

TRATAMIENTOS QUÍMICOS PARA RECUPERAR LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE CEBOLLA

Carlos Herrera-Corredor^{1¶}; Guillermo Carrillo-Castañeda¹; Víctor A. González-Hernández¹;
José Alfredo Carrillo-Salazar¹; Cecilia Beatriz Peña-Valdivia²;
José Rodolfo García-Nava²

¹Recursos Genéticos y Productividad y ²Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230, MÉXICO. Tel.: 01(595) 9520200. Correo-e: herrera1@colpos.mx (¶ Autor para correspondencia).

RESUMEN

Un factor que limita la disponibilidad de la semilla de cebolla para la producción es su rápido deterioro postcosecha. El objetivo de la investigación fue evaluar la recuperación de la capacidad germinativa en semillas de cebolla envejecidas después de la aplicación de sustancias químicas. Las semillas fueron envejecidas artificialmente durante 48, 96 y 144 h. Posteriormente, se colocaron en soluciones: de ácido giberélico (3.46 mg·L⁻¹), BAP (2.25 mg·L⁻¹), cloruro de calcio (55.50 mg·L⁻¹) y nitrato de potasio (50.50 mg·L⁻¹), por 8 a 12 h de acuerdo con el cultivar. Las semillas embebidas fueron colocadas en condiciones de germinación estándar. El tratamiento con CaCl₂ incrementó el porcentaje de plántulas normales en el cultivar Contessa con 48 h de envejecimiento. Todos los demás tratamientos a la semilla incrementaron el tiempo para alcanzar el T₅₀ y afectaron negativamente la capacidad germinativa. La aplicación de BAP ocasionó la reducción más drástica en el porcentaje de plántulas normales, menor acumulación de biomasa en plántula y consecuentemente pérdida de vigor. Toro y Contessa fueron los cultivares con mayor vigor, Cojumatlán y Crystal white wax mostraron un vigor intermedio y Red burgundy presentó el vigor más bajo.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Allium cepa* L., envejecimiento acelerado, ácido giberélico, BAP, cloruro de calcio, nitrato de pota

CHEMICAL TREATMENTS FOR RECOVERING GERMINATION IN ONION SEEDS

ABSTRACT

A factor limiting the availability of onion seed is its accelerated postharvest deterioration. The research aim was to evaluate the recovery of seed germination in aged onion after application of chemical solutions. The onion seeds were artificially aged for 48, 96 and 144 h. Next the seeds were placed in solutions: gibberellic acid (3.46 mg·L⁻¹), (BAP (2.25 mg·L⁻¹), calcium chloride (55.50 mg·L⁻¹) and potassium nitrate (50.50 mg·L⁻¹), 8 to 12 h according to cultivar. The imbibed seeds were placed in standard germination conditions. The CaCl₂ treatment in aged seeds (48 h) increased the percentage of normal seedlings in the cultivar Contessa. All other seed treatments increased the time to reach T₅₀ and negatively affected germination. The use of BAP caused the higher reduction in the percentage of normal seedlings, lower seedlings biomass and the consequent loss of vigor. Toro and Contessa were the cultivars with greatest vigor, and Crystal white wax and Cojumatlán presented intermediate vigor, while Red burgundy showed the lowest vigor.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Allium cepa* L., accelerated ageing, BAP, calcium chloride, potassium nitrate.

INTRODUCCIÓN

El deterioro en semillas se manifiesta en la reducción de su capacidad germinativa e incremento de plántulas débiles o de bajo vigor (comúnmente consideradas anormales), características que son evidentes durante el establecimiento de la plántula en campo (Veselova y Veselovsky, 2003). Para contrarrestar los efectos negativos del proceso degenerativo en semillas, se han empleado diversos tratamientos con éxito parcial en diversas especies, como el tratamiento químico antes de la siembra (pre-sowing) y el pre-humedecimiento (pre-soaking) con reguladores de crecimiento para mejorar la capacidad germinativa y el vigor, entre otras técnicas (Butola y Badola, 2004; Afzal *et al.*, 2005).

Las giberelinas inducen la expresión de genes que codifican proteínas y enzimas que participan en la movilización de reservas almacenadas (almidones, proteínas y lípidos) durante la germinación. Sin embargo, no controlan totalmente el proceso, de lo cual se infiere que pueden existir otros factores implicados (Peng y Harberd, 2002). El tratamiento de semillas de cebolla con ácido giberélico en un sistema de hydro-priming antes de la siembra, reduce la incidencia de plántulas anormales (Tajbakhsh *et al.*, 2004).

La hormona BAP (otras denominaciones: 6-bencilaminopurina (N-(fenilmetil)-1H-Purina-6-amina, Benciladenina) promueve la división celular, el desarrollo y la germinación, además de retrasar el envejecimiento y la senescencia de hojas (Sarasan *et al.*, 2001; CFNP, 2004; González *et al.*, 2009). Por ello ha sido utilizada en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, para interrumpir la latencia y promover la germinación de semillas. Bautista-Calles *et al.* (2008) señalan que el tratamiento con BAP en semillas de papaya incrementa la velocidad y la tasa de germinación.

El calcio es importante en la generación de paredes celulares nuevas, en particular la lámina media de las células en división. La sustitución de Ca^{2+} por Na^+ de los sitios de enlace de los fosfolípidos de las membranas celulares es un factor que afecta la estabilidad; una baja concentración de Ca^{2+} en el eje embrionario de semillas de maíz puede ser asociado con un crecimiento inicial raquítico en condiciones de salinidad (Ashraf *et al.*, 2001). Adicionalmente es mensajero secundario en condiciones de estrés abiótico, como frío, sequía y salinidad, entre otros (Kyung *et al.*, 2003; White y Broadley, 2003). También se ha encontrado que el cloruro de calcio en semillas mejora la germinación en solución monosalina (Huez *et al.*, 2008).

El KNO_3 está involucrado en la síntesis de proteínas y en el metabolismo de carbohidratos, y por consecuencia en el retraso del envejecimiento de las semillas. Su efecto en semillas de cebolla está relacionado con la disminución del deterioro en las membranas celulares, así como la reducción de la degradación de proteínas en dependencia de las condiciones de almacenamiento (Ilbi y Eser, 2002).

INTRODUCTION

Deterioration in seeds is manifested in the reduction of their germinative capacity and increase on weak seedlings or of low vigor (commonly considered abnormal), characteristics which are evident during the establishment of the seedling in the field (Veselova and Veselovsky, 2003). To counteract the negative effects of the degenerative process in seeds, diverse treatments have been used with partial success in several species, such as the chemical treatment prior to sowing (pre-sowing) and pre-soaking with growth regulators to improve the germination capacity and vigor, among other techniques (Butola and Badola, 2004; Afzal *et al.*, 2005).

The gibberellins induce the expression of genes that codify proteins and enzymes that participate in the mobilization of reserves (starches, proteins and lipids) stored during germination. However, they do not totally control the process, from which it is inferred that there may be other factors involved (Peng and Harberd, 2002). The treatment of onion seeds with gibberellic acid in a hydro-priming system prior to sowing reduces the incidence of abnormal seedlings (Tajbakhsh *et al.*, 2004).

The hormone BAP (other denominations: 6-benzylaminopurine (N-(phenylmethyl)-1H-Purine-6-amine, Benzyladenine) promotes cell division, development and germination, as well as delaying aging and senescence of leaves (Sarasan *et al.*, 2001; CFNP, 2004; González *et al.*, 2009). Thus it has been used in the *in vitro* cultivation of plant tissues, to interrupt latency and to promote seed germination. Bautista-Calles *et al.* (2008) point out that the treatment with BAP in papaya seeds increases speed of germination and germination rate.

Calcium is important in the generation of new cell walls, in particular the middle lamina of dividing cells. The substitution of Ca^{2+} for Na^+ of the bonding sites of the phospholipids of the cell membranes is a factor that affects stability; a low concentration of Ca^{2+} in the embryonic axis of maize seeds may be associated with a rachitic initial growth under conditions of salinity (Ashraf *et al.*, 2001). Additionally, it is secondary messenger under abiotic stress conditions, such as cold, drought and salinity, among others (Kyung *et al.*, 2003; White and Broadley, 2003). It has also been found that calcium chloride in seeds improves germination in monosaline solution (Huez *et al.*, 2008).

KNO_3 is involved in the synthesis of proteins and in the metabolism of carbohydrates, and consequently in the delay of aging of the seeds. Its effect in onion seeds is related to the decrease in deterioration of the cell membranes, as well as the reduction of the degradation of proteins depending on the storage conditions (Ilbi and Eser, 2002).

The objective of the present study was to evaluate the recovery of the germinative capacity and vigor with the application of chemical solutions with gibberellic acid. BAP, calcium chloride and potassium nitrate, in artificially

El objetivo de esta investigación fue evaluar la recuperación de la capacidad germinativa y el vigor con la aplicación de soluciones químicas con ácido giberélico, BAP, cloruro de calcio y nitrato de potasio, en semillas de cebolla envejecidas artificialmente. La hipótesis planteada fue que la aplicación de estas soluciones a la semilla durante la imbibición permite la recuperación de calidad fisiológica de acuerdo con el nivel de deterioro.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, en 2003. Se utilizó semilla de cinco cultivares comerciales de cebolla: Cojumatlán, Contessa, Crystal white wax, Red burgundy y Toro; el porcentaje de germinación inicial fue de 66, 79, 56, 73 y 71, respectivamente. La fecha de cosecha en el empaque correspondió al año 2003, con excepción de Red burgundy, que fue del año 2002. Cojumatlán fue adquirida a granel, el resto estaban envasadas al vacío. Las semillas fueron envejecidas artificialmente durante tres periodos: 48, 96 y 144 h, con base en la metodología de envejecimiento acelerado descrita por Rincón y Molina (1990). Al final del tratamiento de envejecimiento, las semillas se colocaron sobre papel absorbente a temperatura ambiente, para eliminarles el agua excedente. Posteriormente se embebieron en las soluciones experimentadas como se explica a continuación. El ensayo incluyó un tratamiento testigo sin envejecimiento.

Tratamientos de Imbibición con soluciones químicas

Previamente se determinó el tiempo para la imbibición máxima en cada cultivar, tomando como referencia el momento en que hubo indicio de ruptura de la testa o exposición de radícula ≥ 1 mm de longitud. El tiempo registrado para los cultivares Cojumatlán, Red burgundy y Toro fue de 8 h, y para Contessa y Crystal white wax de 12 horas.

El tratamiento de imbibición consistió en la inmersión de muestras de 50 semillas envejecidas y sin envejecer (testigo), en las siguientes soluciones químicas: ácido giberélico ($3.46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), BAP ($2.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cloruro de calcio ($55.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y nitrato de potasio ($50.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Como testigo se utilizó un lote de semillas embebidas en agua. Cada solución (1.5 L) fue colocada en un recipiente de polietileno con capacidad de 2 L con aireación constante suministrada por una bomba de aire para acuario ELITE® 802 (Rolf C. Hagen Inc.) a temperatura ambiente.

Después del tratamiento de imbibición, las semillas fueron desecadas sobre papel absorbente, a temperatura ambiente por 12 h. Finalmente, las semillas fueron germinadas en cajas petri sobre papel absorbente (Wisconsin Park Avenue®) humedecido con agua destilada y se mantuvieron en una cámara para

aged onion seeds. The hypothesis was that the application of these solutions to the seed during imbibition allows the recovery of physiological quality according to the deterioration level.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the Molecular Genetics Laboratory of the Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, in 2003. Seeds of five commercial onion cultivars were used: Cojumatlán, Contessa, Crystal white wax, Red burgundy and Toro; the percentage of initial germination was 66, 79, 56, 73 and 71, respectively. The harvest date on the package corresponded to 2003, with the exception of Red burgundy, which was of 2002. Cojumatlán was acquired in bulk, the rest were vacuum packed. The seeds were artificially aged during three periods: 48, 96 and 144 H, based on the accelerated aging methodology described by Rincón and Molina (1990). At the end of the aging treatment, the seeds were placed over absorbent paper at room temperature to eliminate water excess. Next, they were imbibed in the experimental solutions as is explained below. The assay included a control treatment without aging.

Treatments of imbibition with chemical solutions

Maximum imbibition time was previously determined in each cultivar, taking as reference the moment in which there was an indication of rupture of the testa or exposure of radicle ≥ 1 mm length. Time registered for the cultivars Cojumatlán, Red burgundy and Toro was 8 h, and for Contessa and Crystal white wax, 12 hours.

The imbibition treatment consisted of the immersion of samples of 50 seeds, aged and without aging (control), in the following chemical solutions: gibberellic acid ($3.46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), BAP ($2.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), calcium chloride ($55.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and potassium nitrate ($50.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). As control, a lot of seeds imbibed in water was used. Each solution (1.5 L) was placed in a polyethylene recipient with a 2 L capacity with constant airting supplied by an ELITE® 802 (Rolf C. Hagen Inc.) air pump for aquariums at room temperature.

After the imbibition treatment, the seeds were dried over absorbent paper at room temperature for 12 h. Finally, the seeds were germinated in Petri dishes over absorbent paper (Wisconsin Park Avenue®) moistened with distilled water and maintained in a germination chamber, at a temperature of $28 \pm 5^\circ\text{C}$.

Germination was evaluated every 12 h until completing 108 h, and the accumulated germination curve was generated to calculate the time in which 50 % of the seed population (T_{50}) germinated as response variable. The program CurveExpert® version 1.38 was used (<http://curveexpert.webhop.net/>).

After 144 h (6 days) germination was quantified, and based on its development (ISTA, 1993) the proportion

germinación, a temperatura de $28 \pm 5^\circ\text{C}$.

La germinación se evaluó cada 12 h hasta completar 108 h, y se generó la curva de germinación acumulada para calcular el tiempo en el que germinó 50 % de la población de semillas (T_{50}) como variable respuesta. Se utilizó el programa CurveExpert® versión 1.38 (<http://curveexpert.webhop.net/>).

Después de 144 h (6 días) se cuantificó la germinación, y con base en su desarrollo (ISTA, 1993) se obtuvo la proporción de plántulas normales y plántulas anormales respecto al número total de semillas por tratamiento. Además, se cuantificó la biomasa seca (mg) en la fracción de plántulas normales.

Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de $5 \times 4 \times 5$ tratamientos con seis repeticiones, cuya unidad experimental consistió de 50 semillas. Esto es, cinco soluciones de imbibición (incluye el testigo en agua), cuatro periodos de envejecimiento (0 [testigo sin envejecimiento], 48, 96 y 144 h) y los cinco cultivares indicados.

Los resultados obtenidos de las variables respuesta se sometieron al análisis de varianza mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0, y las diferencias entre tratamientos se estimaron con la prueba de comparación de medias Tukey con 5 % de probabilidad. Previo al análisis de varianza, la proporción de plántulas normales y plántulas anormales expresadas en porcentaje, se transformaron mediante la función $T = \arcsen(y/100)$, donde y es el valor a transformar y T el valor de la variable transformada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias significativas respecto al T_{50} para los factores principales (cultivar, tratamientos de imbibición y envejecimiento), así como en dos de sus interacciones: cultivares x envejecimiento y tratamiento de imbibición x envejecimiento. El 43 % de la variación estimada por tratamientos fue explicada por el factor cultivar, seguido del tratamiento de imbibición con 13 % y el envejecimiento con 7 %, y las interacciones, aunque significativas, apenas explicaron 8.5 % del efecto de los tratamientos.

En los porcentajes de plántulas normales y anormales de cultivares de cebolla también hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los factores principales, y contribuyeron de forma equivalente a la explicación de la variabilidad: tratamiento de imbibición 26 %, cultivar 24 % y envejecimiento 22 %. Las interacciones de segundo orden entre cultivares x tratamientos de imbibición y envejecimiento x tratamientos de imbibición fueron significativas, así como también la triple interacción

of normal seedlings and abnormal seedlings was obtained with respect to the total number of seeds per treatment. In addition, dry biomass (mg) was quantified in the fraction of normal seedlings.

Experimental design

The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of $5 \times 4 \times 5$ treatments with six replicates, whose experimental unit consisted of 50 seeds. That is, five imbibition solutions (including the control in water), four aging periods (0 [control without aging], 48, 96 and 144 h) and the five indicated cultivars.

The results obtained of the response variables were subjected to the analysis of variance by means of the statistical program Statistical Analysis System (SAS) version 9.0, and the differences among treatments were estimated with the Tukey comparison of means test with 5 % likelihood. Prior to the analysis of variance, the proportion of normal seedlings and abnormal seedlings expressed in percentage, were transformed through the function $T = \arcsin(y/100)$, where y is the value to transform and T the value of the transformed variable.

RESULTS AND DISCUSSION

Significant differences were found with respect to the T_{50} for the principal factors (cultivar, imbibition and aging treatments), as well as in two of their interactions: cultivars x aging and treatment of imbibition x aging. 43 % of the variation estimated for treatments was explained by the cultivar factor, followed by the imbibition treatment with 13 % and aging with 7 %, and the interactions, although significant, scarcely explained 8.5 % of the effect of the treatments.

In the percentages of normal and abnormal seedlings of onion cultivars, there were also significant differences ($P \leq 0.05$) for the principal factors, and contributed equivalently to the explanation of variability: imbibition treatment 26 %, cultivar 24 % and aging 22 %. The interactions of the second order among cultivars x imbibition treatments and aging x imbibition treatments were significant, as well as the triple interaction (cultivars x imbibition treatments x aging), which contributed to the explanation of variability with 7, 6 and 11 %, respectively.

In the dry seedling biomass, the statistical analysis showed significant differences for the principal factors (cultivars, aging and imbibition). None of the interactions was significant.

Genotype effect

The Toro cultivar presented the fastest germination, reaching 50 % germination in the shortest time (50.46 h), with respect to the other cultivars. This was related to the high proportion of normal seedlings (57.18 %) and the highest accumulation of biomass in root (15.93 mg) and stem

(cultivares x tratamientos de imbibición x envejecimiento), las cuales contribuyeron a la explicación de la variabilidad con 7, 6 y 11 %, respectivamente.

En la biomasa seca de plántula, el análisis estadístico mostró diferencias significativas para los factores principales (cultivares, envejecimiento y tratamiento de imbibición). Ninguna de las interacciones fue significativa.

(204.41 mg), parameters that indicate Toro as the cultivar with highest vigor. The Contessa cultivar responded slowly in germination ($T_{50} = 63.19$ h), but despite this fact it had a high percentage of normal seedlings (52.65 %) and the lowest percentage of abnormal seedlings among the cultivars (9.06 %), even with respect to Toro (11.84 %); furthermore, the accumulation of dry biomass in the seedling was the highest among the cultivars (root, 20.84 mg; stem,

CUADRO 1. Efecto del cultivar, tratamientos de imbibición, tiempo de envejecimiento y acumulación de biomasa en la respuesta del T_{50}^v , y vigor de semillas de cebolla.

TABLE 1. Effect of the cultivar, imbibitions treatments, aging time and biomass accumulation in the response of the T_{50}^v , and onion seed vigor.

Niveles	T ₅₀ (h)		Plántulas (%)				Biomasa seca (mg)			
			Normales		Anormales		Raíz		Tallo	
Cultivares de cebolla										
Cojumatlán	62.32	ab ^w	48.67	b	13.15	a	10.71	b	157.64	b
Contessa	63.19	a	52.65	ab	9.06	c	20.84	a	244.70	a
Crystal white wax	59.65	b	53.64	ab	10.10	bc	13.51	b	170.81	b
Red burgundy	56.30	c	33.36	c	9.00	c	12.90	b	170.89	b
Toro	50.46	d	57.18	a	11.84	ab	15.93	ab	204.41	ab
DMS ^x	3.26		3.33		2.52		6.54		56.85	
Tratamientos de imbibición										
H2O ^y	53.87	b	59.21	a	7.60	b	18.46	a	203.18	a
AG ₃	58.59	a	52.13	b	8.25	b	19.00	a	202.60	a
BAP	59.78	a	34.55	d	21.29	a	6.49	b	175.90	a
CaCl ₂	61.19	a	54.98	ab	8.02	b	14.46	a	200.51	a
KNO ₃	58.59	a	44.57	c	9.84	b	15.08	a	166.18	a
DMS	3.26		3.33		2.52		6.55		56.85	
Tiempo de envejecimiento (h)										
0	57.87	ab	60.58	a	11.96	a	17.29	a	223.81	a
48	59.89	a	49.49	b	10.27	a	16.28	a	215.69	a
96	60.12	a	37.60	c	8.01	b	12.73	a	165.50	b
144	55.72	b	48.57	b	12.33	a	12.69	a	153.53	b
DMS	2.75		2.80		2.12		5.51		47.86	
CV ^z	15.73		21.19		37.55		83.85		59.51	

^v. Tiempo calculado para alcanzar el 50 % de germinación en una población.

^w. Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^x. Diferencia mínima significativa al 5 %.

^y. Agua, Ácido giberélico, 6-bencilaminopurina, Cloruro de calcio, Nitrato de potasio.

^z. Coeficiente de variación (%).

^v Time calculated to reach 50 % of germination in a population.

^w Means with the same letter within columns are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

^x Minimum significant difference at 5 %.

^y Water, gibberellic acid, 6-bencilaminopurine, Potassium nitrate.

^z Coefficient of variation (%).

Efecto genotípico

El cultivar Toro tuvo la germinación significativa más rápida, pues alcanzó el 50 % de germinación en el tiempo menor (50.46 h), respecto a los otros cultivares. Esto estuvo relacionado con la proporción alta de plántulas normales (57.18 %) y la acumulación mayor de biomasa en raíz (15.93 mg) y tallo (204.41 mg), parámetros que señalan a Toro como el cultivar de mayor vigor. El cultivar Contessa respondió lentamente en la germinación (T_{50} = 63.19 h), pero a pesar de ello tuvo porcentaje alto de plántulas normales (52.65 %) y el menor de plántulas anormales entre los cultivares (9.06 %), incluso respecto a Toro (11.84 %); además, la acumulación de biomasa seca en la plántula fue la mayor entre los cultivares (raíz, 20.84 mg; tallo, 244.70 mg). Aunque Contessa tuvo germinación lenta y también necesitó más tiempo para llegar a la máxima imbibición (12 h), su vigor puede ser comparable con el de Toro (Cuadro 1).

El cultivar Cojumatlán mostró la germinación menor (66 %) en un ensayo preliminar, y durante el presente experimento tuvo una respuesta lenta para llegar al T_{50} (63.32 h); en consecuencia el porcentaje de plántulas anormales fue el mayor (13.15 %) y su acumulación de biomasa fue baja (10.71 mg y 157.64 mg, en raíz y tallo, respectivamente). Estos resultados en Cojumatlán se atribuyen al deterioro durante la cosecha y poscosecha, pues la semilla se manejó a granel y con las condiciones mínimas de almacenamiento (Cuadro 1).

Red burgundy tuvo el vigor significativamente menor, el que estuvo relacionado directamente con el porcentaje menor de plántulas normales (33.36 %); esto indica que la calidad fisiológica de su semilla es baja. El cultivar Crystal white wax tuvo vigor intermedio entre todos los otros cultivares (Cuadro 1).

La interacción significativa entre cultivares y tratamientos de imbibición, indicó que el tratamiento con BAP afectó similarmente todos los cultivares. Contessa con el tratamiento de imbibición con cloruro de calcio, fue el único que superó el porcentaje de plántulas normales del testigo. La interacción entre los cultivares y el tiempo de envejecimiento resultó significativa ($P \leq 0.05$), lo cual se atribuyó a que el cultivar Contessa mostró una disminución en el T_{50} con el envejecimiento por 144 h; este resultado es inexplicable, ya que es de esperar que el deterioro de la semilla se acentúe al prolongar el periodo de envejecimiento.

Aunque la interpretación de la interacción de tercer orden puede ser incierta, en este estudio parece indicar una tendencia hacia la recuperación de la capacidad germinativa (en términos de plántulas normales) en el cultivar Contessa después de 48 h de envejecimiento y con la aplicación de cloruro de calcio. En esta condición, la respuesta del cultivar superó al testigo en 21 %.

244.70 mg). Although Contessa had slow germination and also required more time to reach maximum imbibition (12 h), its vigor can be comparable with that of Toro (Table 1).

The Cojumatlán cultivar presented the lowest germination (66 %) in a preliminary assay, and during the present experiment it had a slow response to reach T_{50} (63.32 h); consequently, the percentage of abnormal seedlings was the highest (13.15 %) and its biomass accumulation was low (10.71 mg and 157.64 mg, in root and stem, respectively). These results in Cojumatlán are attributed to the deterioration during harvest and postharvest, as the seed was managed in bulk and under minimum storage conditions (Table 1).

Red burgundy had significantly lower vigor, which was directly related to the lowest percentage of normal seedlings (33.36 %); this indicates that the physiological quality of its seed is low. The Crystal white wax cultivar presented intermediate vigor among all of the other cultivars (Table 1).

The significant interaction among cultivars and imbibition treatments indicated that the treatment with BAP affected all of the cultivars similarly. Contessa with imbibitions treatment with calcium chloride was the only one that surpassed the percentage of normal seedlings of the control. The interaction among the cultivars and aging time was significant ($P \leq 0.05$), which was attributed to the fact that the Contessa cultivar presented a reduction in T_{50} with aging for 144 h; this result is unexplainable, because it is expected that seed deterioration is accentuated by prolonging the aging period.

Although the interpretation of the interaction of third order may be uncertain, in this study it appears to indicate a tendency toward the recovery of the germinative capacity (in terms of normal seedlings) in the Contessa cultivar after 48 h of aging and with the application of calcium chloride. In this condition, the response of the cultivar surpassed the control by 21 %. Furthermore, the cultivars Cojumatlán and Contessa were the only ones in which is absence of aging (0 h) notably surpassed the control, imbibed in water, in the percentage of normal seedlings (Cojumatlán 45 % and Contessa 16 % more than the control) when the seed was imbibed in the solution with calcium chloride (Figure 1). The deterioration of the onion seeds (low germination, 69 % on the average) was increased with the aging treatment, possibly due to the loss of the integrity of the membranes as a consequence of structural and functional damages that principally cause a high permeability of solutes (Pérez *et al.*, 2008); therefore, it is probable that the chemical solutions applied during the imbibition of the seed have been absorbed, causing more negative effects than beneficial ones.

Chemical treatment of the seed

All of the chemical treatments during the imbibitions of the seed had a negative effect on speed of germination, given that the time to reach 50 % of germination increased with the application of the chemical solutions (lowest T_{50} in the control, 53.87 h). The percentage of normal see-

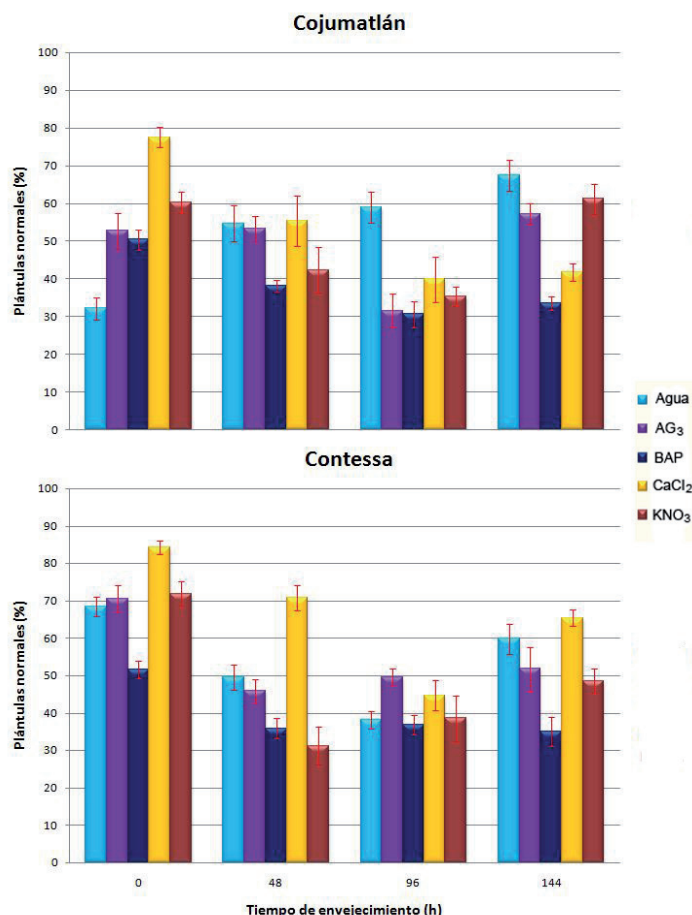


FIGURA 1. Plántulas normales de cebolla de los cultivares Cojumatlán y Contessa como respuesta a la interacción de tercer orden. Las líneas verticales en cada columna indican el error estándar.

FIGURE 1. Normal onion seedlings of the cultivars Cojumatlán and Contessa as response to the third order interaction. The vertical lines of each column indicate the standard error.

Además, los cultivares Cojumatlán y Contessa fueron los únicos en los que en ausencia de envejecimiento (0 h) superaron notablemente al testigo, embebido en agua, en el porcentaje de plántulas normales (Cojumatlán 45 % y Contessa 16 % más que el testigo) cuando la semilla se embebió en la solución con cloruro de calcio (Figura 1). El deterioro de las semillas de cebolla (baja germinación, de 69 % en promedio) se incrementó con el tratamiento de envejecimiento, posiblemente debido a la pérdida de la integridad de las membranas a consecuencia de daños estructurales y funcionales que ocasionan principalmente una permeabilidad alta de solutos (Pérez *et al.*, 2008); por lo tanto, es probable que las soluciones químicas aplicadas durante la imbibición de la semilla hayan sido absorbidas, ocasionado más efectos negativos que benéficos.

Tratamiento químico a la semilla

Todos los tratamientos químicos durante la imbibición de la semilla tuvieron un efecto negativo en la velocidad de germinación, ya que el tiempo para alcanzar el 50 % de germinación se incrementó con la aplicación de las

dlings was also reduced, as the control imbibed in water showed the highest percentage (59.21 %), although biomass accumulation was not affected, with the exception of the treatment with BAP in which it was reduced in the seedling root. The negative effect of the treatment with BAP was evident in the decrease of the percentage of normal seedlings (34.55 %) and the increase of the abnormal seedlings (21.29 %), and consequently the reduction of biomass accumulation in the root of 18.46 mg in the control to 6.49 mg on the average of the rest of the treatments. This indicates that the application of the BAP hormone induces a negative effect on the metabolism of the seedling, with its consequential loss of vigor, and that the root is the most sensitive part of the seedling (Table 1).

According to Alizaga *et al.* (1992), the immersion of seeds in solution with BAP at 5 % for periods longer than 15 minutes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) inhibits seedling development due to high absorption; even at a concentration of 0.25 % for five minutes it can cause malformations in the hypocotyl, however, immersion between one and five minutes increases germination rate. In wheat seeds (*Triticum aestivum* L.), the treatment with BAP (150 mg·L⁻¹) affected negatively grain yield (Iqbal *et al.*, 2006), and in maize seedlings (*Zea mays* L.) the inhibitory effect persisted at room temperature, while at low temperatures the effect is annulled (Stefanov *et al.*, 2007). The effect of BAP in onion seeds was overwhelming in all of the aging periods, given that the percentage of abnormal seedlings increased by more than double the average of the remaining solutions (Figure 2), which demonstrates its adverse effect on seedling vigor under aging conditions and the chemical concentrations used.

The application of KNO₃ only had an effect on the percentage of normal seedlings with an intermediate performance (44.57 %). Marín *et al.* (2007) indicated the absence of response with the application of KNO₃ and other chemical products in the osmotic conditioning of onion seeds, as the chemical treatments did not surpass the control in vigor and germination, these authors indicate that the product may be harmful if it penetrates the embryo. The results in the present study agree with those of the cited authors, even when the concentration of KNO₃ and exposure time were lower.

In the present study no statistical differences were detected in biomass accumulation of root and stem of the seedlings from effects of the application of calcium chloride, and the value of T₅₀ did not decrease as occurred in the work of Bautista-Calles *et al.* (2008); however, a positive tendency was observed in the percentage of normal seedlings with the application of calcium (Figure 2). The effect of gibberellic acid was observed as a reduction in the proportion of normal seedlings to an intermediate level (52.01 %), according to the results presented in Table 1.

Time of aging

Significant differences were observed in the response

soluciones químicas (T_{50} menor en el testigo, 53.87 h). También redujeron el porcentaje de plántulas normales, pues el testigo embebido en agua mostró el porcentaje mayor (59.21 %), aunque la acumulación de biomasa no fue afectada, con excepción del tratamiento con BAP en el que se redujo en la raíz de la plántula. El efecto negativo del tratamiento con BAP se vio en la disminución del porcentaje de plántulas normales (34.55 %) y el incremento de las anormales (21.29 %), y en consecuencia la reducción de la acumulación de biomasa en la raíz de 18.46 mg en el testigo a 6.49 mg en promedio del resto de los tratamientos. Esto indica que la aplicación de la hormona BAP induce un efecto negativo en el metabolismo de la plántula, con la consecuente pérdida de su vigor, y que la raíz es la parte más sensible de la plántula (Cuadro 1).

Según Alizaga *et al.* (1992), la inmersión de semillas en solución con BAP al 5 % por periodos mayores de 15 minutos en cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) inhibe el desarrollo de la plántula debido a la absorción alta; incluso a una concentración de 0.25 % por cinco minutos puede causar malformaciones en el hipocótilo; no obstante, la inmersión entre uno y cinco minutos incrementa la tasa de germinación. En semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.), el tratamiento con BAP ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) afectó negativamente el rendimiento de grano (Iqbal *et al.*, 2006), y en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) el efecto inhibitorio persistió a temperatura ambiente, mientras que con temperaturas bajas el efecto se anula (Stefanov *et al.*, 2007). El efecto de BAP en semillas de cebolla fue contundente en todos los periodos de envejecimiento, ya que el porcentaje de plántulas anormales se incrementó más del doble del promedio de las soluciones restantes (Figura 2), lo que demuestra su efecto adverso en el vigor de plántulas bajo las condiciones de envejecimiento y bajo las concentraciones químicas aquí usadas.

La aplicación de KNO_3 sólo tuvo efecto en el porcentaje de plántulas normales con un comportamiento intermedio (44.57 %). Marín *et al.* (2007) señalaron la ausencia de respuesta con la aplicación de KNO_3 y otros productos químicos en el acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla, pues los tratamientos químicos no superaron al testigo en vigor y germinación; estos autores indican que el producto puede ser nocivo si penetra al embrión. Los resultados en el presente estudio concuerdan con los de los autores citados, aun cuando la concentración de KNO_3 y el tiempo de exposición fueron menores.

En el presente estudio no se detectaron diferencias estadísticas en la acumulación de biomasa en la raíz y el tallo de las plántulas por efectos de la aplicación de cloruro de calcio, y el valor de T_{50} no disminuyó como ocurrió en el trabajo de Bautista-Calles *et al.* (2008); sin embargo, se observó una tendencia positiva en el porcentaje de plántulas normales con la aplicación de calcio (Figura 2). El efecto del ácido giberélico se observó como

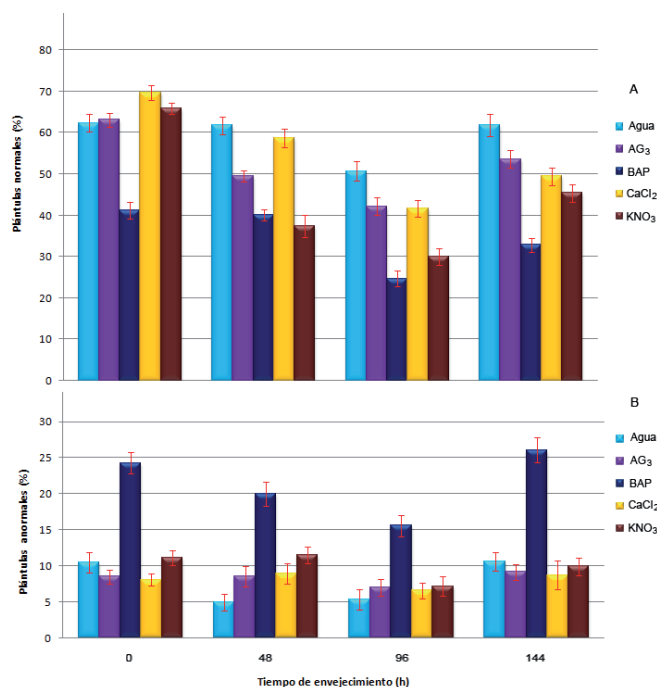


FIGURA 2. Plántulas normales (A) y anormales (B) de semillas de cebolla como respuesta a la interacción entre los tratamientos de imbibición y el tiempo de envejecimiento. Las líneas verticales en cada columna indican el error estándar.

FIGURE 2. Normal (A) and abnormal seedlings (B) of onion seed as response to the interaction between the treatments of imbibition and aging time. Vertical lines in each column indicate the standard error.

to time of aging; as could be expected, germination decreased with the increase in time. However, the results of the period of 144 h were comparable to the period of 48 h, in which there was less deterioration. The T_{50} presented an identical behavior in the period of 144 h, as it showed the lowest value (55.72 h) with respect to the control (57.87 h), as is observed in Table 1. This behavior is difficult to explain, given that deterioration is a progressive process that increases with the time of aging.

The accumulation of root biomass was not affected by the time of aging, in contrast to the stem, in which biomass accumulation was higher in the period of 48 h (215.69 mg) and statistically similar to the response of the control (223.84 mg). This seems to indicate that the relatively high conditions of high relative humidity and high temperature have an important effect on the distribution of biomass between the aboveground part and the root. This fact is important, given that the initial vigor depends on the production of biomass by the seedling (López *et al.*, 2004) and also on its distribution among organs that alters its quality.

The significant interactions between aging time x imbibitions (Figure 1) were due to the fact that the treatment with calcium chloride generated a higher percentage of normal seedlings (69.70 %) and surpassed the control without aging (62 %), which can be considered as a positive res-

una reducción en la proporción de plántulas normales a un nivel intermedio (52.01 %), según los resultados presentados en el Cuadro 1.

Tiempo de envejecimiento

Se observaron diferencias significativas en la respuesta al tiempo de envejecimiento; como podría esperarse, la germinación disminuyó con el incremento del tiempo. Sin embargo, los resultados del periodo de 144 h fueron comparables con el periodo de 48 h, en el que existió menos deterioro. El T_{50} presentó un comportamiento idéntico en el periodo de 144 h, pues mostró el valor menor (55.72 h) respecto al testigo (57.87 h), según se observa en el Cuadro 1. Este comportamiento es difícil de explicar, ya que el deterioro es un proceso progresivo que se incrementa con el tiempo de envejecimiento.

La acumulación de biomasa en raíz no fue afectada con el tiempo de envejecimiento, a diferencia del tallo, en el que la acumulación de biomasa fue mayor en el periodo de 48 h (215.69 mg) y estadísticamente similar a la respuesta del testigo (223.84 mg). Esto parece indicar que las condiciones de humedad relativa alta y temperatura alta durante el envejecimiento afectan de manera importante la distribución de biomasa entre la parte aérea y la raíz. Este hecho es importante, ya que el vigor inicial depende de la producción de biomasa por la plántula (López *et al.*, 2004) y también de su distribución entre órganos que altera su calidad.

Las interacciones significativas entre tiempo de envejecimiento x imbibición (Figura 1), se debieron a que el tratamiento con cloruro de calcio generó mayor porcentaje de plántulas normales (69.70 %) y superó al testigo sin envejecimiento (62 %), lo que puede ser considerado como una respuesta positiva de las semillas al tratamiento con calcio. Después de 48 h de envejecimiento, la respuesta de interacción de estos dos factores en las plántulas normales con cloruro de calcio (58.65 %) fue estadísticamente igual al testigo (61.78 %), en contraste con el resto de los tratamientos, los cuales causaron una reducción significativa, así como en el periodo subsiguiente (96 h).

CONCLUSIONES

Se observó una tendencia hacia la recuperación de la capacidad germinativa en términos de porcentaje de plántulas normales, con la aplicación de cloruro de calcio (CaCl_2) en semillas con 48 h de envejecimiento en el cultivar Contessa, lo que indica que el calcio probablemente tiene efecto positivo durante la imbibición. La aplicación de ácido giberélico, BAP y nitrato de potasio durante la imbibición de las semillas, tuvo efectos negativos en el vigor de las plántulas en todos los cultivares de cebolla y tiempos de envejecimiento. El efecto del tratamiento con BAP fue el más perjudicial porque afectó en mayor grado la calidad fisiológica de las semillas, atribuible a la absorción rápida de esta hormona durante la imbibición.

ponse of the seeds to the treatment with calcium. After 48 h of aging, the response of interaction of these two factors in the normal seedlings with calcium chloride (58.65 %) was statistically equal to the control (61.78 %), in contrast to the rest of the treatments, which caused a significant reduction, as well as in the following period (96 h).

CONCLUSIONS

A tendency toward the recovery of germinative capacity was observed in terms of percentage of normal seedlings, with the application of calcium chloride (CaCl_2) in seeds with 48 h of aging in the Contessa cultivar, which indicate that the calcium probably has a positive effect during imbibitions. The application of gibberellic acid, BAP and potassium nitrate during the imbibitions of the seeds had negative effects on the seedling vigor in all of the onion cultivars and aging times. The effect of the treatment with BAP was the most harmful because it affected to a higher degree the physiological quality of the seeds, attributable to the rapid absorption of this hormone during imbibitions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The principal author would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support received for carrying out doctoral studies in the Colegio de Postgraduados.

End of English Version

AGRADECIMIENTOS

El autor principal, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo recibido para realizar estudios de Doctorado en el Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- AFZAL, I.; BASRA S. M. A.; IQBAL A. 2005. The effects of seed soaking with plant growth regulators on seedling vigor of wheat under salinity stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 1: 6-14.
- ALIZAGA, R.; GUEVARA E.; HERRERA J. 1992. Efecto de algunos tratamientos químicos sobre el periodo de reposo del maní (*Arachis hypogaea*). *Agronomía Costarricense* 16 (1): 29-36.
- ASHRAF, M.; RAUF, H. 2001. Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salts: Growth and ion transport at early growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 407-414.
- BAUTISTA C., F.; CARRILLO C., G.; VILLEGAS M., A. 2008. Recuperación de la alta capacidad de germinación de la semilla de papaya mediante la tecnología de

- preacondicionamiento y biorreguladores. *Agrociencia* 42: 817-826.
- BUTOLA, J. S.; BADOLA, H. K. 2004. Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in *Angelica glauca*, a threatened medicinal herb. *Current Science* 87: 796-799.
- CFNP. 2004. TAP Report for 6-Benzyladenine, January 2004. Disponible en: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5057578> (Verificado: 23 de octubre de 2010).
- GONZÁLEZ, R.; DELGADO, A.; ZAVALA, H. A.; HERRERA, B. E. 2009. La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. *Agrociencia* 43: 379-391.
- HUEZ L., M. A.; SAMANI, Z.; LÓPEZ E., J.; ÁLVAREZ A., A.; PRECIADO F., F. 2008. Efecto de un extracto vegetal en la germinación de semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones salinas. *Biocencia* 10 (3): 11-19.
- ILBI, H.; ESER, B. 2002. Effects of pre-storage treatments of ageing in onion seeds. *Acta Horticulturae* (ISHS) 579: 613-618. Disponible en: http://www.actahort.org/books/579/579_108.htm (Verificado 7 de febrero de 2011).
- IQBAL, M.; ASHRAF, M.; JAMIL, A. 2006. Seed enhancement with cytokinins: changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. *Plant Growth Regulation* 50: 29-39.
- ISTA. 1993. International rules for seed testing, rules 1993. Seed Science & Technology. 21 supplement. Zürich, Switzerland. 288 p.
- KYUNG N., K.; CHEONG, Y. H.; GRANT, J. J.; PANDEY, G. K.; LUAN, S. 2003. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*. 15: 411-423.
- LÓPEZ S., J. A.; CASTRO N., S.; TREJO L., C.; MENDOZA C., M. C.; ORTIZ C., J. 2004. Biomasa acumulada e intercambio gaseoso en maíz proveniente de semilla de diferente tamaño bajo humedad favorable y restringida. *PHYTON: Revista Internacional de Botánica Experimental* 2004: 243-248.
- MARÍN, S. J.; MEJÍA, J. A.; HERNÁNDEZ, A.; CARBALLO, A.; PEÑAA. 2007. Acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agricultura Técnica en México* 33: 63-71.
- PENG, J.; HARBERD, N. P. 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 376-381.
- PÉREZ, I.; AYALA O. J.; GONZÁLEZ, V. A.; CARRILLO, J. A.; PEÑA, J. A.; GARCÍA, G. 2008. Indicadores morfológicos y fisiológicos del deterioro de semillas de tomate de cáscara. *Agrociencia* 42: 891-901.
- RINCÓN, S. F.; MOLINA M., J. 1990. Efecto del método de envejecimiento artificial sobre la germinación de semillas de maíz. *Agronomía Mesoamericana* 1: 51-54.
- SARASAN V.; ROBERTS, A. V.; ROUT, G. R. 2001. Methyl laurate and 6-benziladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose. *Plant Cell Reports* 20: 183-186.
- STEFANOV, B.; POPOVA, N.; ILIEV, L. 2007. Reduction of benzylaminopurine inhibitory effect on the growth of young maize plants as a consequence of low temperature treatment. *Comptes Rendus de L Academie Bulgare des Sciences* 60: 779-782.
- TAJBAKSH, M.; BROWN, P.; GRACIE, A. J.; SPURR, C. J.; DONOVAN, N.; CLARK, R. J. 2004. Mitigation of stunted root abnormality in onion (*Allium cepa* L.) using seed priming treatments. *Seed Science and Technology* 32: 683-692.
- VESELOVA, T. V.; VESELOVSKY, D. V. A. 2003. Investigation of atypical germination changes during accelerated ageing of pea seeds. *Seed Science and Technology* 31: 517-530.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92: 487-511.