

Comportamiento de semilla de jitomate envejecida y pre-acondicionada, sometida a la prueba de vigor

PÉREZ-MENDOZA, Claudia, CARRILLO-CASTAÑEDA, Guillermo, JUÁREZ-MUÑOZ, Juana, ORTIZ-GARCÍA, Elizabeth y VIDAL-LEZAMA, Eloísa

C. Pérez, G. Carrillo, J. Juárez, E. Ortiz y E. Vidal

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Posgraduados. Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco Km. 36.6 Montecillo, Texcoco, Méx. C.P. 56230. Claudia Pérez Mendoza.

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-ICAP.

³Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México
cperez@colpos.mx

F. Rérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Quiroz y R. García (eds.) Química, Biología y Agronomía. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2016

Abstract

High quality seed perform better in the processes of establishment in the field. That justifies the high precision that should have vigor tests to be reliable. To enhance the sensibility of a vigor test, tomato seeds var. Saladet, were subjected to priming treatment, 20 h with vigorous aeration at 18 °C, before challenging the seeds to a vigor test based on vacuum stress. Seeds were moistened and placed into glass desiccators for 12 days adjusted to 200, 400 and 600 mm Hg. As the vacuum increased, the germination decreased. Priming accentuated the responses of seeds. Comparing by Tukey, it was found that the variables: germination, viability, dead seeds clearly differentiated vacuum conditions. The vacuum condition of 600 mm are useful for determining the condition of seed vigor.

9 Introducción

La semilla es el insumo estratégico en la agricultura, tanto para el productor que utiliza alta tecnología en cultivos en grandes extensiones de tierra como para los agricultores que producen en superficies menores. Mediante el uso de semilla de alta calidad, genéticamente mejorada para altos rendimientos y resistente a plagas y enfermedades se consigue obtener la rentabilidad más alta que benefician a los agricultores. Así, las semillas de calidad deben tener atributos entre los que destacan: la calidad genética, fisiológica, física y sanitaria (Basra, 1995; Copeland y McDonald, 1995, Pérez *et al.*, 2006). La semilla de calidad es un componente básico para asegurar un óptimo establecimiento de la planta en campo para así obtener una mayor eficiencia productiva.

En ese contexto, el vigor también ha sido definido como la sumatoria total de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de éstas o de un lote de semillas durante la germinación y emergencia de las plántulas. Las semillas de máximo potencial son consideradas de alto vigor, y aquellas que presentan un pobre comportamiento son de bajo vigor (ISTA, 2012).

El vigor de las semillas juega también un papel muy importante durante el almacenamiento. Las que son vigorosas poseen un mayor potencial de almacenamiento y se preservan bien por largos periodos, perdiendo su viabilidad muy lentamente, ya que la viabilidad tiende a reducirse gradualmente durante el almacenamiento. El vigor es un término usado para estimar la calidad de las semillas; cuando estas son vigorosas, producen plántulas uniformes, fuertes y sanas que tienen un buen establecimiento en campo y muestran relativamente mayor longevidad (Doijode, 2001).

El vigor de semillas generalmente es evaluado por las siguientes pruebas: crecimiento de plántulas, velocidad de germinación, determinación de solutos en semillas, consumo de oxígeno y liberación dióxido de carbono (actividad respiratoria), tetrazolio, prueba de la actividad del ácido glutámico descarboxilasa (GADA) y diferentes tipos de pruebas de estrés, entre otras (Doijode, 2001).

Por lo tanto con las nuevas tecnologías de producción agrícola así como la generación de variedades que se ajusten a diversas condiciones deben generarse, en las que debe tomarse en cuenta la fisiología de la germinación. Jamieson (2008) considera que las funciones importantes de la semilla se deben promover mediante el pre-acondicionamiento de la semilla, el encapsulamiento o el recubrimiento, para facilitar la siembra así como para proveer a la semilla de micronutrientes y agentes para la protección de la futura planta, con lo que el vigor y el desarrollo temprano de la plántula son promovidos.

Mediante el proceso de imbibición de la semilla en agua o en soluciones diversas es factible “incentivar” las potencialidades heredadas por la semilla, en particular, funciones que tienen que ver con la germinación así como con la velocidad de germinación (Artola *et al.*, 2003). Argerich y Bradford (1989) encontraron, al estudiar el comportamiento de la semilla de jitomate, que había sido pre-acondicionada durante 5 días a 20 °C en una solución que contenía 120 mol m⁻³ de K₂HPO₄ + 150 mol m⁻³ de KNO₃ o envejecida durante 6 días con contenido de humedad de 13% (basado en la materia seca) a 50 °C, que el porcentaje de germinación (>98%) no fue afectado por el pre-acondicionamiento pero se redujo a 85% por el tratamiento de envejecimiento que había recibido la semilla. El pre-acondicionamiento incrementó el porcentaje de germinación cuando la semilla se hizo germinar a varias temperaturas mientras que el tratamiento de envejecimiento lo redujo. El desarrollo de la raíz después de la prueba de germinación y el desarrollo de las plántulas tanto en invernadero como en campo no se vieron afectados ni por el pre-acondicionamiento ni por el envejecimiento.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue tratar de mejorar la sensibilidad de una prueba de vigor de semilla basado en estrés por vacío, con el fin de detectar con más precisión la condición vigor de las semillas, mediante la aplicación de un tratamiento pre-germinativo de imbibición de la semilla en agua (con la finalidad de “incentivar” las potencialidades heredadas en la semilla, en particular la germinación así como la velocidad de germinación), para posteriormente someterla a una prueba de vigor de la semilla basado en estrés por vacío (falta de oxígeno), para obtener resultados más precisos y confiables.

9.1 Metodología

Ubicación de la zona de estudio

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

Material genético

Semilla de un cultivar comercial de jitomate Saladet de la casa Hortafloor, envejecida naturalmente, con porcentaje de germinación de 60 %.

Tratamiento pre-germinativo de imbibición

El tratamiento de imbibición consistió en la inmersión de una muestra de 5 gramos de semilla en un recipiente de polietileno de 2 L capacidad que contenía 1 L de agua destilada mantenido con aireación constante con una bomba de aire para acuario (ELITE® 802, Rolf C. Hagen Inc.) a temperatura ambiente (18-20 °C) durante 20 h. Después del tratamiento de imbibición, las semillas fueron secadas sobre papel absorbente con la ayuda de un ventilador, a temperatura ambiente (18-20 °C) durante 12 h. Otra muestra de semilla utilizada del mismo lote (semilla testigo) no fue sometida al tratamiento de imbibición.

Prueba de vigor basada en estrés por vacío (PV)

De la semilla que había sido sometida al tratamiento pre-germinativo, muestras de 25 semillas fueron preparadas (en todos los casos, tres lotes de 25 semillas fueron considerados por condición experimental) y colocadas sobre dos hojas de papel filtro, en cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro.

Otra serie de semillas (testigo) que no recibió el tratamiento pre-germinativo fue preparada y colocada en las cajas Petri de manera cómo fue indicado. Toda la semilla fue sometida a un proceso de germinación (ISTA, 2012) de la forma siguiente: El papel filtro de todas las cajas fue humedecido con 3.5 ml de agua destilada, para finalmente colocarlas de inmediato (al humedecer el papel filtro de las cajas que serían colocadas en el primer desecador, de inmediato fueron colocadas en dicho desecador y, de ser el caso, de inmediato el vacío fue aplicado) en el desecado de vidrio. Cuatro desecadores fueron utilizados en este experimento. En uno de ellos fueron colocadas dos series de semillas (una serie es la semilla testigo y la otra serie las semillas que fueron sometidas al tratamiento pre-germinativo) pero el desecador fue conservado con la válvula abierta (sin vacío). En el segundo desecador fueron colocadas las dos series de semillas y el vacío fue ajustado a 200 mm para mantener la semilla en un ambiente de presión reducida. Para ajustar las condiciones de vacío requeridas fue utilizada una bomba de vacío eléctrica (Gast modelo 522 V4B G180DX). En cada caso, cuando el aparato indicaba la lectura respectiva (200, 400 ó 600 mm de Hg), la bomba de vacío se mantuvo funcionando durante un minuto antes de cerrar la llave del desecador y así mantener la condición de vacío requerida dentro del desecador durante los 12 días que duró este experimento. En el tercer desecador fueron colocadas otras dos series de semillas y ajustado a 400 mm y en el último desecador se colocaron las series de semillas y fue ajustado a 600 mm de Hg. La semilla fue conservada, en una mesa de laboratorio a la temperatura de 25 ± 1 °C (en condiciones ambientales).

Cuando la semilla cumplió 12 días en las condiciones indicadas, las cajas Petri fueron sacadas de los desecadores para determinar: la germinación total (PG) con base en la proporción de semillas germinadas, porcentaje de viabilidad (VIA), porcentaje de semillas muertas (PSM) respecto, al número total de semillas por tratamiento; peso de materia seca expresada en microgramos, de la parte aérea (PSPA) y de la radícula (PSR), del total de plántulas obtenidas, después de haberlas secado a 70 °C durante 72 h.

Análisis estadístico

Un diseño completamente al azar con arreglo factorial donde el factor A son los tratamientos de semillas con y sin pretratamiento de imbibición y el factor B son las condiciones de vacío (VAC 200, VAC 400 y VAC 600) con cuatro repeticiones. En todos los casos la unidad experimental consistió de 25 semillas.

Los resultados obtenidos de las variables respuesta se sometieron al análisis de varianza mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2000) 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 germinadas por día expresadas en porcentaje, se transformaron mediante la función de $T = \arccoseno = \sqrt{y/100}$, donde y es el valor a transformar y T el valor de la variable transformada.

9.2 Resultados

Los resultados que aquí se presentan son importantes, ya que se explora un tema de suma relevancia como es la investigación de condiciones para establecer una prueba de vigor más confiable. En todos los parámetros de vigor estudiados, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en las respuestas de las semillas hayan sido o no sometidas al tratamiento pre-germinativo de imbibición en agua destilada (EM) mientras que, para las condiciones de vacío (VAC), hubo diferencias ($P < 0.001$) excepto en la característica de PSR.

En la interacción de semillas sometidas al tratamiento de imbibición (EM) por las condiciones de vacío (VAC), no se encontró significancia estadística en PG, VIA, PSM, PSPA y PSR. En la Tabla 9 se presenta el análisis de varianza para las variables de vigor.

Tabla 9 Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables de vigor indicadas, en semillas de jitomate

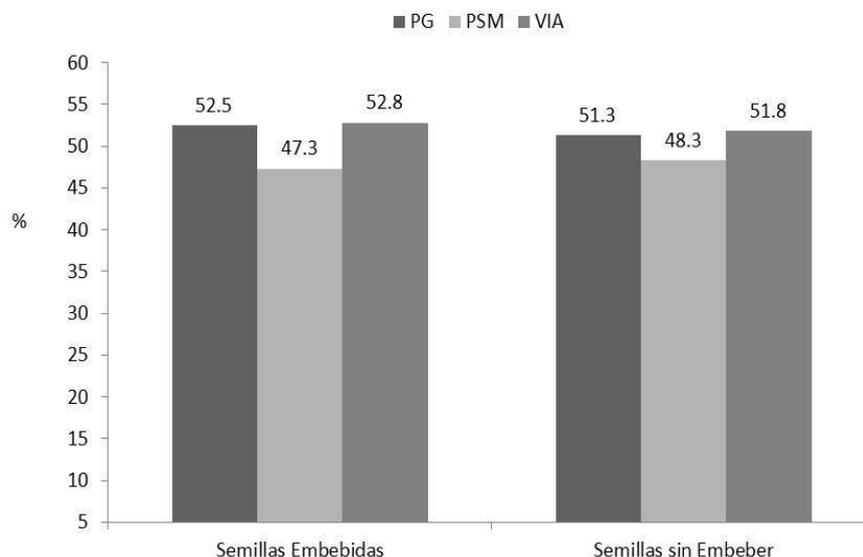
FV	GL	Variables [±]				
		‡PG (%)	‡VIA (%)	‡PSM (%)	PSPA (mg)	PSR (mg)
Con y Sin Embeber (EM)	1	2.70 ns	1.44 ns	1.44 ns	0.000023 ns	0.000010 ns
Condiciones de Vacío (VAC)	3	1099.23 **	1154.6 **	1154.6 **	0.00039 **	0.000009 ns
EM x VAC	3	64.7 ns	66.1 ns	66.1 ns	0.000011 ns	0.000001 ns
CV (%)		10.5	11.0	11.7	19.0	44.9

[±]PG= porcentaje de germinación total; VIA= porcentaje de viabilidad; PSM= porcentaje de semillas sin germinar; PSPA= peso seco de la parte aérea; PSR= peso seco de la radícula. ** = significancia estadística al 0.01 de probabilidad; ns = no significativo. CV= coeficiente de variación. ‡Dato transformado con arco seno.

En la comparación de medias de los resultados de semillas que habían recibido o no el tratamiento pre-germinativo, se observó que las primeras inician la germinación más rápidamente pero, los valores de vigor indicados en la Figura 1 fueron similares. Esto es, PG fue 52.5 % exhibido por las semillas embebidas mientras que 51.3 % por las semillas sin embeber; VIA 52.8 % en semillas embebidas y 51.8 % sin embeber; PSM 47.3 % para semillas embebidas y 48.3 % sin embeber.

Bewley (1997) también indica que, en las semillas embebidas en agua se presentan tres fases de la actividad respiratoria. En la Fase I, que es la más corta en tiempo, la semilla absorbe rápidamente agua, inicia la respiración, se lleva a cabo la reparación del material genético y de las mitocondrias e inicia la síntesis de proteínas a partir de mensajeros preformados. En otras palabras, la semilla restablece su actividad metabólica. Durante la Fase II, la síntesis de proteínas se lleva a cabo a partir de mensajeros que se transcriben en esa misma Fase II y se generan nuevas mitocondrias que funcionan gracias a la respiración de las células. Al final de la Fase II, la semilla completa el proceso de germinación y, en la Fase III, inicia el desarrollo de la plántula (fase post-germinativa). Por lo que es posible que con la metodología utilizada mediante el tratamiento de imbibición de las semillas sea factible diferenciar a las semillas que se encuentran en la fase I de las que ya están en la fase II y, con esto, se puedan identificar eventos celulares y metabólicos donde actúen estos compuestos utilizados en esta investigación.

Figura 9 Comportamiento observado en semillas de jitomate que previamente fueron embebidas en comparación con las que no lo fueron, basado en los porcentajes de germinación (PG), semillas muertas (PSM) y viabilidad (VIA).

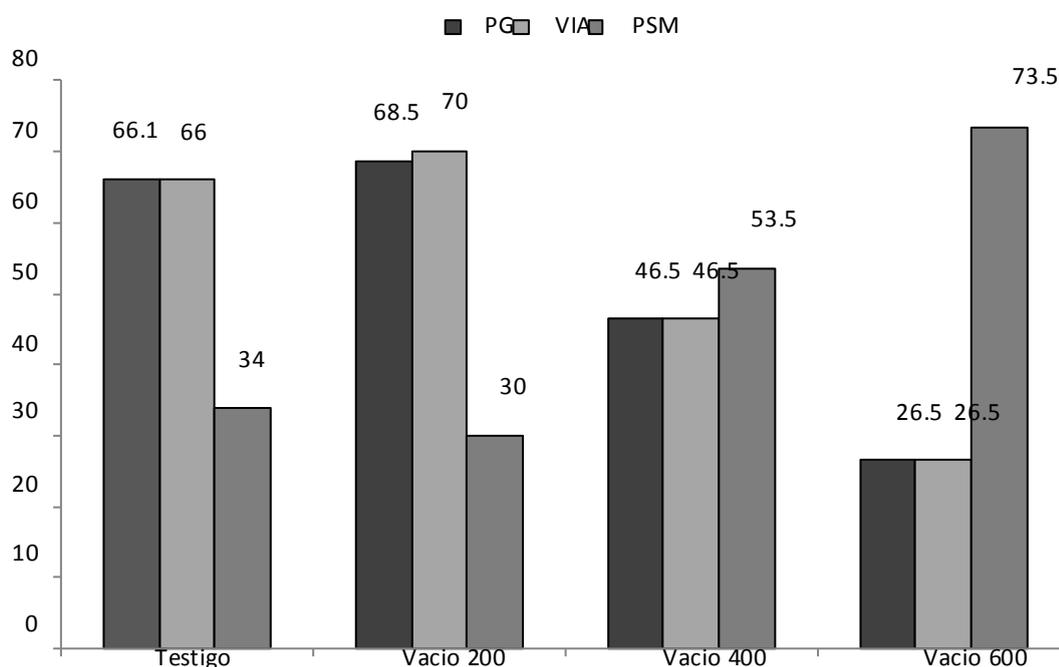


Estos resultados demuestran que el oxígeno es uno de los factores principales que afectan el proceso de germinación ya que durante el tiempo de imbibición, según Bewley (1997), se presenta un incremento muy importante en la intensidad de la actividad metabólica, siendo la respiración la primera actividad en ser detectada, apenas minutos después de iniciado el proceso de imbibición.

Para el caso de los PSPA y PSR, se registraron valores de 0.018 mg y 0.0050 mg respectivamente en las semillas sometidas al tratamiento pre-germinativo mientras que, en las semillas testigo estos valores fueron mayores: de 0.016 mg para el peso de materia seca de la parte aérea de la plántula (PSPA) y de 0.0039 mg de la raíz (PSR).

Por otra parte, al comparar mediante la prueba de Tukey las variables de vigor evaluadas en la variedad de jitomate Saladet en este estudio (Figura 2), se encontró que mediante las variables PG, VIA y PSM, al observar los promedios que se obtuvieron, únicamente se diferenciaron de manera clara las tres condiciones de vacío (VAC), mediante las cuales se detectaron condiciones de vigor contrastante.. El porcentaje de germinación (PG) y viabilidad (VIA) disminuyeron de manera gradual en la semilla sometida a la condición de VAC 200 a la sometida a la condición de VAC 600 (de PG 68.5 % y VIA 70 % a PG 26.5 % y VIA 26.5 %) (Figura 9.1).

Figura 9.1 Comportamiento de semillas de jitomate sometidas a la prueba de vigor basado en los porcentajes de germinación (PG), viabilidad (VIA) y semillas muertas (PSM).



Estos resultados coinciden con lo que fue encontrado por Artola (2002) y Artola *et al.*, (2004) quienes demostraron que a medida que el vacío se incrementaba, disminuía el potencial de germinación de las semillas de *Lotus corniculatus* L.

La variación observada para el PSPA en las tres condiciones de vacío fue de 0.024 mg a 0.009 mg por lo que puede considerarse que la prueba de VAC 600 es la adecuada para establecer la condición de vigor de la semilla. Mediante la variable PSR no se logra identificar la condición de vigor de las semillas (Tabla 2).

Es importante el resultado y la comparación de las respuestas de las semillas que fueron sometidas al pre-acondicionamiento con las que no lo fueron (testigo) antes de aplicar la prueba de vacío. Las semillas pre-acondicionadas germinaron 10% más que las semillas testigo, únicamente cuando la germinación se llevó a cabo sin la condición de vacío. Cuando las semillas fueron sometidas a las tres condiciones de vacío, las diferencias fueron dependientes de la condición de vacío y, la ventaja en el porcentaje de germinación que exhibieron las semillas que fueron sometidas al pre-acondicionamiento en relación con las que no lo fueron (testigo) desapareció. En la condición de VAC 200, la germinación fue similar en las semillas pre-acondicionadas y las testigo pero, en la condición de vacío VAC 600 el potencial germinativo de la semilla se encontró limitado a menos de la mitad tanto en las semillas pre-acondicionadas como en las que no lo fueron, en relación a la condición de vacío VAC 200 (Tabla 3). Como ya se ha indicado y, de acuerdo con Bewley (1997), dichos resultados se pueden explicar considerando el papel importante que juega el oxígeno una vez que las semillas son remojadas en agua, durante todo el proceso pre-germinativo y de desarrollo. Finalmente se debe aclarar que, las semillas que se consideran en la categoría de semillas muertas (SM), en realidad, esa condición de la semilla no ha sido comprobada.

Tabla 9.1 Comparación de medias para los tratamientos de condiciones de vacío (VAC) en las variables de vigor que exhibieron las semillas de jitomate

Tratamientos	Variables [±]	
	PSPA (mg)	PSR (mg)
Testigo	0.021 a	0.006 a
VAC 200	0.024 a	0.004 a
VAC 400	0.013 b	0.004 a
VAC 600	0.009 b	0.004 a
Media	0.020	0.004
DMSH	0.004	0.003

[±]PSPA= peso de materia seca de la parte aérea; PSR= peso de materia seca de la radícula. Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$).

Christianson *et al.* (2009) han detectado que la viabilidad de la semilla de *Arabidopsis* se ve comprometida con tratamientos de reducción del oxígeno en el medio. Desde el momento en que la semilla es remojada, la respiración se re-inicia y no sorprende el impacto que el oxígeno tiene en la germinación. Bradford *et al.* (2009) indican que, la germinación de la semilla con limitado acceso al oxígeno es interferida. Por lo tanto, queremos indicar que independientemente de la ventaja que la semilla que previamente había sido remojada en los eventos que tienen que ocurrir para que la semilla germine (que se ve reflejado cuando la germinación se lleva a cabo sin la condición de vacío) la limitación del acceso al oxígeno interfiere la germinación tanto en la semilla testigo como en la semilla pre-acondicionada.

Este comportamiento, de igual forma, también podría presentarse en las semillas de óptima calidad pero, la condición de vigor de las semillas sería detectada cuando las semillas sean expuestas a la condición VAC 400 y VAC 600 pero no en la condición de vacío VAC 200. Por esta razón este trabajo es importante.

Es seguro que la condición metabólica de la semilla pre-acondicionada sea diferente a la de la semilla testigo (Yuan-Yuan *et al.*, 2010), por el estado relativo en que se encuentran a lo largo de las etapas del proceso pre-germinativo y por tanto, las reacciones bioquímicas que se están llevando a cabo en ambos tipos de semilla al momento de exponerlas a la prueba de vacío. El requerimiento de oxígeno en ambos tipos de semilla puede también ser diferente. Consideramos que el pre-acondicionamiento de la semilla debe mejorar las condiciones de germinación, tal y como fue encontrado en los resultados que se presentan y que coinciden con lo demostrado por otros autores (Yuan-Yuan *et al.*, 2010; Hamdollah y Kamyar. 2011). Argerich y Bradford (1989) encontraron en sus resultados que el porcentaje de germinación (>98%) no fue afectado por el pre-acondicionamiento pero sí ocurrió cuando la semilla fue expuesta a germinar a varias temperaturas.

Tabla 9.2 Comparación de medias para las variables de vigor indicadas obtenidas de semillas de jitomate

Imbibición	Condiciones de Vacío	Variables [±]				
		PG (%)	VIA (%)	PSM (%)	PSPA (mg)	PSR (mg)
Sin Embeber	Sin vacío	61.0 a	61.0 a	39.0 c	0.021 ab	0.007 a
	VAC 200	68.0 a	69.0 a	31.0 c	0.024 a	0.005 a
	VAC 400	53.0 ab	53.0 ab	47.0 bc	0.014 bc	0.004 a
	VAC 600	28.0 c	28.0 c	72.0 a	0.011 c	0.004 a
Con Imbibición	Sin vacío	71.0 a	71.0 a	29.0 c	0.022 a	0.005 a
	VAC 200	69.0 a	71.0 a	29.0 c	0.023 a	0.003 a
	VAC 400	40.0 bc	40.0 bc	60.0 ab	0.011 c	0.004 a
	VAC 600	25.0 c	25.0 c	75.0 a	0.007 c	0.004 a
Media		51.9	52.3	47.8	0.017	0.004
DMSH		18.6	19.5	19.5	0.0075	0.0047

±PG= porcentaje de germinación total; VIA= porcentaje de viabilidad; PSM= porcentaje de semilla sin germinar; PSPA= peso de biomasa seca de la parte aérea; PSR= peso de biomasa seca de la radícula. DMSH= diferencia mínima significativa honesta (Tukey, $\alpha = 0.05$).

9.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación preliminar permiten concluir lo siguiente:

La semilla sometida al pre-tratamiento de imbibición en agua germina más rápidamente que la semilla testigo, cuando el oxígeno no es limitante.

Mediante la prueba de vacío se encontró que a medida que el vacío se incrementa, el potencial de germinación de las semillas disminuye y, se diferenció la respuesta de la semilla entre la condición VAC200 de las condiciones VAC 400 y VAC 600. En la condición VAC 200 la respuesta de la semilla fue similar a la de la semilla testigo.

El pre-acondicionamiento acentúa las diferencias de la respuesta de la semilla. Se considera que la condición de vacío óptima para identificar la condición de vigor de la semilla dependerá de la condición de deterioro de la semilla. En esta investigación se demuestra que VAC 400 y VAC 600 son útiles para determinar la condición de vigor de la semilla utilizada.

9.4 Referencias

Argerich, C. A. y K. J. Bradford. (1989). The effects of priming and ageing on seed vigour in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 40 (5): 599-607.

Artola, A. (2001). *Desarrollo de técnicas para estimar y mejorar el vigor de semilla en Lotus corniculatus L.* México: Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Tesis de Doctor en Ciencias.

Artola, A., G. Carrillo-Castañeda y G. García de los Santos. (2003). Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus L.* seed vigor. *Seed Science and Technology*, 31: 455-463.

Artola, A., G. Carrillo-Castañeda, and G. García de los Santos. (2004). A seed vigor test for *Lotus corniculatus L.* based on vacuum stress. *Seed Science and Technology*, 32: 573-581.

- Basra, A. S. (1995). *Seed quality; basic mechanisms and agricultural implications*. Food. Products Press. New York, USA.
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055–1066.
- Bradford, K. J., D. Come and F. Corbineau. (2009). Quantifying the oxygen sensitivity of seed germination using a population-based threshold model. *Seed Science and Research*, 17: 33–43.
- Christianson, J. A., I. W. Wilson, D. J. Llewellyn, and E. S. Dennis. (2009). The low-oxygen-induced NAC domain transcription factor ANAC102 affects viability of Arabidopsis seeds following low-oxygen treatment. *Plant Physiology*, 149 (4): 1724–1738.
- Copeland, L.O. and McDonald, M.B. (1995). *Seed Science and Technology*. Chapman & Hall. New York.
- Doijode, S. D. (2001). *Seed storage of horticultural crops*. Food Products Press. Binghamton, NY. USA.
- Hamdollah, E., K. Kamyar. (2011). Effect of seed priming on germination properties and seedling establishment of Cowpea (*Vigna sinensis*). *Notulae Scientia Biologicae*. 3(4):113-116.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2012). International Rules for Seed Testing. Rules 2012. *Seed Science & Technology*, (supplement).
- Jamieson, G. (2008). New perspectives on seed enhancement. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 782:143-150.
- Pérez, M. C., L. A. Hernández, C. F. V. González, G. García de los Santos, A. C. Carballo, R. T. R. Vásquez, y G. M. del R. Tovar. (2006). Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura Técnica en México*. 32 (3): 341-352.
- S.A.S. SAS/STAT. (2000). *Guide for personal computers*. Statistical Analysis System Institute. Inc. Cary, NC.USA.
- Yuan-Yuan, S., S. Yong-Jian, W. Ming-Tian, L. Xu-Yi, G. Xiang, H. Rong, M. Jun . (2010). Effects of seed priming on germination and seedling growth under water stress in rice. *Acta Agronomica Sinica*. 36 (11): 1931-1940.