortisiliquum*. Tamaño (longitud, ancho), relación longitud/ancho (L/A) y área expresados en mm y mm². Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

<i>E. contortisiliquum</i>	Árbol 1	Nº de semillas/vaina	Longitud (L)	Ancho (A)	L/A	área(a)
V1	14	11±1,41c	5,79±0,43a	8,39±0,94bc	0,43±0,06a	
V2	17	11,35±1,0bc	5,47±0,62ab	8,41±0,80a	0,6±0,06a	
V3	12	9,83±0,58a	5,75±0,45ab	7,92±0,29abc	0,58±0,05a	
V4	13	11±1,00bc	5,54±0,66ab	8,27±0,55ab	0,54±0,09a	
V5	17	9,41±1,12ab	5,59±0,87ab	7,5±0,80a	0,52±0,08a	
V6	10	11,1±0,99bc	6,30±0,82b	8,7±0,70c	0,49±0,06a	
V7	11	10,87±1,19bc	5,87±0,52ab	8,37±0,68bc	0,59±0,08a	
V8	14	11,43±1,22c	5,64±0,50ab	8,54±0,76bc	0,67±0,12a	
\bar{X}	13,5					
Árbol 2	V1	13	10,85±0,90a	6,23±0,83abc	8,54±0,78b	0,51 ±,06a
	V2	14	10,71±1,86a	5,71±0,47a	8,07±1,00a	1,03±0,19abc
	V3	16	11,56±1,03a	6,31±0,79ab	8,94±0,82b	0,72±0,11abc
	V4	11	10,18±2,04a	6,55±1,44abc	8,45±1,63ab	0,73±0,24ab
	V5	15	11,93±1,03a	6,73±0,80c	9,33±0,90b	0,91±0,13abc
	V6	14	10,93±0,83a	6,43±0,94abc	8,68±0,91b	0,81 ± 0,11bc
	V7	10	10,80±1,23a	6,70±1,06bc	8,75±103ab	1,03±0,1c
	V8	12	10,67±0,89a	6,33±0,89abc	8,33±0,65b	0,9±0,13abc
	\bar{X}	13,12				

Caracterización colorimétrica de las semillas

Respecto del color (Figura 4 ver anexo), en *D. regia* el 40,79% de las semillas del árbol 1 presentaron una coloración 10YR 4/6 marrón amarillento oscuro, en segundo orden el 39,30% presentó la coloración 10YR 3/6 marrón amarillento oscuro; mientras que en el árbol 2 el 53,43% presentó la coloración 10YR 6/6 amarillo amarronado y en segundo orden el 27,94% 10YR 5/6 marrón amarillento.

En *E. contortisiliquum* el 33,92% de las semillas del árbol 1 y el 35,92% del árbol 2 presentaron una coloración 10YR 4/6 marrón amarillento oscuro y en segundo orden el 16,96% y el 21,35% respectivamente la coloración 7,5YR 3/4 marrón oscuro.

El color marrón amarillento oscuro es el que presenta la mayor frecuencia en las semillas de ambas especies en estudio. Si bien existe poca bibliografía acerca del uso de esta herramienta para la clasificación de semillas forestales, Jorrati de Jimenez *et al.* (2011) la menciona para las semillas de *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* y en *P. alba* Fontana *et al.* (2015); mientras que Tenorio *et al.* (2008) destaca la importancia de evaluar la variación del color, ya que se ha encontrado en *Cecropia obtusifolia* que influye en la germinación.

Si bien existe el antecedente del uso de otra clasificación colorimétrica en semillas de *D. regia*, como es el de la carta de colores de la Royal Horticultural Society Color Chart RHS (2007); donde se describen de un color café claro y en su mayoría homogéneas (Torres Lozada, 2015); en general esta carta de colores es más utilizada para clasificar distintos órganos, como ser hojas en *Peumus boldus* (Doll *et al.*, 2005), flores, pedúnculos florales, epidermis, pulpa de frutos de *Prunus serotina* (INIAP, 2013), entre otros.

En el procesamiento de semillas forestales es frecuente someter a los lotes, a un conjunto de operaciones para obtener semillas uniformes en tamaño, forma, color y que estén libres de contaminantes extraños (NTON, 2007); donde la tonalidad de su cubierta, es un fuerte componente de clasificación así como las implicancias que pudiera tener este comportamiento tan variable en los pulsos poblacionales o la dinámica de las distintas especies (Segura *et al.*, 2013).

El color de la cubierta seminal es un importante factor que regula la dormición de la semilla (Torada y Amano, 2002) y está influenciado por las condiciones ambientales. La pigmentación de la cubierta está correlacionada con reducidas tasas de imbibición en varias especies de Fabaceae (De Souza y Marcos-Filho, 2001). De todas formas en nuestro caso, para tomar este parámetro como sistema de clasificación de semillas serían necesarios mayores análisis (más cantidad de individuos y frutos, varios años de cosecha, etc), ya que en algunas especies forestales como ser *Astragalus nitidiflorus*, semillas del mismo color pero de distintos años demostraron comportamientos germinativos muy dispares (Segura *et al.*, 2013).

Ensayos de tratamientos pregerminativos para la promoción de la emergencia

En primera instancia, se tomó al azar un lote de semillas de ambas especies y se le practicó el T7 como control, pero al observar una alta heterogeneidad en la germinación, se las clasificó por tamaño (tomando como referencia la longitud en mm):

D. regia: grandes: 20 mm; medianas: 15-20 mm; chicas: \leq 15 mm.

E. contortisiliquum: grandes: \geq 11 mm; medianas: 7-11 mm; chicas: \leq 7 mm.

Al observar los resultados expresado en la Tabla 6, se continuó los siguientes ensayos con semillas medianas de ambas especies.

Tabla 6: Porcentaje de germinación de semillas de *D. regia* y *E. contortisiliquum* sometidas a escarificado mecánico (T7-Control) y clasificadas por tamaño.

Tamaño de semillas	grandes	chicas	medianas
--------------------	---------	--------	----------

<i>D. regia</i>	16%±1,01	14%±0,8	38%±0,74
<i>E. contortisiliquum</i>	13,30%±1,10	15%±0,96	31,66%±0,37

Las semillas de *D. regia* y *E. contortisiliquum* presentan un estado de latencia debido a la dureza de sus tegumentos; para aumentar el porcentaje de germinación es necesario romperla usando métodos de escarificación (Tapia *et al.*, 2014 a, b; Perea *et al.*, 2008). Este tipo de latencia es frecuente en las especies de Fabaceae; Rolston (1978) reportó que de 260 especies evaluadas de esta familia, aproximadamente el 85 % presentaban semillas con tegumentos, total o parcialmente impermeables, señalando además que se debe a la presencia de un estrato de células epidérmicas tegumentarias en forma de empalizada asociadas a una capa cuticular cerosa.

En la tabla 7 se observan los resultados de los distintos tratamientos de escarificado para la promoción de la emergencia de las semillas de ambas especies; sobre el porcentaje final (% E) y tiempos de emergencia en *D. regia* con el escarificado físico de las semillas, el T2 es el que presentó los valores más altos de emergencia 95±2 % ; mientras que los tratamientos con escarificado mecánico, el que mejor resultó es el T6 donde la ruptura física de las semillas se realizó mediante licuado a baja velocidad por 30 segundos, donde se registró un 62±2% de emergencia. En general al combinar ambos métodos de escarificado, no se obtuvieron mejores resultados que los antes citados.

En semillas de *E. contortisiliquum* para los distintos tratamientos pregerminativos; resultó con mayor eficacia el escarificado mecánico, donde el T6 registró un 92,67±1,52% y el T7 (lijado de las semillas) un 71,33±1,53% de emergencia; en comparación con el método de escarificado más adecuado en semillas de *D. regia*, para las de *E. contortisiliquum* el escarificado físico no demostró ser el más efectivo en la promoción de la emergencia, ya que se registraron los menores valores (entre 8±1 y 19,33±0,58%) en dichos tratamientos.

Tabla 7: Promoción de la emergencia de semillas de *D. regia* (*Dr*) y *E. contortisiliquum* (*Ec*).

T	(% E)		TI (días)		TE 50% (días)		TE 10-90 (días)	
	<i>Dr</i>	<i>Ec</i>	<i>Dr</i>	<i>Ec</i>	<i>Dr</i>	<i>Ec</i>	<i>Dr</i>	<i>Ec</i>
1	25±1c	19,33±0,58c	11,00±1c	7,67±1,53a	-	-	-	-
2	95±2f	8,00±1b	12,67±1,53c	10,67±1,15bc	12,33±1,15b	-	12,00±1a	-
3	62,00±2,00e	17,00±2c	18,67±1,53d	12,33±1,51bc	19,67±0,58d	-	-	-
4	-	4,33±1,54a	-	12,00±1,00bc	-	-	-	-
5	56,00±1d	55,33±1,53e	17,33±0,58d	10,67±1,52bc	18,00±1c	16,67±1,51c	-	-
6	63,00±1e	92,67±1,52f	11,00±1c	11,53±2bc	-	13,00±2b	-	5,33±1,54b
7	7,00±1b	71,33±1,53e	8,00±1b	10,00±2ab	-	15,67±0,58c	-	-
8	6,67±15b	10,00±1b	12,00±1c	13,33±1,53c	-	-	-	-

Referencias: Porcentaje de emergencia total (% E), tiempo para iniciar la emergencia (TI), tiempo para alcanzar el 50 % de la emergencia total (TE 50) y lapso entre la ocurrencia del 10 y 90 % de la emergencia total (TE 10-90).

El propósito de remojar las semillas en agua caliente es modificar las cubiertas duras, remover los inhibidores, ablandar las semillas y reducir el tiempo de germinación. Este tratamiento a temperaturas y tiempos de inmersión variables, han resultado ser altamente efectivos para romper la latencia en varias especies (Atencio *et al.*, 2003; Razz y Clavero, 1996) y aunque requieren de cuidados especiales, son

económicos, fáciles y seguros de aplicar. El choque de calor al sumergir las semillas en agua caliente puede ser más efectivo que la escarificación mecánica para algunas especies pero los óptimos de temperatura y tiempo de remojo son altamente dependientes de la especie y de no determinarlos se pueden tener resultados adversos (Piroli *et al.*, 2005; Zida *et al.*, 2005). Liu *et al.* (1981) por su parte señalan que la exposición al agua caliente ocasiona una expansión térmica que separa o destruye las células columnares de la capa de macroesclereidas lo que permite que el agua penetre fácilmente y reduzca significativamente la viabilidad de las semillas.

En semillas de *Bauhinia monandra* y *B. ungulata*, por ejemplo el remojo en agua caliente a temperatura de 80 °C inhibió la germinación (Alves *et al.*, 2000); resultados similares se han reportado también para semillas de *E. contortisiliquum* (Contro y Matos, 2004).

Si bien Tapia *et al.* (2014a) han presentado un protocolo de escarificado para *D. regia* el que incluye H₂SO₄ 98 % con el cual se logró un 60 % de emergencia, con el lijado de las semillas se aumentó a 75 % la germinación. En el presente trabajo se han mejorado dicho parámetros sin necesidad de recurrir al escarificado químico, aunque ha sido efectivo para mejorar la germinación de innumerables especies (Piroli *et al.*, 2005; Hermansen *et al.*, 2000), el tiempo de exposición al ácido debe ser exactamente el necesario para ablandar las cubiertas seminales sin que se afecte el embrión (Atencio *et al.*, 2003; Hermansen *et al.*, 2000), por ello muchas veces no resulta práctico. Tratar las semillas con ácido sulfúrico puede ser factible para viveros comerciales a gran escala que dispongan del ambiente y herramientas de trabajo adecuadas y seguras para la manipulación de este tipo de químicos; sin embargo, puede que no sean apropiados para pequeñas comunidades o viveros caseros comunitarios de áreas de pocos recursos ya que puede ser difícil de obtener, su manejo implica riesgos y es costoso (Hermansen *et al.*, 2000).

Tapia *et al.* (2011, 2013, 2014b) comprobó que en semillas de *E. contortisiliquum*, la escarificación mecánica que consistente en un lijado suave del tegumento tiene una mayor influencia en la germinación; coincidente con los resultados obtenidos en este ensayo.

Los tratamientos de escarificación mecánica o con agua caliente, han demostrado su eficacia en varias especies de Fabaceae, entre las que se encuentra *E. contortisiliquum* (Bertsch-Hernández ,1985). Por su parte Eibl *et al.* (1994) y Engel y Parrotta (2001) afirman que las semillas de dicha especie requieren un proceso de escarificación para mejorar su porcentaje de germinación; mientras que Rossini Oliva *et al.* (2006) ha logrado un 100% de semillas germinadas sin tratamiento alguno; posiblemente estas diferencias en el germoplasma, no solo de esta especie sino de muchas otras e inclusive entre especies de un mismo género, pueda deberse a la dormancia de las semillas, pero también deben intervenir otros factores, como ser edáficos o climáticos (Rossini Oliva *et al.*, 2005).

En *D. regia* los tratamientos de escarificación también afectaron la velocidad del proceso de emergencia (Tabla 7); el inicio de la emergencia (I) se vio favorecido por el T7 a los 8 días y el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de la emergencia total (E50) en el T2 fue el más favorecedor (12,33±1,15 días), coincidentemente con el mayor porcentaje de emergencia total.

El único de todos los tratamientos pregerminativos que agilizó el lapso entre la ocurrencia del 10 y 90 % de la emergencia de las plántulas (E10-90) fue el T2 con 12±1 días.

Martínez Ramírez (1998) informa que la germinación de semillas de *D. regia* ocurre dentro de las dos primeras semanas después de la siembra, concentrándose en mayor cantidad desde el 9º día hasta el 15º día después de efectuada la siembra con un tratamiento de inmersión en agua en ebullición durante un periodo de cinco minutos, obteniendo así un 54,33% de semillas germinadas; mientras que Ataíde *et al.* (2013) obtuvo con un escarificado combinado un 71% de germinación acumulado, agilizando la

emergencia desde el 6º y hasta el 16º día; en este ensayo se logró optimizar el porcentaje de emergencia en el mismo tiempo promedio pero con distinto tratamiento pregerminativo.

En cuanto a *E. contortisiliquum*, todos los tratamientos de escarificación afectaron positivamente la velocidad del proceso de emergencia (Tabla 7). El inicio de la emergencia (I) oscilo entre $7,67\pm1,53$ y $13,33\pm1,53$ días, viéndose favorecido por el T1 con el menor tiempo; mientras que el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de la emergencia total (E50) se favoreció coincidentemente con el T6 (13±2 días), que proporcionó el mayor valor de emergencia total. En esta especie también el único de todos los tratamientos pregerminativos que agilizó el lapso entre la ocurrencia del 10 y 90 % de la emergencia de las plántulas (E10-90) fue el T6 con $5,33\pm1,54$ días.

Según Rossini Oliva *et al.* (2006) las semillas de *E. contortisiliquum* inician su germinación antes de transcurrida una semana de efectuada la siembra, precisamente en 3 días, y el 50 % de la emergencia total (E50) se da entre 3-6 días; de hecho valores mucho menores a los registrados en este ensayo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que para determinar cómo sistema de clasificación de semillas de *Delonix regia* y *Enterolobium contortisiliquum*, a la morfometría y colorimetría de semillas, son necesarios mayores análisis, aunque resultó muy productivo el adiestramiento en dichas herramientas.

A fin de evaluar la calidad fisiológica de ambas especies, se logró la interpretación de pruebas de viabilidad y detección de daños en semillas por métodos destructivos y no destructivos; y se demostró la utilidad de estas técnicas que son rápidas, objetivas, sencillas, económicas y reproducibles.

En cuanto al efecto de tratamientos pregerminativos de semillas de para promover la emergencia de semillas *D. regia* y *E. contortisiliquum*, concluimos que para *D. regia* el mejor tratamiento para lograr el objetivo propuesto es el escarificado físico de las semillas, sumergiéndolas por 15 minutos en agua a 100 °C, sacar las semillas y dejarlas enfriar a exposición natural de aire, para luego sembrarlas. Mientras que para *E. contortisiliquum* resultó con mayor eficacia el escarificado mecánico, con ruptura del tegumento mediante licuado a baja velocidad por 30 segundos, previo a la siembra.

BIBLIOGRAFIA

- Albrecht, G. 1978. Some comments on the use of ratios. Systematic Zoology, 27, 67–71.
- Alves, A.; Medeiros-Filho, S.; Andrade-Neto, M.; Teófilo. E. 2000. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Brito e *Bauhinia ungulata* L., Caesalpinoideae. Revista Brasileira de Sementes 22(2): 139-144.
- Alves, E.; Bruno, R.; Oliveira, A.; Alves, A.;Paula, R. 2005. Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth., sobre a germinação e vigor. Revista Árvore (29), 877-885.
- Alzugaray,C.; Carnevale, N.; Salinas, A.; Pioli, R. 2005. Observations on Seed Quality of *Schinopsis balansae* Engl., a Tree Species Endemic to South America. Seed Technology. 27 (1): 49-58.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A.; Pioli, R. 2006. “Calidad de semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht”. Rev. Ciencias Forestales – Quebracho (13):26-35.

- Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A. 2007. Evaluación de la calidad de las semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. y *Schinopsis balansae* Engl. mediante la prueba de rayos X. Revista de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias UNR 11: 51-59.
- Ataíde, G.; Bicalho, E.; Cunha Fernandes dos Santos, D.; Castro, V.; Alvarenga, R.; Mantovani, E. 2013. Superação da dormência das sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. Rev. Árvore 37(6):1145-1152.
- Atchley, W.; Anderson, D. 1978. Ratios and the statistical analysis of biological data. Systematic Zoology, 27, 71-78
- Atchley, W. R.; Gaskins, C.; Anderson, D. 1976. Statistical Properties of Ratios. I. Empirical Results. Syst. Biol., 25(2):137-48.
- Atencio, L.; Colmenares, R.; Ramírez-Villalobos, M.; Marcano, D. 2003. Tratamiento pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltophorum pterocarpum*) Fabaceae. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 20(1): 63-71.
- Bengoechea, G.; Gómez Campo, C. 1975. Algunos caracteres de las semillas en la tribu Brassiceae. Anales del Instituto Botánico Antonio José Cavanilles, 32 (2):793-841.
- Benito-Matías, L.; Herrero Sierra, N.; Jiménez, I.; Peñuelas, R. 2004. Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: test de tetrazolio e índigo carmín. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales, ISSN 1575-2410, Nº17, págs. 23-28.
- Bertsch-Hernández, S. 1985. Germinación y crecimiento del guacanaste (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb.) en vivero y en campo. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Costa Rica, C.R., 58 p.
- Bewley, J.; Black, M. 1994. Seed: Physiology of Development and Germination. Plenum Press. New York.
- Black, R. y F. El Hadi. 1990. Presowing treatments of Acacia senegal seed: germination and growth. Trop. Agric. 69(1): 15-20.
- Bonner, F. 1984. Testing of seed quality in Southern Oaks. Research Note SO-306.
- Bonner. 1998. Revistas - Cuadernos de Biodiversidad - 2005, N. 19. Fecha de publicacion : ene-2006
- Bookstein, F. 1982. Foundations of morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics. Vol. 13. 451-470
- Bravato, M. 1974. Estudio morfológico de frutos y semillas de las Mimosoideae (Leguminosae) de Venezuela. Acta Botánica Venezolana 9(1-4): 317-361.
- Bueno, M.; Alzugaray, C.; Giubileo, A.; Severina, C.; Carnevale, N. 2009. Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Maytenus vitis-idaea* cultivadas *in vitro*. BOSQUE 30(3): 146-150.
- Casady, W.; Paulsen, M.; Reid, J.; Sinclair, J. 1992. A trainable algorithm for inspection of soybean seed quality. American Society of Agricultural Engineers. 35(6): 2027-2034.
- Chtioui, Y.; Bertrand, D.; Barba, D. 1998. Feature selection by a genetic algorithm application to seed discrimination by artificial vision. Journal of the Science of Food and Agriculture 76:77-86.
- Cicero, S.; Heijden, G.; Van der Burg, W.; Bino, R. 1998. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays L*) by X-ray and digital imaging. Seed Science and Technology, v.26, n.3, p.603-612.
- Contro, U.; De Matos, M. 2004. Dormancy breaking and germination of *Enterolobium contortisiliquum*(Vell.) Morong seed. Brazilian Archives of Biology and Technology 47(6): 851-854.
- Cordero, C. 1994. Determinación de la viabilidad en semillas de *Bombacopsis quinata* y *Tabebuia rosea*, comparación con resultados de viveros. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tesis de especialidad. 64 p.
- Corona Mora, D. 2015. Producción e indicadores reproductivos de conos y semillas de *Pinus johannis* M-F Robert en cuatro períodos de colecta, en poblaciones naturales del noreste de México. Tesis para optar el grado de Ingeniero Forestal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, México. 67 pp.
- Corruccini, R. 1977. Correlation properties of morphometric ratios. Systematic Zoology, 26, 211-214

- De Souza, F.; Marcos-Filho, J. 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. Revta Brasil Bot São Paulo, 24(4), Pages 365 - 375.
- Dehghan-Shoar, M.; Hampton, J.; Haslett,S. 1998. Identification of, and discrimination among, lucerne (*Medicago sativa L.*) varieties using seed image analysis. Plant Varieties and Seeds11:107-127.
- Dodson, P. 1978. On the use of ratios in growth studies. Systematic Zoology, 27, 62–67.
- Doll, U.; Aedo Ortiz, D. ;López Carrera, P. 2005. Caracterización morfológica de tres procedencias de boldo (*Peumus boldus*) en una plantación joven de 6 años. Bosque (Valdivia) 26 (3): 45-54. Donoso, C. 1981. Ecología.
- Eibl, B.; Silva, F.; Carvallo, A.; Czerepak, P.; Kehl, J. 1994. Ensayos de germinación análisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones, R.A. Revista Forestal Yvyraretá. Resumenes, 5 (5): 2-3.
- Engel, V.; Parrotta, J. 2001. An evaluation of direct seeding for reforestation of degraded lands in central São Paulo state, Brazil. For. Ecol. Manage. 152 (1-3): 169-181.
- Fontana, M.; Pérez,V.; Luna,C.2015. Influencia de la procedencia geográfica sobre los parámetros morfométricos de semillas de *Prosopis alba*. Multequina 24: 33-45.
- Hampton, J.; Tekrony, D. 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zürich, 117 pp.
- Hermansen, L.; Duryea, M.; Wets, S.; White,T.; Malavash, M. 2002. Pretreatments to overcome seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. Seed Sci. & Technol. 28: 581-595.
- Hills, M. 1978. On ratios – a response to Atchley, Gaskins and Anderson. Systematic Zoology, 27, 61–62.
- Iglesias, L.; Mora, I.; Casas, J. 2006. Morfometría, viabilidad y variabilidad de las semillas de la población de *Pinus hartwegii* del cofre de perote, Veracruz, México. Cuadernos de Biodiversidad 19: 14-22.
- Illipronti Jr., R. A., C. J. Langerak & W. J. M. Lommen. 1997. Variation in and relationships between physical and physiological seed attributes within a soybean seed lot. Seed Science and Technology. 25: 215-231.
- Illipronti Jr., R.A., C. J. Langerak & W. J. M Lommen. 1999. Variation in physical seed attributes relates to variation in growth of soybean seedlings within a seed lot. Seed Science and Technology. 27: 339-357.
- INIAP (INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS).2013. Generación de bioconocimiento para la conservación y uso sostenible de la agro diversidad nativa en el Ecuador en el apoyo a la alimentaria. 49 pp.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA) 1999. International Rules for Seed Testing. Seed Sci. and Technol. Volume 27. 340 pp.
- Jorratti de Jiménez, M.; Di Barbaro,G.; Candia, E.; Vieyra, E. 2011. Caracterización morfológica de semillas y plántulas de tres especies de algarrobos (*Prosopis chilensis*, *P. flexuosa* y *P. nigra*). Estudios preliminares. Biología en Agronomía, 1(2), 16-23.
- Liu, N.; Khatamian; H.; Fretz, T. 1981. Seed coat structure of three woody legume species after chemical and physical treatments to increase seed germination. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(5): 691-694.
- Marrero, P.; Padilla ,D.; Valdés F.; Nogales,M .2007. Comparison of three chemical tests to assess seed viability: the seed dispersal system of the Macaronesian endemic plant *Rubia fruticosa* (Rubiaceae) as an example. Chemoecology 17 (1): 47-50.
- Martínez Ramírez, S. 1998. La germinación de semillas de *Delonix regia* (framboyán) se promueve con agua en ebullición y se inhibe con ácido giberélico.
- Moreno Alvarez; M.; Benito, M.; Herrero Sierra, N.; Domínguez, L.; Peñuelas Rubiraj,S. 2001. Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. Actas del III Congreso Forestal Español. 2001. Granada., Mesa 3: Revista Temas 6: 43-47.
- Munsell Color (Firm), 1975. Munsell soil color charts (1975 ed). Munsell Color, Baltimore, Md.
- Murley, M. 1951. Seeds of the Cruciferae of Northeastern North America.

- Neuman, M.; Sapirstein, H.; Shwedyk , E.; Bushuk, W. 1987. Discrimination of Wheat Class and Variety by Digital Image Analysis of Whole Grain Samples. *Journal of Cereal Science* 6: 125-132.
- Nieto de Pascual, P. 1995. Estudio sinecológico del bosque de oyamel de la cañada de Contreras, Distrito Federal. *Revista Ciencia Forestal en México*, 20, 3-34.
- NTON (Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense), 2007. Norma Técnica obligatoria nicaraguense para la certificación de Semillas y plantas de especies foretales. 24 pp.
- Ohsawa, R.; Tsutsumi,T; Uehara,H.; Namai,H.; Ninomiya, S. 1998. Quantitative evaluation of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) kernel shape by elliptic Fourier descriptor. *Euphytica* 101: 175-183.
- Oliveira, L.; Davide,A.; Moreira,M. 2003. Avaliacao de métodos para quebra da dormencia e para a desinfestacao de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprngel) Taubert. R. Arvore 27(5): 597-603.
- Perea, M.; Pedraza ,G.;Lucero, J. 2008. CFI. Relevamiento de la flora arbórea autóctona en la provincia de Catamarca.
- Piroli, E.; Castillo,C.; Vieira,M.; Udenal ,J. 2005. Germinacao de sementes de canafistula *Peltophorum dubium* (Spreng) Tamb. tratadas para superacto da dormencia. *Colloquium Agrariae* 1(1): 13-18.
- Pivaral Leiva, L.1999. Desarrollo de patrones de tinción de tetrazolio e índigo carmín, para determinar viabilidad en semilla de *Enterolobium cyclocarpum*, (Jacq) Griseb. (Conacaste), *Gliricida sepium* (jacquin) Kunth ex Walper (Madrecacao) y *Delonix regia* (Bojer) Raf. Fl. Tellur. (Flamboyan). Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola. Universidad de San Carlos de Guatemala. 92 p.
- Prieto Méndez, J.; Prieto García, F.; Hernández Cervantes, N.; Domínguez Soto, J.; Román Gutiérrez, A. 2011. Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera. *Multiciencias* 11(2):121-118.
- Razz, R.; Clavero, T.1996. Métodos de escarificación en semillas de *Humboldtiella ferruginea* y *Leucaena leucocephala*. *Rev. Fac. Agron (LUZ)* 13: 73-77.
- RHS Colour Chart. 2007, Royal Horticultural Society, Londres (Gran Bretaña).
- Rolston, M. 1978. Water impermeable seed dormancy. *The Botanical Review* 44: 365-396.
- Rossini Oliva, S.;Valdés,B.; Andrés, M. 2005. Dinámica natural en un área artificial. Plantas invasoras en el Jardín Americano de Sevilla (Andalucía, España). *Lagascalia* 25: 149-168.
- Rossini Oliva, S.; Valdés,B.; Andrés, M.; Márquez Campón, F.; Bueso López,M.2006. Germinación de las semillas en algunas especies americanas de fabaceae y bignoniacae cultivadas en Sevilla (so España). *Lagascalia* 26: 119-129.
- Sacheti, U.; Al-Rawahy,S.1998. The effects ovarious pretreatments on the germination of important leguminous shrub-tree species of the sultanate of Oman. *Seed Sci. y Technol.* 261: 691-699.
- Sahoo, L.; Dadlani,D.; ingh,D.; Sharma,S. 2000. Characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes using laboratory techniques. *Plant Varieties and Seeds*. 13: 31-43.
- Sapirstein, H.; Neuman,M.; Wright,E.; Bussshuk,W. 1987. An instrumental system for cereal grain classification using digital image analysis. *Journal of Cereal Science* 6: 3-14.
- Segura, F.; Aguado, M.; Martínez-Díaz, E.,; Vicente M., Martínez-Sánchez, J. 2013. Efecto "materno medioambiental" en la morfología y germinación de semillas de *Astragalus nitidiflorus*. 6º congreso forestal Español. Vitoria-Gasteiz. 9 pp.
- Solís, R. 2002. Contribución al conocimiento de *Pinus hartwegii* Lindl. De la población del Pico de Orizaba, Veracruz. Tesis de Maestría en Ecología Forestal. Instituto de Genética Forestal Universidad Veracruzana. 132 p.
- Souto, P.; Sales, F.; Souto, J.; Santos, R.; Sousa, A. 2008. Biometría de frutos e número de cementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. no semiárido da Paraíba. *Revista Verde* (3), 108-113.
- Tapia, A.; Romero, A.; Luque, V. 2011. Comparación del Efecto de la Escarificación Física en la Germinación de Semillas de *Ceiba insignis* y *Enterolobium contortisiliquum*. Huayllu-Bios. N° 5: 27-28.

- Tapia, A.; Romero, A.; Luque, V.; Aybar, S.; Gervasoni, P.; Allolio, P. 2013. Valoración de distintas técnicas para la ruptura de la dormición en semillas *Enterolobium contortisiliquum* (Pacará). Biología en Agronomía Volumen 3, No. 2: 41-47.
- Tapia, A.; Romero, A.; Luque, V.; Gervasoni, P.; Aybar, S.; Lobo Furque, A.; Gomez, I. 2014. Determinación de la viabilidad y aplicación de distintas técnicas de escarificación en semillas de *Enterolobium contortisiliquum*. Rev. agron. noroeste argent. 34 (2): 52-53.
- Tenorio-G,G.; Rodríguez-T,D.; LÓPEZ-R,G. 2008. Efecto del tamaño y color de la semillas en la germinación de *Cecropia obtusifolia Bertol* (Cecropiaceae). Agrociencia 42 (5): 585-593.
- Torada, A.; Amano, Y. 2002. Effect of seed coat color on seed dormancy in different environments. Euphytica, 126, Pages 99 - 105.
- Torres Lozada, R. 2015. Análisis de la variación morfológica de semillas y embriones de 10 especies distribuidas en los bosques de la Provincia del Guayas. Tesis para optar al grado de Ingeniero en gestión ambiental. Centro Universitario Guayaquil, Universidad Técnica Particular de Loja. Colombia. 51 pp.
- Velásquez, L .2006. Caracterización del banco edáfico de semillas de *Acacia melanoxylon* R. Brown en dos sitios de la provincia de Concepción. Tesis (Ing For). Universidad de Concepción. Fac. de Zelditch, M.; Swiderski, D.; Sheets, H. 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.Ciencias Forestales. Chile. 34 p
- Verdugo,G.; Marchant,J.; Cisternas, M.; Calderón, X.; Peñaloza, P. 2007. Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa Lindl.* (Orchidaceae) usando análisis de imágenes. Gayana Bot, 64 (2), 232-238. doi :10.4067/S0717- 66432007000200008.
- Zelditch, M.; Swiderski, D.; Sheets, H.2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.
- Zida, D.; Tigabu, M.; Sawadogo,L.; Oden,P. 2005. Germination requirements of seeds of four woody species from the Sudanian savanna in Burkina Fasp, West Africa. Seed Sci. Technol. 33: 581-593.

Anexo:

Condición	Descripción	Condición	Descripción
Viables	Embrión y cotiledón sin teñir	Viables	Embrión o cotiledón teñido
No viables	Embrión y cotiledón teñidos	No viables	Embrión o cotiledón sin teñir
A		B	

Figura 1: Patrón de viabilidad por Prueba del índigo carmín (A) y Prueba Topográfica por Tetrazolio (B), en semillas de *D. regia* y *E. contortisiliquum*.

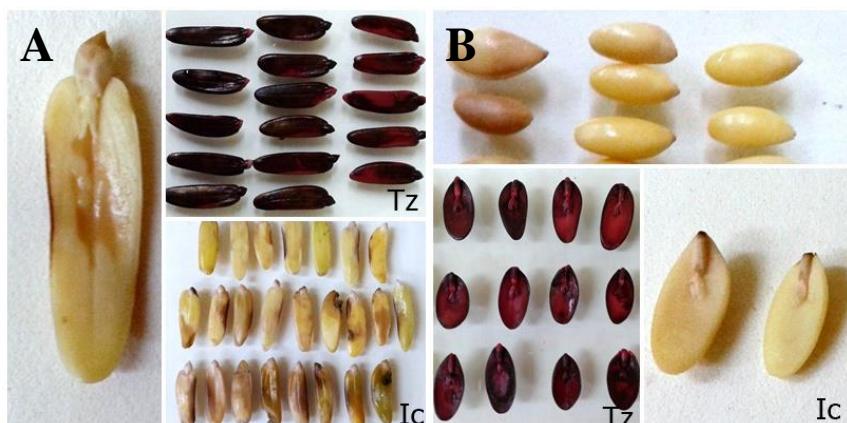


Figura 2: Ensayo de viabilidad por Prueba del índigo carmín y Prueba Topográfica por Tetrazolio, en semillas de *D. regia* (A) y *E. contortisiliquum* (B).

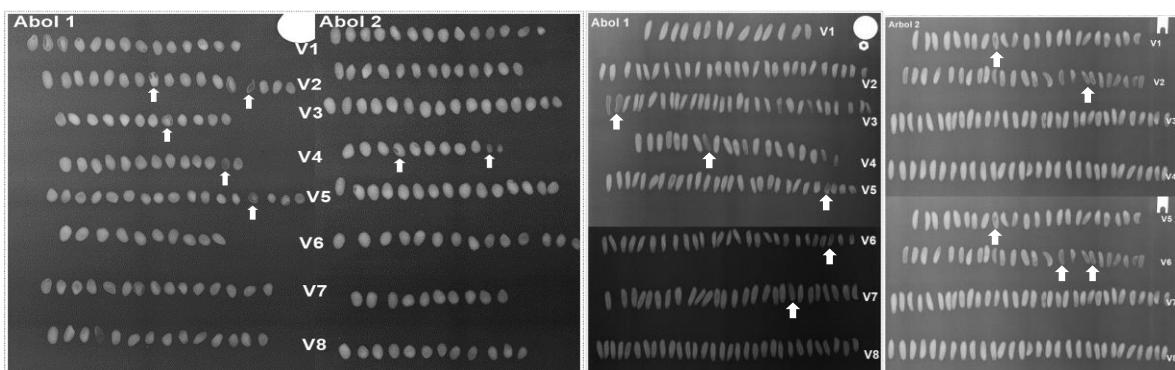


Figura 3: Placas radiográficas de semillas de *D. regia* (izquierda) y *E. contortisiliquum* (derecha). Referencias: V1,2,3....: número de vaina.

color	<i>D. regia</i>		<i>E. contortisiliquum</i>	
	A1	A2	A1	A2
10 YR 3/6 marrón amarillento oscuro	79	9	0	17
10YR 4/6 marrón amarillento oscuro	82	3	38	37
10YR 5/6 marrón amarillento	3	57	12	7
10YR 5/8 marrón amarillento	0	18	10	0
10YR 6/6 amarillo amarronado	1	109	13	0
7,5YR 3/4 marrón oscuro	34	0	19	22
7,5YR 4/4 marrón	2	0	4	2
7,5YR 4/6 marrón fuerte	0	0	0	18
7,5YR 5/4 marrón	0	0	0	0
7,5YR 5/6 marrón fuerte	0	0	12	0
7,5YR 5/8 marrón fuerte	0	4	4	0
2,5Y 5/4 marrón oliva claro	0	3	0	0
2,5Y 5/6 marrón oliva claro	0	1	0	0
2,5Y 6/8 amarillo oliva	0	0	0	0

Figura 4: Frecuencia acumulada de colores según carta de Munsell (1975) para semillas de *D. regia* y *E. contortisiliquum*.