

Ruptura de dormancia en semillas de especies del género *Nicotiana*

Dormancy breaking in seeds of species of the *Nicotiana* genus

Juan Luis Pérez-Rodríguez^{1*}, Gilberto Torrecilla-Guerra¹, Otilio Ruiz-Padrón¹ y Marcos Martínez-Montero²

¹Estación Experimental del Tabaco. Carretera Santa Lucía, Km 2, Cabaiguán, CP: 62410, Sancti Spíritus, Cuba.

²Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera Morón Km 9, Ciego de Ávila, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba.

E-mail: espec.banco@eetcab.co.cu

RESUMEN. En el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba se determinó la potencia germinativa de 11 especies del género *Nicotiana*. Las especies evaluadas presentaron alto grado de dormancia al poseer porcentajes de germinación inferiores al 40 %. Para la especie *Nicotiana megalosiphon* Heurck y Mueller se investigó el efecto de nitrato de potasio (3,0 g/L), ácido giberélico (0,15 g/L), estratificación a 5 °C (49 días), Fitomás (1 %), ácido sulfúrico (0,5 min) y criopreservación (49 días) sobre la germinación de semillas. A partir de los resultados que mostraron mayores porcentajes de germinación, se estudió la influencia del ácido giberélico (0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 y 0,25 g/L), estratificación a 5 °C (0; 7; 21; 35 y 49 días) y criopreservación (0; 7; 21; 35 y 49 días) sobre la germinación de la semilla. El mayor porcentaje de germinación se observó después de la exposición por 49 días a 5 °C seguido de un periodo de 24 h en ácido giberélico 0,20 g/L. Al exponer las semillas de las 10 especies restantes al procedimiento establecido para la *N. megalosiphon* se alcanzaron porcentajes de germinación significativamente superiores a los obtenidos a través de los ensayos de germinación tradicionales.

Palabras clave: Banco de germoplasma, dormancia, *Nicotiana*, tabaco.

ABSTRACT. In the germplasm bank of the Tobacco Research Institute of Cuba the germinative power was determined in 11 species belonging to the genus *Nicotiana*. All the evaluated species presented high dormancy degree which obtained less than 40% of germination. For the species *Nicotiana megalosiphon* Heurck and Mueller the effect of potassium nitrate (3.0 g/L), gibberelic acid (0.15 g/L), stratification to 5 °C (49 days), Fitomás (1%), sulfuric acid (0.5 min) and criopreservation (49 days) on the germination of seeds was investigated. Starting from the results that they showed higher germination percentages, the influence of the combination of different levels of gibberelic acid (0.00; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20 and 0.25 g/L) with stratification to 5 °C (0; 7; 21; 35 and 49 days) and criopreservation (0; 7; 21; 35 and 49 days) on the germination of the seed was studied. The highest percentage in germination was observed after the exposition to 49 days to 5 °C followed by a period of 24 h in 0.20 g/L gibberelic acid. When exposing the seeds from the 10 remaining species to the established procedure for the *N. megalosiphon* significantly superior germination percentages they were reached (of 49% to 84%) to those obtained through the traditional germination rehearsals.

Key words: germplasm bank, Dormancy, *Nicotiana*, tobacco.

INTRODUCCIÓN

La dormancia o latencia es la condición que impide la germinación en semillas viables aunque se encuentren en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo (El Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; Linkies, *et al.*, 2010). Es una de las propiedades adaptativas más importantes que poseen los vegetales. Gracias a ello, las semillas sobreviven en condiciones desfavorables y adversas. (Copete *et al.*, 2011)

Las circunstancias que determinan la germinación de las semillas tienen una importancia determinante en el diseño de protocolos de conservación *ex situ* (Giménez-Benavides *et al.*, 2005). Con fines de conservación en los bancos de germoplasma, la dormancia interfiere con los procedimientos normales de regeneración y monitoreo de la germinación. (Copete *et al.*, 2011)

Varias de las especies almacenadas en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba presentan elevado grado de dormancia. Este comportamiento dificulta su regeneración y como consecuencia, su conservación. (Wünschová *et al.*, 2009)

Para interrumpir la dormancia se emplean diferentes tratamientos con resultados diversos. La exposición a diferentes concentraciones de Giberlinas (GAs) por diferentes intervalos de tiempo (Bewley y Black, 1994), la incubación de semillas a bajas temperaturas (comúnmente de 5 a 10 °C) en condiciones de humedad para simular un periodo

de hibernación (estratificación) (Yamauchi *et al.*, 2004), la exposición a diferentes fuentes de nitrógeno (N) (Bethke *et al.*, 2007; Oracz *et al.*, 2009), la inmersión de semillas en nitrógeno líquido (-196 °C) por determinados periodos (Chen *et al.*, 2009) y la escarificación con ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Finkelstein *et al.*, 2008) han sido procedimientos satisfactorios para promover la germinación en diferentes especies.

Este trabajo se propone como objetivo establecer un procedimiento para la ruptura de la dormancia en semillas almacenadas de especies del género *Nicotiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán, perteneciente al Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba. La selección

de las especies utilizadas en el trabajo (tabla 1) se realizó en base a la baja potencia germinativa mostrada en ensayos tradicionales de germinación.

Tabla. Especies utilizadas en la investigación

Código	Nombre de la especie
NE01	<i>Nicotiana repanda</i> Willdenow y Lehmann
NE09	<i>Nicotiana longiflora</i> Cabanilles
NE10	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> Viviani
NE17	<i>Nicotiana debneyi</i> Domim
NE20	<i>Nicotiana simulans</i> Burbidge
NE22	<i>Nicotiana bigelovii</i> (Torrey) Watson
NE24	<i>Nicotiana ingulba</i> Black
NE34	<i>Nicotiana sylvestris</i> Spegazzini et Comes
NE39	<i>Nicotiana bonariensis</i> Lehmann
NE43	<i>Nicotiana megalosiphon</i> Heurck y Mueller
NE47	<i>Nicotiana nesophila</i> Johnston

Las semillas de cada accesión se sembraron en bandejas de poliestireno expandido, de 264 alvéolos con sustrato orgánico (70 % cachaza, 15 % de cáscara de arroz y 15 % de zeolita) (Hernández *et al.*, 2004), basado en la tecnología de bandejas flotantes según García y Andino (2002). Las bandejas se colocaron en condiciones de cultivo protegido o túneles.

Pasados 45 días, 25 plántulas de cada accesión se trasplantaron al campo sobre suelo pardo sialítico carbonatado (Hernández *et al.*, 1999). La distancia de plantación fue de 30 cm entre plantas y 180 cm entre hileras. La fertilización, riego y cuidados fitosanitarios se realizó según lo establecido por el instructivo técnico del cultivo descrito por MINAG (2011).

Las semillas se seleccionaron de 10 plantas al azar de cada accesión y fueron recolectadas cuando las cápsulas se tornaron completamente carmelitas. Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio y secadas a temperatura ambiente y a humedad relativa (HR) 50 % por un periodo de 15 días. Pasado este tiempo las semillas fueron separadas de sus cápsulas, tamizadas e introducidas en desecadoras de vidrio cerradas herméticamente a temperatura ambiente, con silicagel autoindicador en proporción 1:1 como agente desecante hasta alcanzar valores entre 3 y 5 % de humedad. El silicagel autoindicador fue renovado cada vez que su color comenzaba a cambiar de azul intenso a rosado o azul pálido, como prueba de que su poder de hidratación se había agotado (Engels *et al.*, 2007). Las semillas secas se conservaron en

recipientes con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su utilización. Los ensayos de humedad se realizaron con tres repeticiones de 0,5 g y el contenido de humedad se expresó en porcentaje de masa fresca. (ISTA, 2005)

Ensayos de germinación

Los ensayos de germinación se realizaron con cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Las semillas se colocaron en placas Petri de 9 cm de diámetro sobre dos discos de papel de filtro previamente humedecidos para lo cual se utilizó 4-5 mL de agua destilada. La incubación se realizó durante 14 días a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 16 h. En todos los ensayos la emergencia de la radícula fue el criterio para considerar que la germinación había tenido lugar. (Engels *et al.*, 2007)

Ruptura del estado de dormancia en semillas de la especie *N. megalosiphon*

Efecto de diferentes tratamientos sobre la ruptura del estado de dormancia

Tres muestras de 0,1 g de semillas de *N. megalosiphon* fueron colocadas por separado en recipientes con KNO_3 3,0 g/L, GA_3 0,15 g/L y FITOMAS E 1 % e incubaron por un periodo de 24 h a temperatura ambiente. Además, para la estratificación a 5 °C, 0,1g de semillas se introdujeron en un recipiente metálico cerrado herméticamente con H_2O destilada en su interior, de forma tal que toda la semilla quedara sumergida en el líquido por un periodo de 49 días a 5 °C.

La escarificación química se realizó al sumergir 0,1g de semillas en H_2SO_4 98 % por un periodo de 0,5 min; mientras que la crioconservación se efectuó colocando una muestra de 0,1 g en crioviales de 1,5 mL, sumergiendo más tarde la misma en un tanque con nitrógeno líquido durante 49 días.

Concluido el periodo de incubación, en todos los tratamientos evaluados las semillas fueron lavadas cuidadosamente con abundante agua destilada y se dejaron germinar en las condiciones recomendadas en los Ensayos de germinación.

· Efecto de diferentes niveles de GA_3 , crioconservación y estratificación a 5 °C sobre la germinación

Los tratamientos evaluados y el orden de su realización fueron los siguientes; GA_3 en concentraciones de 0,00, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 y 0,25 g/L, crioconservación y estratificación a 5 °C, ambos por un periodo de incubación de 0, 7, 21, 35 y 49 días, además de la combinación de los tres procedimientos. La descripción de la técnica utilizada y el tratamiento brindado a la semilla después del periodo de incubación se describen en el punto anterior, mientras que las condiciones del proceso de germinación en Ensayos de germinación.

Cada tratamiento fue evaluado de forma independiente y se tomó como control el mejor nivel del tratamiento anterior, en cuanto a mayor porcentaje de germinación.

· Efecto de diferentes periodos de exposición a GA_3 sobre la germinación de las semillas

0,5 g de semillas se introdujeron en solución de GA_3 0,20 g/L (tratamiento con GA_3 de mayor porcentaje de germinación) a intervalos de 0, 8, 16, 24, 32, 40 h, después se extrajeron muestras de 400 semillas aproximadamente que fueron lavadas con abundante agua destilada y su potencia germinativa se comprobó según los Ensayos de germinación referidos anteriormente.

Ruptura de dormancia en 11 especies de *Nicotiana*
La efectividad del tratamiento con mejores resultados en cuanto a porcentaje de germinación fue evaluada en semillas de 11 especies pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco.

Tratamiento estadístico

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el *Statistical Package for Social Sciences* (versión 11.5 para Windows, SPSS Inc.). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (prueba de Komolgorov Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar las posibles diferencias

significativas entre las medias y para discriminar entre estas se utilizó el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Los resultados, expresados inicialmente en porcentaje de germinación, fueron transformados con el duplo

del arco seno de la raíz cuadrada de la proporción de germinación para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas. Cada tabla y figura de la sección Resultados y Discusión describe el tratamiento estadístico específico ejecutado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de germinación en 11 especies de *Nicotiana*

La Figura 1 muestra los resultados de los ensayos de germinación tradicionales realizados a las 11 especies de *Nicotiana* evaluadas. Los valores alcanzados aunque varían desde 40 % hasta 0 % en *N. ingulba* y *N. megalosiphon* respectivamente, son muy reducidos si se comparan con los

porcentajes de germinación catalogados como aceptables por las instituciones internacionales que norman la calidad de la semilla almacenada en los bancos de germoplasma (Engels *et al.*, 2007). No obstante, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wünschová *et al.* (2009) que informaron para la especie *Nicotiana benthamiana* Domim la presencia de semillas dormantes a partir de los bajos niveles de germinación alcanzados.

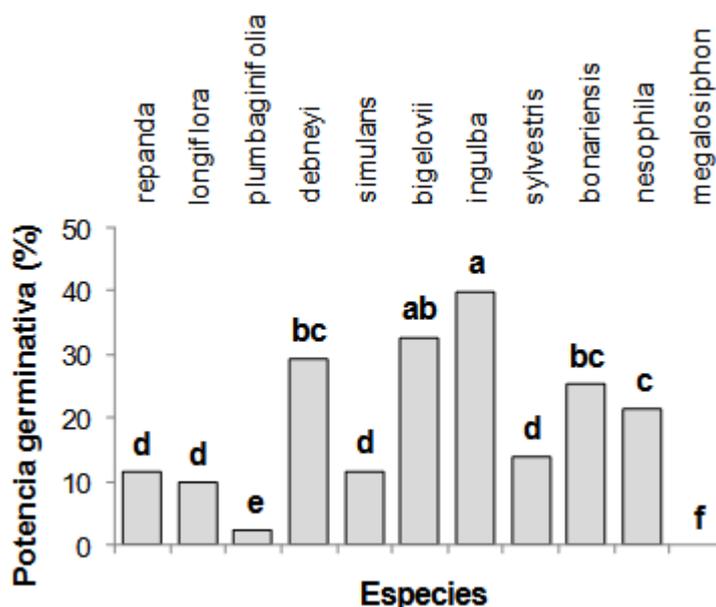


Figura 1. Resultado de los ensayos de germinación para 11 especies de *Nicotiana*

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0.05$) Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$

Una germinación deficiente interfiere con los procedimientos normales de regeneración en un banco de germoplasma (Copete *et al.*, 2011), lo que provoca pérdidas económicas debido al alto costo de esta operación y, en ocasiones, la pérdida de accesiones al no poder ser renovada la semilla en las colecciones almacenadas (Engels *et al.*, 2007). Por lo tanto, establecer un procedimiento o técnica que permita romper el estado de dormancia se hace indispensable para el correcto funcionamiento de un banco de germoplasma.

Ruptura del estado de dormancia en semillas de *N. megalosiphon*

Efecto de diferentes tratamientos sobre la ruptura del estado de dormancia

Los resultados informados para el rompimiento del estado de dormancia por la aplicación de tratamientos con GAs son diversos. A pesar de que la acumulación de GA se asocia con liberación de la dormancia y/o la germinación al aumentar la proporción GA/ácido abscísico (ABA), tratamientos con esta hormona solo estimulan la germinación en algunas especies (Bewley, 1997). Asimismo, los valores significativamente superiores de germinación obtenidos a través de los tratamientos de estratificación a 5 °C y GA₃ 0,15

g/L sugieren para la especie la presencia de una dormancia de tipo fisiológica. (Baskin y Baskin, 2004)

Al ser expuesta las semillas a H_2SO_4 durante 5 min no hubo un aumento considerable de la germinación. Tal resultado sugiere que la dormancia de las semillas no está relacionada con la impermeabilidad o dureza de la testa debido a que al ser dañada por el ácido, no hubo un aumento significativo de la germinación al ser comparada con el control (Wünschová *et al.*, 2009 y Rouhi *et al.*, 2012). De la misma forma, el porcentaje de germinación obtenido mediante la exposición a temperaturas criogénicas no es satisfactorio desde el punto de vista práctico. Tales resultados sugieren la combinación de tratamientos con mayores porcentajes de germinación con el propósito de establecer un procedimiento o técnica para romper la dormancia en esta especie (Rouhi, *et al.*, 2012).

· **Efecto de diferentes niveles de GA_3 , crioconservación y estratificación a $5^\circ C$ sobre la germinación**

La incidencia de diferentes niveles de GA_3 sobre la germinación de las semillas de *N. megalosiphon* se muestra en la Figura 3. Existe un aumento en la potencia germinativa hasta alcanzar un máximo de 89 % para una concentración de GA_3 de 0,20 g/L. Una concentración superior de GA_3 no provoca aumentos significativos en los porcentajes de germinación.

Tratamientos con GA_3 se utilizaron para romper dormancias en varias especies de plantas con resultados diferentes. Chuanren *et al.* (2004) informaron aumentos en los niveles de germinación para *Echinacea angustifolia* al ser tratada con diferentes concentraciones de GA_3 , mientras que Rahnama-Ghahfarokhi y Tavakol-Afshari (2007) obtuvieron porcentajes de germinación intermedios en *Ferula gummosa* pero al evaluar diferentes concentraciones de la hormona (0,25, 0,50, 1 g/L) no encontraron diferencias significativas entre los valores de germinación obtenidos. Sin embargo, Rouhi *et al.* (2012) al evaluar concentraciones en un rango de 0,10, hasta 0,50 g/L obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de germinación de *Tulipa kaufmanniana*.

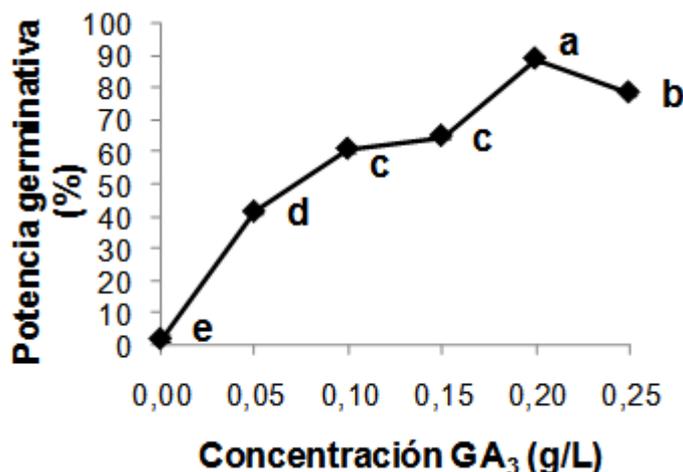


Figura 2. Potencia germinativa de semillas de *N. megalosiphon* alcanzada a las 24 h

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq .05$) Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$

Al evaluar la potencia germinativa a diferentes periodos de exposición a temperaturas criogénicas no existieron diferencias significativas al ser comparada con el control (Datos no mostrados). Por lo que, en el marco de la elaboración de un procedimiento para el rompimiento de dormancia en semillas de *N. megalosiphon*, no se recomienda el uso de la crioconservación en la secuencia de experimentos al brindar resultados semejantes a los

obtenidos con GA_3 (control). Sin embargo, en el comportamiento de la potencia germinativa de semillas previamente expuesta a diferentes intervalos de estratificación a $5^\circ C$ seguido de incubación por 24 h en GA_3 0.20 g/L (figura 3), el tratamiento de estratificación por 49 días fue el más efectivo para inducir germinación en semillas de *N. megalosiphon* al alcanzar un valor de 96,8 %.

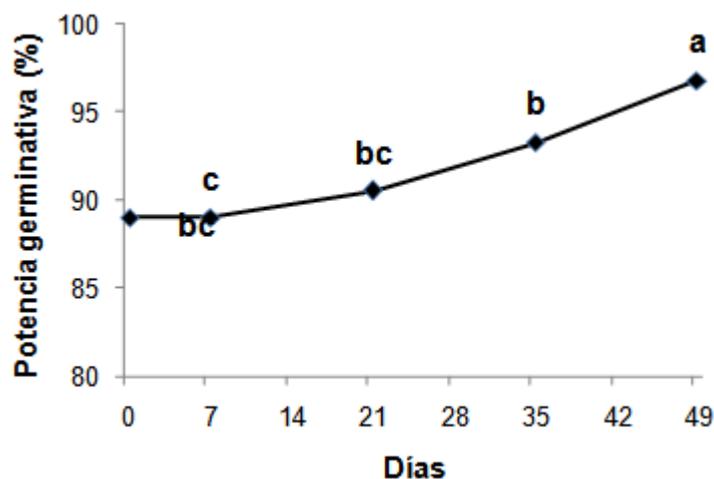


Figura 3. Potencia germinativa de semillas de *N. megalosiphon* embebidas en H₂O destilada a 5 °C por 0, 7, 21, 35 y 49 días seguido de un periodo de 24 h en solución de GA₃ 0.20 g/L

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0.05$) Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$

La estratificación a 5 °C juega un importante papel al brindar el estímulo necesario para promover la germinación en semillas dormantes de diferentes especies. Se ha informado que los efectos de GA₃ como promotor de la germinación se incrementan con tratamientos de estratificación a 5 °C debido a que este tratamiento induce un incremento de la concentración de GA₃ en la semilla. (Yamauchi et al., 2004)

Ghahfarokhi y Tavakol-Afshari (2007) sugieren que la estratificación promueve la germinación por un incremento en la acumulación de GA potencialmente bioactiva. Además, la estratificación a 5 °C acompañada de la aplicación exógena de GA₃, muestran sinergismo, por lo que se alcanzan altos niveles de germinación.

· Efecto de diferentes periodos de exposición a GA₃ sobre la germinación de las semillas.

Al evaluar la influencia de diferentes tiempos de exposición de las semillas a GA₃ (0,20 g/L) sobre el porcentaje de germinación (figura 4) se observó que existe un aumento de la potencia germinativa al incrementarse la exposición, hasta alcanzar un máximo a las 24 h, pasado este tiempo la germinación disminuye. Este resultado coincide con el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de la hormona, evaluado por Rouhi et al. (2012); aunque es menor a las 72 h empleadas por Rahnama-Ghahfarokhi y Tavakol-Afshari (2007). Tal diferencia era de esperar, si se considera que tanto las especies como las concentraciones empleadas en cada estudio eran diferentes.

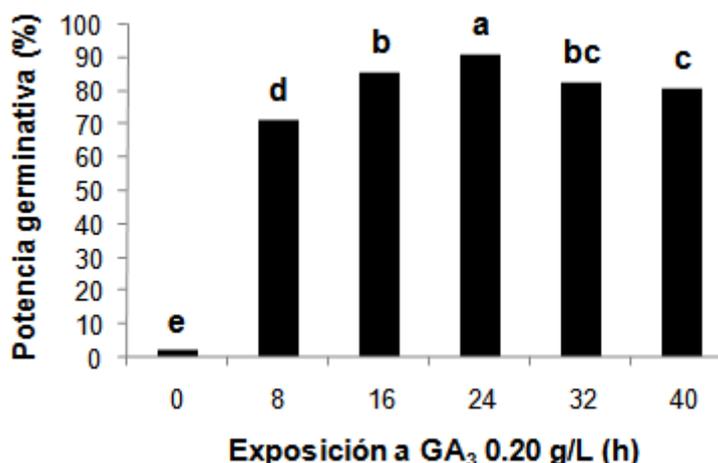


Figura 4. Potencia germinativa de semillas de *N. megalosiphon* embebidas en solución de GA₃

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0.05$) Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$

La potencia germinativa alcanzada para *N. megalosiphon*, 96,8 %, está acorde con lo estipulado internacionalmente para la calidad de semillas a almacenar en bancos de germoplasma (Engels *et al.*, 2007). Por lo tanto, se propone como procedimiento para interrumpir dormancia en semillas de la especie *N. megalosiphon* la estratificación a 5 °C seguido de incubación por 24 h en GA₃ (0,20 g/L)

Ruptura de dormancia en 11 especies de *Nicotiana*

La efectividad del tratamiento con mejores resultados en cuanto a porcentaje de germinación,

estratificación a 5 °C por 49 días seguidos de 24 h de exposición a GA₃ 0,20 g/L, fue evaluada en semillas de 11 especies pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco (Figura 5). Los valores de germinación alcanzados son significativamente superiores en todas las especies evaluadas y se corresponden con lo normado internacionalmente para la semilla conservada en bancos de germoplasma (Engels *et al.*, 2007). Los porcentajes de germinación inferiores alcanzados para *N. plumbaginifolia* (86 %) y *N. ingulba*, podrían estar dado por el grado de dormancia o por dificultades en la viabilidad de las semillas de estas dos especies.

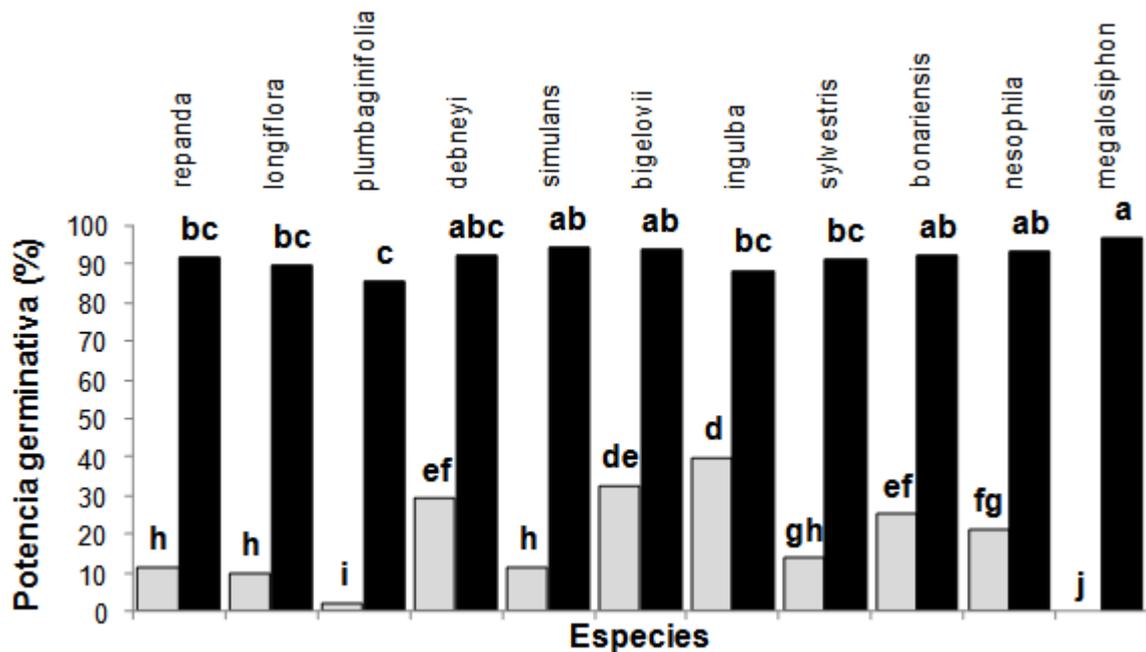


Figura 5. Potencia germinativa de semillas de 11 especies del género *Nicotiana* obtenida a través de ensayos de germinación tradicionales (□) a partir de la exposición por 49 días a 5 °C en agua destilada y embebidas por 24 h en solución de GA₃ 0,20 g/L (■)

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0.05$) Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$

CONCLUSIONES

Los valores de germinación en las semillas tratadas son significativamente superiores a la semilla sometida a los ensayos tradicionales de germinación. Tal resultado demuestra la efectividad del tratamiento

desarrollado en la ruptura del estado de dormancia en semillas de especies del género *Nicotiana* almacenadas en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baskin, J. M.; C. C. Baskin: A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16; 2004.
2. Bethke, P. C.; I. G. Libourel; R. L. Jones: Nitric

- oxide in seed dormancy and germination. *See Ref.* 20: 153-75, 2007.
3. Bewley, J. D.; M. Black: *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum, New York, 1994.

4. Bewley, J. D.: Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066, 1997.
5. Chen S. Y.; C. T. Chien; J. M. Baskin; C. C. Baskin: Storage behavior and changes in concentrations of abscisic acid and gibberellins during dormancy break and germination in seeds of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Tree Physiology* 30: 275–284, 2009.
6. Chuanren, D.; W. Bocha; L. Wanqian; C. Ping; L. Jie; Z. Huan: Effect of chemical and physical factors to improve the germination rate of *Echinacea angustifolia*. *Colloids surf. Biointerfaces* 37: 101-105, 2004.
7. Copete, E.; J. M. Herranz; P. Ferrandis; C. C. Baskin; J. M. Baskin: Physiology, morphology and phenology of seed dormancy break and germination in the endemic Iberian species *Narcissus hispanicus* (Amaryllidaceae). *Ann Bot.* 107(6): 1003-1016, 2011.
8. El Maarouf-Bouteau, H.; C. Bailly: Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*. 3(3): 175-182. 2008.
9. Engels, J. M. M.; L. Visser, (eds): Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para Banco de Germoplasmas No. 6. Bioversity Internacional, Roma, Italia. 2007.
10. Finkelstein, R.; W. Reeves; T. Ariizumi; C. Steber: Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 387-415, 2008.
11. García, M.; V. Andino: Tecnología de bandejas flotantes en la producción de plántulas de tabaco en Cuba. *Cubatabaco*. 3(1): 30-33, 2002.
12. Giménez-Benavides, L.; A. Escudero; F. Pérez-García: Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal, interpopulation and interannual variability. *Ecological Research*. 20: 433-444, 2005.
13. Hernández, A.; J. M. Pérez; D. Bosh; L. Rivero: Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. (Ed.) *Agrinfor*, La Habana. Cuba. 64 pp. 1999.
14. Hernández, Y.; Y. León; J. M. Hernández; A. L. Monroy: Nuevos sustratos para la producción de plántulas de tabaco en semilleros flotantes. *Cubatabaco*. 5(2): 15-19, 2004.
15. ISTA (International Rules for Seed Testing): 2005. En sitio web: <http://www.seedtest.org>. Consultado: 20/12/2012.
16. Linkies, A.; K. Graeber; C. Knight; G. Leubner-Metzger: The evolution of seeds. *New Phytologist*. 186: 817–831, 2010.
17. MINAG: Guía para el cultivo del Tabaco. Grupo Empresarial del Tabaco de Cuba. Ministerio de la Agricultura, Cuba, 2011.
18. Oracz, K.; H. El-Maarouf-Bouteau; I. Kranner; R. Bogatek; F. Corbineau; C. Bailly: The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*. 150 (1): 494-505. 2009.
19. Rahnama-Ghahfarokhi, A.; R. Tavakol-Afshari: Methods for dormancy breaking and germination of Galbanum sed (*Ferula gummosa*). *Asian Journal of Plant Sciences* 6(4): 611-616, 2007.
20. Rouhi H. R.; F. A. Karimi; A. R. Shahbodaghlo; M. Sheikhalian; R. Rahmatabadi; M. Samadi; F. Karimi: Effects of sulfuric acid, stratification, phytohormone and potassium nitrate on dormancy breaking and germination of water lily tulip (*Tulipa kaufmanniana* Regel.). *International Journal of AgriScience* 2(2): 136-142, 2012.
21. Wünschová, A.; V. Beďová; H. Vlašínová; L. Havel: Dormancy of *Nicotiana benthamiana* seeds can be broken by different compounds. *Biologia* 64(4): 705-710, 2009.
22. Yamauchi, Y.; M. Ogawa; A. Kuwahara; A. Hanada; Y. Kamiya; S. Yamaguchi: Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell*. 16: 367– 78, 2004.