

COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO Y LONGEVIDAD POTENCIAL EN SEMILLAS DE CUATRO ESPECIES DE ÁRBOLES NATIVOS DE ARGENTINA

Valeria Pastrana-Ignes¹ , Eugenia M. Giamminola^{1,2} , M. Victoria Rivero³ , Ana Álvarez³ ,
Gisela Malagrina³ , Guadalupe Galíndez⁴  & Pablo Ortega-Baes^{1,*} 

¹ Laboratorio de Investigaciones Botánicas (LABIBO), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta-CONICET, Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Salta, Argentina; * ortega_baes@yahoo.com.ar (autor corresponsal).

² Banco de Germoplasma de Especies Nativas (BGEN), Instituto de Ecología y Ambiente Humano (INEAH), Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Salta, Argentina.

³ Banco Base de Germoplasma, Instituto de Recursos Biológicos, CIRN-INTA, De los Reseros y N. Repetto s/n, 1686 Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Facultad de Ciencias Naturales, CONICET, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Salta, Argentina.

Abstract. Pastrana-Ignes V.; E. M. Giamminola, M. V. Rivero, A. Álvarez, G. Malagrina, G. Galíndez & P. Ortega-Baes. 2023. Seed storage behaviour and potential seed longevity of four native tree species from Argentina. *Darwiniana*, nueva serie 11(1): 390-401.

Trees of forest importance are a group of special interest for conservation actions due to their use value. To determine whether they can be conserved in seed banks, we studied the tolerance to desiccation and storage behaviour of four species from north-eastern Argentina: *Handroanthus impetiginosus*, *Jacaranda mimosifolia*, *Neltuma alba* y *Pterogyne nitens*. Desiccation tolerance was evaluated by decreasing the moisture content of the seeds to 4-5%. Storage behaviour was determined by storing dried seeds at -20, 5 and 20 °C for three, six and twelve months. The potential longevity of the seeds was estimated with an accelerated aging experiment. Response variable in all cases was the percentage of germinated seeds. The results indicated that the species have orthodox behaviour and can therefore be stored in seed banks. Throughout twelve months of storage the *N. alba* y *P. nitens* seeds remained dormant and had to be scarified to germinate. The potential longevity of the seeds allowed the species to be classified as short-lived (*H. impetiginosus*), intermediate-lived (*J. mimosifolia* y *P. nitens*), and long-lived (*N. alba*). The results will be useful to establish *ex situ* conservation strategies for these species, which should be complemented with *in situ* conservation actions.

Keywords. Accelerated aging, Argentinian trees; desiccation tolerance; *ex situ* conservation; orthodox seeds; seed banks.

Resumen. Pastrana-Ignes V.; E. M. Giamminola, M. V. Rivero, A. Álvarez, G. Malagrina, G. Galíndez & P. Ortega-Baes. 2023. Comportamiento durante el almacenamiento y longevidad potencial en semillas de cuatro especies de árboles nativos de Argentina. *Darwiniana*, nueva serie 11(1): 390-401.

Los árboles de importancia forestal son un grupo de especial interés para acciones de conservación debido a su valor de uso. Con el fin de determinar si pueden ser conservadas en bancos de semillas, se estudió la tolerancia a la desecación y el comportamiento durante el almacenamiento de cuatro especies de árboles nativos del noroeste de Argentina: *Handroanthus impetiginosus*, *Jacaranda mimosifolia*, *Neltuma alba* y *Pterogyne nitens*. La tolerancia a la desecación se evaluó disminuyendo el contenido de humedad de las semillas a 4-5%. El comportamiento durante el almacenamiento se determinó conservando semillas desecadas a -20, 5 y 20 °C durante tres, seis y doce meses. La longevidad potencial de las semillas se estimó con un experimento de envejecimiento acelerado. La variable de respuesta en todos los casos fue el porcentaje de semillas germinadas. Los resultados indicaron que las especies tienen comportamiento ortodoxo; por lo tanto, pueden ser almacenadas en bancos de semillas. A lo largo de

doce meses de almacenamiento, las semillas de *N. alba* y *P. nitens* conservaron su estado de dormición y debieron ser escarificadas para poder germinar. La longevidad potencial de las semillas permitió clasificar a las especies como de vida corta (*H. impetiginosus*), vida intermedia (*J. mimosifolia* y *P. nitens*) y larga vida (*N. alba*). Los resultados serán de utilidad para establecer estrategias de conservación *ex situ* para estas especies, las que deberán ser complementadas con acciones de conservación *in situ*.

Palabras clave. Árboles argentinos; bancos de semillas; conservación *ex situ*; envejecimiento acelerado; semillas ortodoxas; tolerancia a la desecación.

INTRODUCCIÓN

Las estrategias de conservación *ex situ* constituyen el conjunto de acciones que se desarrollan fuera de los hábitats naturales y permiten preservar un amplio número de especies, en un espacio relativamente reducido (Mounce et al., 2017). Estas acciones tienen como objetivo resguardar la diversidad genética, principalmente de especies amenazadas, endémicas y con valor de uso, a corto, mediano y largo plazo. Entre ellas, los bancos de semillas se destacan como la estrategia más comúnmente usada para este propósito (Hay, 2021).

Para conservar una especie en bancos de semillas, es necesario conocer su tolerancia a la desecación y su comportamiento durante el almacenamiento a diferentes condiciones de humedad y temperatura. Con base en su comportamiento, las especies pueden ser clasificadas en ortodoxas, intermedias y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas toleran el secado a bajos niveles de humedad (3-7 %) y el almacenamiento a bajas temperaturas (< 0 °C). Las intermedias pueden desecarse, aunque no a tan bajos niveles como las ortodoxas y con frecuencia son sensibles al frío. Por último, las semillas recalcitrantes son muy sensibles a la desecación y al frío (Hong & Ellis, 1996; Pritchard et al., 2014). El tipo de comportamiento también puede predecirse de algunas características de las especies, tales como hábitat, linaje al que pertenecen y características morfo-fisiológicas de la semilla (contenido de humedad, tamaño, forma y espesor de la cubierta, entre otros; Pelissari et al., 2018; Junio-Ramos et al., 2019). Si bien, esto último puede ser de utilidad ante la ausencia total de información, es necesario evaluar la tolerancia a la desecación en cada especie objeto de conservación, ya que, de ser clasificadas erróneamente, fracasará su preservación *ex situ* (especialmente en especies recalcitrantes; Pritchard et al., 2014).

Una vez establecido que una especie puede conservarse en bancos de semillas (comportamiento ortodoxo), se realizan monitoreos periódicos (por ejemplo, cada 10 años) para garantizar que la viabilidad de las semillas se mantenga durante el almacenamiento, y de ser necesario, poder regenerarlas a tiempo (especies anuales) o renovar las colecciones con nuevas muestras (especies perennes; Walters, 2015). Si bien la frecuencia de monitoreo se desarrolla con base en el amplio conocimiento que se tiene de especies cultivadas, se considera que dichos monitoreos son dependientes de la longevidad de la semilla, es decir el tiempo que la misma puede mantenerse viva. Se han propuesto distintos métodos para evaluar la longevidad potencial de las semillas (Hay & Probert, 2013; Walters, 2015). Entre ellos, el envejecimiento acelerado es un método relativamente sencillo que permite estimar el tiempo requerido para que la viabilidad disminuya al 50 % (P_{50}). Este valor permite categorizar la esperanza de vida de las semillas, comparándolas con especies de longevidad conocida (Newton et al., 2014). Se ha indicado que las familias con mayor longevidad son Anacardiaceae, Fabaceae, Cistaceae y Malvaceae, asociando dicha característica con la presencia de dormición física (Pritchard & Dickie, 2003).

Numerosos autores han destacado que, a pesar de su importancia, las especies nativas con valor de uso están poco representadas en las colecciones *ex situ* (Walters, 2015; Curti et al., 2017; Hanson & Ellis, 2020), por lo que revertir esta situación es de suma prioridad. Para ello, es necesario, entre otros aspectos, conocer su comportamiento durante el almacenamiento y los determinantes de su germinación (respuesta a la luz, tipo de dormición, entre otras), teniendo en cuenta que puede existir variación intraespecífica en la respuesta a las condiciones a las que son sometidas las semillas (Galíndez et al., 2019; Hanson & Ellis, 2020).

En Argentina, el noroeste del país es una de las regiones más diversas, con una gran heterogeneidad de paisajes (Juárez et al., 2007). En la región, se observan ocho unidades de vegetación entre las cuales están representados dos bosques subtropicales estacionales con precipitaciones contrastantes. Por un lado, las selvas y bosques montanos pertenecientes a la Provincia fitogeográfica de las Yungas, de clima cálido, húmedo a subhúmedo, con una precipitación media anual entre 600 y 3000 mm. Por otro lado, los bosques xerófitos de la Provincia Fitogeográfica Chaqueña, de clima continental, cálido subtropical seco con una precipitación media anual entre 400 y 700 mm (Cabrera, 1976; Oyarzabal et al., 2018). En estos ambientes, muchas especies tienen valor de uso como alimenticias, forrajeras, medicinales, maderables, entre otras aplicaciones. Sin embargo, el cambio en el uso del suelo por expansión de la frontera agropecuaria, en detrimento de la superficie ocupada por el bosque nativo (Volante et al., 2016), sumada a la sobreexplotación con fines maderables, han llevado a que muchas especies de árboles nativos se encuentren amenazados. Tal es el caso de especies del género *Amburana*, *Cedrela*, *Gonopterodendron*, *Jacaranda*, entre otras (Americas Regional Workshop, 1998; Barstow, 2018; Hills, 2020; 2021; IUCN, 2023).

En este contexto, el propósito del presente trabajo fue evaluar si las semillas de cuatro especies nativas de importancia forestal, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, *Jacaranda mimosifolia* D. Don, *Neltuma alba* (Griseb.) C.E. Hughes & G.P. Lewis y *Pterogyne nitens* Tul., que crecen en el noroeste de Argentina, pueden ser incorporadas a bancos de semillas como una estrategia de conservación *ex situ*. Estas poblaciones no han sido evaluadas previamente y habitan una región donde ya se han registrado otras especies de árboles nativos con variación inter poblacional en el comportamiento de sus semillas durante el almacenamiento. Para cada especie, se estudió la tolerancia a la desecación y el comportamiento durante el almacenamiento. En adición, se evaluó la longevidad de las semillas a través de un ensayo de envejecimiento acelerado.

Con base en estudios previos y lo informado por las bases de datos SID KEW (SER, INSR, RBGK, 2023) y GENESYS (USDA, 2023), esperamos que las cuatro especies se comporten como ortodoxas y, con base en el linaje al que pertenecen las especies, esperamos que la familia Fabaceae presente mayor longevidad debido a la presencia de dormición física.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies estudiadas

Se estudiaron cuatro especies de importancia forestal que habitan en el noroeste de Argentina: *Handroanthus impetiginosus* y *Jacaranda mimosifolia*, pertenecientes a la familia Bignoniaceae y *Neltuma alba* (= *Prosopis alba* Griseb. var. *alba*) y *Pterogyne nitens*, pertenecientes a la familia Fabaceae. La fructificación de *N. alba* ocurre entre los meses de diciembre y enero, mientras que en *P. nitens* se observa entre septiembre y noviembre, aunque la cosecha de frutos maduros se realiza a partir de diciembre. La dispersión natural de *H. impetiginosus* se observa entre octubre y diciembre, mientras que la de *J. mimosifolia* entre julio y septiembre (Martínez, 2006).

Recolección de los frutos y las semillas

Durante el período de dispersión natural de cada especie, se cosecharon frutos (y/o semillas) maduros de entre cinco y diez individuos, dependiendo del número de individuos sanos por sitio (Tabla 1). Los frutos maduros de *N. alba* y *P. nitens* se colectaron directamente de los árboles, mientras que en el caso de *H. impetiginosus* y *J. mimosifolia*, se emplearon trampas de semillas. El material colectado se llevó al laboratorio para su limpieza y posterior caracterización de las semillas.

Caracterización de las semillas

Se determinó, para cada especie, peso de la semilla, contenido de humedad (CH), viabilidad de las semillas y capacidad germinativa. El peso promedio de la semilla se obtuvo pesando, individualmente, 25 semillas en una balanza analítica de precisión 0,1 mg.

El CH se determinó gravimétricamente, secando tres réplicas de diez semillas cada una, en estufa a $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 17 hs (ISTA, 2016). La viabilidad inicial de las semillas (V_i) se evaluó con cuatro réplicas de 25 semillas cada una, empleando la prueba de tetrazolio (ISTA, 2016). La capacidad germinativa se evaluó sembrando cuatro réplicas de 25 semillas cada una, en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, garantizando la disponibilidad de agua durante todo el experimento (Davies et al., 2015). Las semillas sembradas se incubaron en cámaras de germinación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, bajo luz blanca ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 400-700 nm de luz blanca fluorescente fría) con un fotoperiodo de 8/16 hs luz-oscuridad. El número de semillas germinadas se registró diariamente por un período de 30 días, considerando como criterio de germinación la emergencia de la radícula ($> 1 \text{ mm}$; Ortega-Baes et al., 2011; Galíndez et al., 2019). Al finalizar el experimento, las semillas no germinadas se cortaron longitudinalmente con un bisturí y sus embriones se observaron en microscopio óptico. La presencia de embriones blancos y turgentes fueron el criterio para considerar a una semilla viable (Ortega-Baes et al., 2010). En las semillas de *N. alba* y *P. nitens* se determinó la presencia de dormición física mediante curvas de imbibición (datos no publicados), por lo que, siempre que se evaluó su capacidad germinativa se sembraron semillas intactas y escarificadas mecánicamente (con un corte en la región opuesta al micrópilo). La variable de respuesta fue el porcentaje de semillas germinadas.

Comportamiento durante el almacenamiento

El comportamiento de las semillas durante el almacenamiento (ortodoxas, intermedias o recalcitrantes) se determinó siguiendo la metodología propuesta por Hong & Ellis (1996). Primeramente, una muestra de 130 semillas por especie se colocó en un desecador que simulaba una humedad relativa en el ambiente (HR) de 60 %, empleando la sal CaNO_3 . Al cabo de tres semanas, cuando las semillas equilibraron su CH (entre un 7 y 9 % CH, dependiendo de la especie), se evaluó su capacidad germinativa, como fue anteriormente descripto. Una vez corroborado que las semillas sobreviven al secado a 60 % HR (ver resultados), nuevas muestras de 130

semillas (12 para las especies de Bignoniaceae y 24 para las especies de Fabaceae) se colocaron en desecadores en los que se generó una HR de 15 %, empleando la sal LiCl. Al cabo de tres semanas, cuando las semillas equilibraron su CH (entre un 4 y 5 % CH, dependiendo de la especie), se evaluó su capacidad germinativa. Las semillas desecadas a 15% HR se preservaron en bolsas de aluminio trilaminadas y se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 3, 6 y 12 meses, tiempos en los que se evaluó la capacidad germinativa.

Longevidad potencial de las semillas

Dado que todas las semillas se comportaron como ortodoxas (ver resultados), la longevidad potencial se determinó para las cuatro especies, siguiendo la metodología de envejecimiento acelerado propuesta por Newton et al. (2014). Para ello, 12 muestras de 100 semillas por especie se colocaron en desecadores con sal de CaNO_3 para simular 60 % HR, a una temperatura constante de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas condiciones fueron controladas, durante todo el experimento, mediante un registrador de datos (“data logger” HOBO UX 100). En intervalos de tiempo, cuatro réplicas de 25 semillas se extrajeron de los desecadores para evaluar su capacidad germinativa, hasta que ninguna semilla germinó. En primera instancia, los intervalos de tiempo se planificaron siguiendo el protocolo estándar de Probert et al. (2009) en el que las semillas se removerían después de 0, 1, 2, 5, 9, 15, 20, 30, 50, 75, 100 y 125 días. Sin embargo, estos intervalos de tiempo se fueron modificando, dependiendo del último registro de germinación. Así, especies que disminuían su capacidad germinativa con mayor velocidad se evaluaron antes del intervalo planificado (*H. impetiginosus* y *J. mimosifolia*), mientras que especies en las que la capacidad germinativa se mantenía constante fueron ampliando sus intervalos de tiempo (*N. alba* y *P. nitens*). Estos ajustes se realizaron para obtener el mayor número posible de intervalos que incluyan la disminución significativa de la germinación (ver Newton et al., 2014). Las semillas de *N. alba* y *P. nitens* se envejecieron intactas y escarificadas mecánicamente para evaluar el efecto de la cubierta dura impermeable sobre la longevidad de las semillas.

Los porcentajes de germinación a lo largo del tiempo se graficaron en curvas de supervivencia de las semillas, que se ajustaron mediante un análisis *Probit* (Hay et al., 2014), empleando la ecuación de viabilidad descrita por Ellis & Roberts (1980):

$$v = K_i - (p/\sigma), \quad (1)$$

donde v es la viabilidad de las semillas (en desviaciones equivalentes normales; NED) en un tiempo p (días), K_i es una medida de la viabilidad inicial (NED) y σ es la desviación estándar de la distribución normal que describe la frecuencia de semillas muertas en el tiempo p de envejecimiento. El P_{50} o tiempo requerido para que la viabilidad disminuya al 50 % se calculó mediante la ecuación:

$$P_{50} = K_i \times \sigma \quad (2)$$

Las especies se clasificaron en semillas de vida muy corta ($P_{50} \leq 2$ días), vida corta (P_{50} entre 2 y 10 días), vida intermedia (P_{50} entre 10 y 100 días), vida larga (P_{50} entre 100 y 1000 días) y vida muy larga ($P_{50} \geq 1000$ días). Las categorías se basaron en lo establecido por Probert et al. (2009), ajustado por Mondoni et al. (2011) y Davies et al. (2020), siguiendo una escala logarítmica.

Análisis estadístico

Modelos lineales generalizados (MLG) se emplearon para evaluar el efecto de la humedad relativa (HR), la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre el número de semillas germinadas, por su distribución binomial. En el modelo, el número de semillas germinadas fue usado como variable dependiente, mientras que el número

de semillas sembradas se ingresó como covariable. La HR, la temperatura y el tiempo de almacenamiento fueron considerados como factores fijos. Cuando los factores tuvieron efecto significativo ($P < 0,05$), se utilizó la prueba de comparación de múltiples medias DGC (Di Rienzo et al., 2020) para establecer las diferencias entre ellas. Los tratamientos en los que la germinación fue igual a cero, en todas las réplicas, no fueron incluidos en el análisis. Todos los análisis estadísticos se realizaron con InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

RESULTADOS

Caracterización de las semillas

El peso y el contenido de humedad (CH) inicial de las semillas fueron variables entre las especies (Tabla 1). *Jacaranda mimosifolia* fue la especie con las semillas más livianas ($10,7 \pm 1,6$ mg) y *Pterogyne nitens* las más pesadas ($95,5 \pm 22,6$ mg). El menor CH inicial se registró en *P. nitens* ($5,8 \pm 0,02$ %), mientras que el mayor en *J. mimosifolia* ($8,1 \pm 0,2$ %). En todos los casos, la viabilidad inicial de las semillas (V_i) fue mayor o igual a 87%. El porcentaje de germinación inicial fue mayor o igual a 83 % en *Handroanthus impetiginosus*, *J. mimosifolia*, y en las semillas escarificadas de *Neltuma alba* y *P. nitens*. En estas especies, cuando las semillas se sembraron intactas, sin escarificar, germinaron un 13% y 36%, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de las poblaciones evaluadas. Provincia Fitogeográfica, localidad, latitud y longitud de los sitios de colecta, peso de la semilla (PS; media \pm desvío estándar), contenido de humedad inicial (CH_i; media \pm error estándar), viabilidad inicial determinada por la prueba de tetrazolio (V_i ; media \pm desvío estándar) y porcentaje de germinación inicial (G_i ; media \pm error estándar). En cada especie se indica entre paréntesis el número de individuos recolectados por sitio. La Provincia Fitogeográfica a la que pertenece cada sitio se estableció según Oyarzabal et al. (2018). En G_i de *N. alba* y *P. nitens* se indica entre paréntesis el porcentaje de germinación corresponde a las semillas intactas, sin escarificar.

Especie	Provincia Fitogeográfica	Localidad	Latitud (°S)	Longitud (°O)	PS (mg)	CH _i (%)	V _i (%)	G _i (%)
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (7)	Chaqueña	Metán	25° 22'	64° 47'	77,7 \pm 22,3	7,3 \pm 0,2	95 \pm 2	98 \pm 1,4
<i>Jacaranda mimosifolia</i> (5)	Yungas	La Caldera	24° 41'	65° 23'	10,7 \pm 1,6	8,1 \pm 0,2	87 \pm 2	83 \pm 3,8
<i>Neltuma alba</i> (5)	Chaqueña	La Viña	25° 27'	65° 33'	39,1 \pm 1,6	7,5 \pm 0,6	94 \pm 2,3	93 \pm 1 (13 \pm 4,1)
<i>Pterogyne nitens</i> (10)	Yungas	Tartagal	22° 30'	63° 47'	95,5 \pm 22,6	5,8 \pm 0	89 \pm 3,8	84 \pm 3,2 (36 \pm 4,8)

Comportamiento durante el almacenamiento

Los porcentajes de germinación cuando las semillas permanecieron en un ambiente con 60 % HR y 15 % HR no presentaron diferencias significativas con las semillas frescas recién colectadas ($P > 0,05$; Fig. 1 y 2), al igual que las semillas desecadas a 15 % HR y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses. Durante el tiempo de almacenamiento, el menor porcentaje de germinación correspondió

a semillas almacenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *P. nitens* (60 %, $P < 0,0001$; Fig. 2), y a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *H. impetiginosus*, *J. mimosifolia* y *N. alba* (79 %, $P = 0,0008$; 64%, $P = 0,0065$ y 62 %, $P < 0,0001$; respectivamente; Fig. 1 y 2). Las semillas intactas de *N. alba* y *P. nitens* no superaron el 25 % y 37 % de germinación en los tratamientos evaluados, siendo significativamente diferentes de la germinación en semillas escarificadas ($P < 0,05$; Fig. 2).

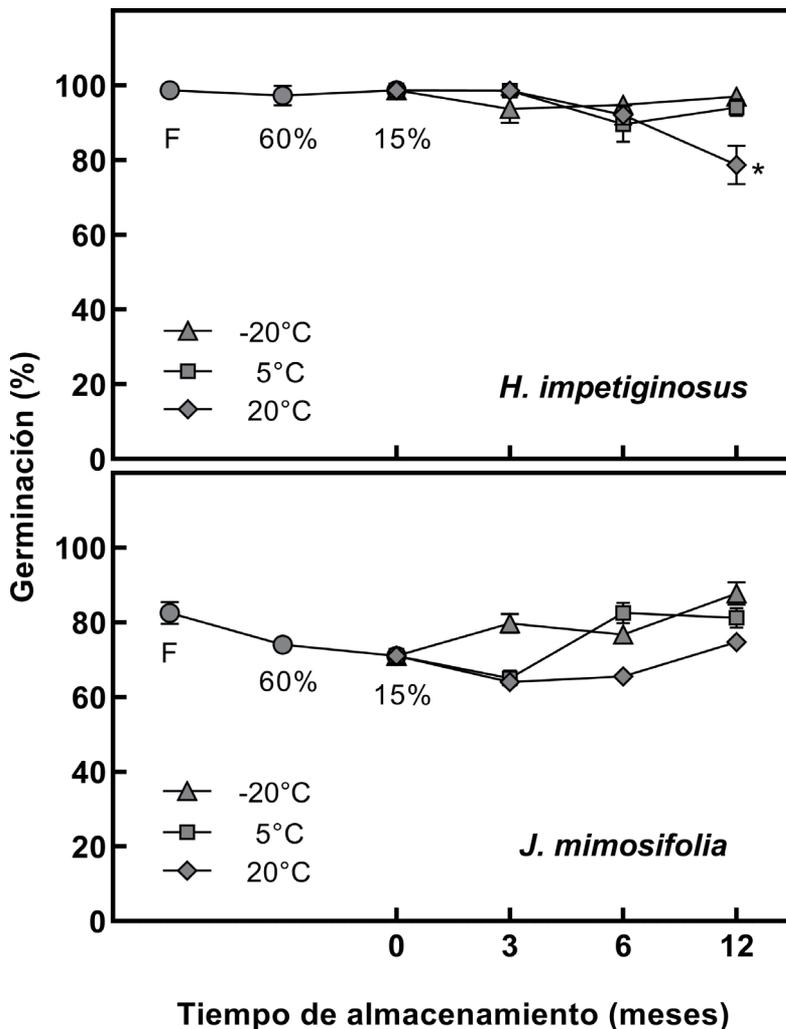


Fig. 1. Porcentaje de germinación (media \pm error estándar) de las semillas de *Handroanthus impetiginosus* y *Jacaranda mimosifolia*, almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 3, 6 y 12 meses, respectivamente. Abreviaturas: **F**, semillas frescas; **60%**, semillas almacenadas a 60 % HR; **15%**, semillas almacenadas a 15 % HR. Un asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos ($P < 0,05$).

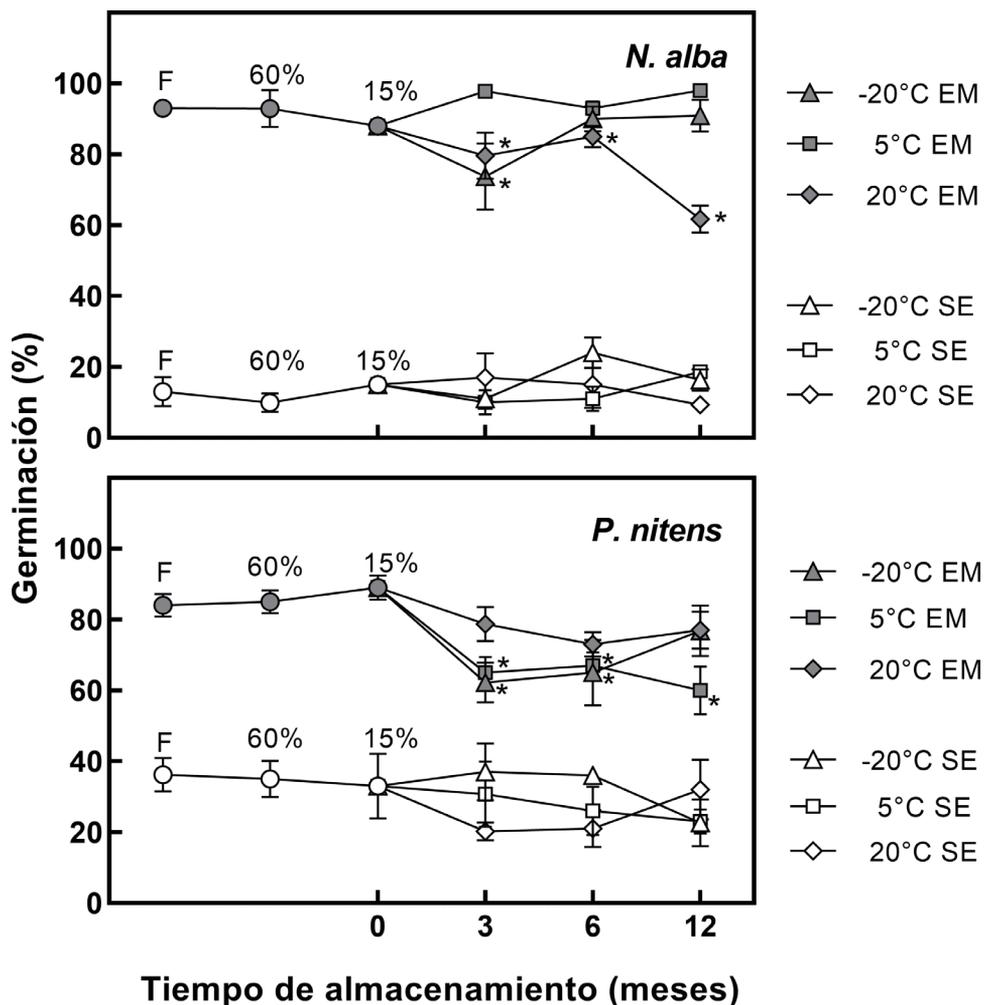


Fig. 2. Porcentaje de germinación (media \pm error estándar) de las semillas de *Nelutma alba* y *Pterogyne nitens*, almacenadas a -20 °C, 5 °C y 20 °C, durante 3, 6 y 12 meses, respectivamente. Abreviaturas: F, semillas frescas; 60%, semillas almacenadas a 60 % HR; 15%, semillas almacenadas a 15 % HR; EM, semillas escarificadas mecánicamente; SE, semillas intactas, sin escarificado. Un asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos ($P < 0,05$).

Longevidad potencial de las semillas

Las curvas de supervivencia de las semillas, obtenidas empleando la ecuación (1), se observan en la Fig. 3. El tiempo en el que la germinación fue igual a 0 % fue variable entre especies. En *H. impetiginosus* las semillas perdieron la totalidad de su capacidad germinativa en 26 días, mientras que las semillas de *J. mimosifolia* alcanzaron el 0% de germinación a los 50 días. Los intervalos de tiempo en las semillas intactas de *P. nitens* se extendieron

hasta los 200 días, momento en el que se registró 3% de germinación. Por el contrario, en *N. alba*, se registró un 70 % de germinación en el día 396, momento en el que se utilizó la última muestra de semillas envejecidas (de 12 muestras almacenadas inicialmente), por lo que no fue posible establecer el tiempo correspondiente a 0 % de germinación en esta especie. Para *N. alba* y *P. nitens*, las curvas de supervivencia fueron diferentes entre semillas envejecidas intactas y escarificadas.

En las semillas escarificadas de *N. alba* y *P. nitens*, se alcanzó el 0% de germinación a los 160 y 75 días, respectivamente (Fig. 3).

El P_{50} obtenido a partir de la ecuación (2) fue variable entre las especies (Tabla 2). Las semillas de *H. impetiginosus* registraron el menor valor de P_{50} ($P_{50} = 7,7$ días), mientras que *N. alba* registró el valor más alto ($P_{50} = 700$ días), siendo la única especie cuyo P_{50} superó los 100 días. Las semillas envejecidas escarificadas de *N. alba* y *P. nitens* murieron antes que las semillas intactas y, en consecuencia, el P_{50} fue menor. La mayor diferencia entre P_{50} correspondió a *N. alba*, dónde las semillas escarificadas presentaron un $P_{50} = 55,3$ días y las semillas intactas un $P_{50} = 700$ días. En todos los casos, los valores estimados del análisis *Probit* se ajustaron con $R^2 > 0,8$ (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo requerido para que la viabilidad disminuya al 50% (P_{50}). En especies con dormición física (*N. alba* y *P. nitens*), las semillas se envejecieron bajo dos tratamientos: intactas sin escarificación (SE) y escarificadas mecánicamente (EM). El valor de R^2 corresponde al análisis *Probit*.

Especie	Tratamiento	P_{50} (días)	Esperanza de vida	R^2
<i>Handroanthus impetiginosus</i>		7,7	Corta	0,9
<i>Jacaranda mimosifolia</i>		10,3	Intermedia	0,9
<i>Neltuma alba</i>	SE	700	Larga	0,8
	EM	55,3	Intermedia	0,8
<i>Pterogyne nitens</i>	SE	68,3	Intermedia	0,9
	EM	23,2	Intermedia	0,9

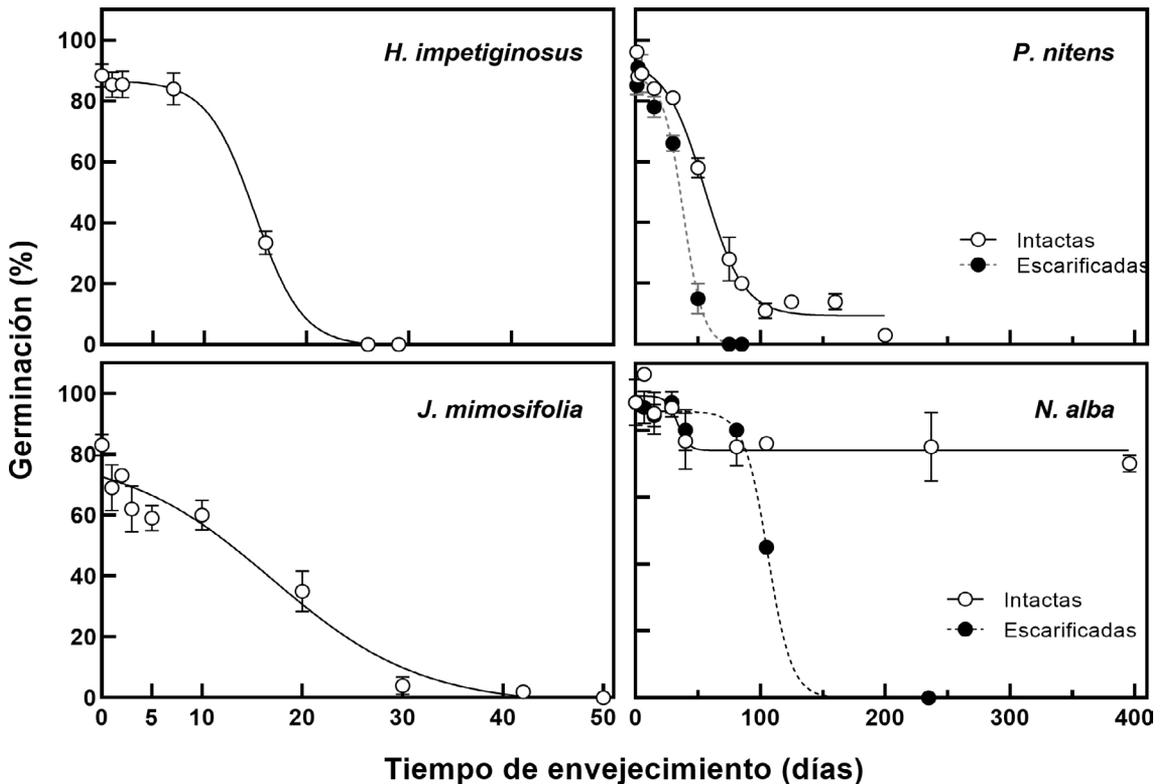


Fig. 3. Curvas de supervivencia de las semillas. Porcentaje de germinación (media ± error estándar) en función del tiempo de envejecimiento. Los puntos negros y las líneas entrecortadas indican que las semillas fueron escarificadas mecánicamente antes de iniciar el envejecimiento acelerado, a diferencia de las semillas intactas, sin escarificar, en puntos blancos y líneas completas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo, las semillas de las cuatro especies toleraron la desecación (4-5 % CH) y el almacenamiento a bajas temperaturas (-20 °C) durante 12 meses, por lo que pueden clasificarse como ortodoxas y, por lo tanto, conservarse en bancos de semillas. Resultados similares se registraron en otras especies de árboles nativos de Argentina pertenecientes a los géneros *Amburana*, *Aspidosperma*, *Cedrela*, *Cordia*, *Erithryna*, *Neltuma*, *Parkinsonia*, *Strombocarpa*, *Tecoma* y *Zizipus* (De Viana et al., 2009; Giamminola et al., 2012; Morandini et al., 2013; Galíndez et al., 2015, 2019; Urtasun et al., 2015; Otegui et al., 2016). Si bien, estos resultados coinciden con la información presente en las bases de datos SID KEW (SER, INSR, RBGK, 2023) y GENESYS (USDA, 2023), otros estudios indicaron una disminución de la germinación por efecto de la desecación en poblaciones de *Handroanthus impetiginosus* provenientes de Brasil, distinto a lo observado en este trabajo (Ribeiro & Borghetti, 2014; Da Silva Araújo et al., 2021). Estas diferencias podrían estar asociadas a la variabilidad inter poblacional, a lo largo de gradientes ambientales, como se ha registrado en otras especies de árboles de la región (Carón et al., 2020; Galíndez et al., 2019). Futuros estudios deberán evaluar la variación inter poblacional en la respuesta germinativa de las cuatro especies estudiadas aquí y su implicancia sobre el comportamiento durante el almacenamiento. En las especies estudiadas, la sensibilidad al almacenamiento a 5 °C y 20 °C, denota la importancia de conservar las semillas en condiciones óptimas de banco de semillas (15 % HR y -20 °C) a fin de evitar el deterioro producido por temperaturas de almacenamiento inadecuadas (Galíndez et al., 2019; Solberg et al., 2020). Esto debe tenerse en cuenta en el diseño de protocolos de conservación específicos, los que deben considerar las posibles variaciones entre poblaciones de una misma especie, antes mencionadas.

De acuerdo con los resultados, la desecación y el almacenamiento a bajas temperaturas no afectó el estado de dormición física en las dos especies de leguminosas (*Neltuma alba* y *Pterogyne nitens*).

Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores cuando se evaluó el efecto del almacenamiento sobre la dormición física (Galíndez et al., 2010; Godefroid et al., 2010; Ashworth et al., 2017). Morandini et al. (2013), registraron que las semillas frescas de *P. nitens* no presentaban dormición física, y, acorde a los bajos porcentajes de germinación obtenidos en semillas intactas durante el almacenamiento, ellos propusieron que las semillas adquieren un estado de dormición inducida cuando son desecadas. Contrario a esto, las semillas de *P. nitens* evaluadas en nuestro trabajo, presentaron dormición física cuando fueron evaluadas frescas y luego de ser sometidas a desecación. La presencia de dormición física en esta especie también fue reportada por Pece et al. (2010) y Nascimiento et al. (2021). Futuros estudios deberían reevaluar la presencia de dormición física en otras poblaciones, incluyendo la población estudiada por Morandini et al. (2013), analizando la variación espacial y temporal de esta característica a lo largo de su distribución geográfica en el noroeste de Argentina.

Las curvas de supervivencia de la semilla y la ecuación de viabilidad permitieron clasificar a las especies según su longevidad potencial comparativa. Teniendo en cuenta su valor de P_{50} , *H. impetiginosus* se clasifica como especie de vida corta, *Jacaranda mimosifolia* y *P. nitens* como especies de vida intermedia y *N. alba* como especie de larga vida. Si bien las especies de la familia Fabaceae se han caracterizado como longevas, puede observarse un amplio rango de P_{50} entre las especies ya evaluadas. De esta manera, especies de una misma familia pueden incluirse en distintas categorías de longevidad potencial (Walters et al., 2005; Probert et al., 2009; Solberg et al., 2020). Se ha indicado que la longevidad potencial puede variar entre especies dentro de una misma forma de vida (por ejemplo, árboles), linaje, o incluso entre poblaciones de una misma especie (Walters et al., 2005; Probert et al., 2009; Mondoni et al., 2011; Daives et al., 2020; Pritchard et al., 2020). La importancia de esta prueba reside en que es una herramienta de suma utilidad, ya que permitiría saber cuándo debe regenerarse el material conservado si se trata de especies de ciclo de vida corto o cuándo colectar nuevo germoplasma en el caso de especies perennes (Walters, 2015).

De acuerdo con los resultados, el monitoreo debe ser diferenciado entre especies de vida corta, intermedia y larga. Se ha propuesto que para especies clasificadas como longevas (como *N. alba*), el monitoreo debería realizarse a intervalos de tiempo más amplios que los estándares (por ejemplo, cada 15 años; Ellis et al., 2018; Hanson & Ellis, 2020). Mientras que, para especies de vida corta (como *H. impetiginosus*), será recomendable incorporar monitoreos antes de los 10 años (Probert et al., 2009).

Por último, las dos especies estudiadas de la familia Fabaceae (*N. alba* y *P. nitens*) presentaron longevidades diferentes cuando el envejecimiento acelerado se realizó en semillas escarificadas y sin escarificación. Sin embargo, en *P. nitens*, dicha diferencia no fue suficiente para alcanzar una categoría diferente, ya que en ambos casos se clasificó como de categoría intermedia. Independientemente de esto, la presencia de dormición física en las semillas de leguminosas (y posiblemente de otras familias con este tipo de dormición) les conferiría una gran longevidad durante el almacenamiento. Si bien se conoce poco sobre el impacto que la cubierta dura tiene sobre la longevidad de las semillas, se ha propuesto que la actividad metabólica sería extremadamente lenta, con un reducido intercambio con el medio (Chin et al., 2013). Estas características podrían ser muy valiosas para la propagación de las especies con fines restaurativos y de producción, principalmente para *N. alba* que, según informes, actualmente se propaga por técnicas de injerto y cultivo de tejidos *in vitro* (López Lauenstein et al., 2021). Nuestros resultados indican que, las semillas de *N. alba*, conservadas con escarificación previa (i.e. con ruptura de la dormición física; lista para la siembra), pueden sobrevivir por periodos similares a los de especies clasificadas como de vida intermedia, lo que facilitaría su conservación a corto-mediano plazo en bancos activos y su posterior uso con fines de producción, regeneración y restauración.

En conclusión, las semillas de las cuatro especies toleran la desecación, son ortodoxas y pueden almacenarse en bancos de semillas. Las semillas intactas de *N. alba* y *P. nitens* conservan su estado de dormición física incluso después de permanecer almacenadas 12 meses, en condiciones de 15% HR y -20 °C.

Las semillas de *H. impetiginosus* se clasificaron como de vida corta, las de *J. mimosifolia* y *P. nitens* como de vida intermedia y las de *N. alba* como de larga vida, siendo estas últimas las únicas en las que la longevidad en semillas escarificadas correspondió a una categoría diferente (vida intermedia). La información obtenida en este trabajo permitirá incorporar nuevas poblaciones a la Red de Bancos de Germoplasma (RBG) del INTA y la Red Argentina de Bancos de Germoplasma de Plantas Nativas (Red-ARGENA), incrementando el conocimiento sobre la longevidad de las semillas en estas cuatro especies de árboles nativos.

BIBLIOGRAFÍA

- Americas Regional Workshop. 1998. *Amburana cearensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998. DOI: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32291A9687595.en>
- Ashworth, L.; J. Camina & G. Funes. 2017. Dormición física en *Lepechinia floribunda* (Lamiaceae): Un arbusto nativo de interés medicinal. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 52: 689-696.
- Barstow, M. 2018. *Gonopterodendron sarmientoi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. DOI: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T32028A68085692.en>
- Cabrera, A. L. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. Pp. 1-85 en W. F. Kugler (ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo 2. 2da edición. Acme, Buenos Aires, Argentina. Fascículo 1.
- Carón, M. M.; P. De Frenne, K. Verheyen, A. Quinteros & P. Ortega-Baes. 2020. Germination responses to light of four Neotropical forest tree species along an elevational gradient in the southern Central Andes. *Ecological Research* 35: 550-558. DOI: <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12112>
- Chin, H. F.; P. Quek & U. R. Sinniah. 2013. Seed Banks for Future Generation. En M. N. Normah, H. F. Chin & B. M. Reed (eds.), *Conservation of Tropical Plant Species*, pp. 43-63. New York: Springer.
- Curti, R. N.; J. Sajama & P. Ortega-Baes. 2017. Setting conservation priorities for Argentina's pseudocereal crop wild relatives. *Biological Conservation* 209: 349-355. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.03.008>
- Da Silva Araújo, M. E.; M. L. de Negreiros & M. Shibata. 2021. Secagem e armazenamento de sementes de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos (Bignoniaceae). *Revista de Ciências Agrárias – Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 64: 1-6.

- Davies, R.; A. Di Sacco & R. Newton. 2015. *Germination testing: procedures and evaluation*. London: Millennium Seed Bank Partnership.
- Davies, R. M.; A. R. Hudson, J. B. Dickie, C. Cook, T. O'Hara & C. Trivedi. 2020. Exploring seed longevity of UK native trees: implications for *ex situ* conservation. *Seed Science Research* 30: 101-111. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258520000215>
- De Viana, M. L.; M. J. Mosciaro & M. N. Morandini. 2009. Tolerancia a la desecación de semillas de dos especies arbóreas del Chaco Salteño (Argentina): *Erithryna falcata* Benth. y *Tecoma garrocha* Hieron. *Revista UDO Agrícola* 9: 590-594.
- Di Rienzo, J. A.; F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C. W. Robledo. 2020. InfoStat versión 2020. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Ellis, R. H. & E. H. Roberts. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085797>
- Ellis, R. H.; M. Nasehzadeh, J. Hanson & Y. Woldemariam. 2018. Medium-term seed storage of 50 genera of forage legumes and evidence-based genebank monitoring intervals. *Genetic resources and crop evolution* 65: 607-623. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0558-5>
- Galíndez, G.; G. Malagrina, D. Ceccato, T. Ledesma, L. Lindow-López & P. Ortega-Baes. 2015. Dormición física y conservación *ex situ* de semillas de *Amburana cearensis* y *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 50: 153-161. DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v51.n1.14370>
- Galíndez, G.; P. Ortega-Baes; C. E. Seal; M. I. Daws; A. L. Scopel & H. W. Pritchard. 2010. Physical seed dormancy in *Collaea argentina* (Fabaceae) and *Abutilon pauciflorum* (Malvaceae). *Seed Science and Technology* 38: 778-783. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.3.25>
- Galíndez, G.; T. Ledesma, A. Álvarez, V. Pastrana-Ignes, T. Bertuzzi, L. Lindow-López & P. Ortega-Baes. 2019. Intraspecific variation in seed germination and storage behaviour of *Cordia* tree species of subtropical montane forests of Argentina: Implications for *ex situ* conservation. *South African Journal of Botany* 123: 393-399. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.029>
- Giamminola, E. M.; M. N. Morandini & M. L. De Viana. 2012. Respuesta a la desecación y a la temperatura de almacenamiento del germoplasma de *Prosopis nigra* (Grisebach) Hieron. y *Ziziphus mistol* Griseb. *Gestión y Ambiente* 15: 19-26.
- Godefroid, S.; A. Van de Vyver & T. Vanderborght. 2010. Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation* 19: 1365-1383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-009-9767-3>
- Hanson, J. & R. H. Ellis. 2020. Progress and challenges in *ex situ* conservation of forage germplasm: Grasses, herbaceous legumes and fodder trees. *Plants* 9: 446. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9040446>
- Hay, F.R. & R. J. Probert. 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation physiology* 1: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cot030>
- Hay, F. R.; A. Mead & M. Bloomberg. 2014. Modelling seed germination in response to continuous variables: use and limitations of probit analysis and alternative approaches. *Seed Science Research* 24: 165-186. DOI: <https://doi.org/10.1017/S096025851400021X>
- Hay, F. R. 2021. New technologies to improve the *ex situ* conservation of plant genetic resources. En M. Ehsan-Dulloo (ed.), *Plant genetic resources*, pp. 185-216. London: Burleigh Dodds Science Publishing.
- Hills, R. 2020. *Jacaranda mimosifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020. DOI: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T32027A68135641.en>
- Hills, R. 2021. *Cedrela angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021. DOI: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T61794858A61794860.en>
- Hong, T. D. & R. H. Ellis. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. Tech Bull 1. Roma: Biodiversity International.
- ISTA. 2016. *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf: International Seed Testing Association.
- IUCN 2023. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org/>
- Juárez, A.; P. Ortega-Baes, S. Sühling, W. Martin & G. Galíndez. 2007. Spatial patterns of dicot diversity in Argentina. *Biodiversity and conservation* 16: 1669-1677. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9037-6>
- Junio-Ramos, S.; C. F. Caldeira, M. Gastauer, D. L. P. Costa, A. E. Furtini Neto, F. B. M. de Souza, P. W. M. SouzaFilho & J. O. Siqueira. 2019. Native leguminous plants for mineland revegetation in the eastern Amazon: seed characteristics and germination. *New Forests* 50: 859-872. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09704-1>
- López-Lauenstein, D.; I. Teich, E. Carloni, M. Melchiorre, M. Sagadin, J. Frassoni & M. J. Joseau. 2021. Genetic Breeding of *Prosopis* Species from the "Great American Chaco". En M. J. Pastorino & P. Marcelli (eds.), *Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina*, pp. 271-293. Cham: Springer.

- Martínez, S. M. 2006. Guía de árboles nativos de la Provincia de Salta: noroeste argentino. Salta: Ministerio de Educación de la Provincia de Salta.
- Mondoni, A.; R. J. Probert, G. Rossi, E. Vegini & F. R. Hay. 2011. Seeds of alpine plants are short lived: implications for long-term conservation. *Annals of Botany* 107: 171-179. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcq222>
- Morandini, N.; E. Giamminola & M. L. De Viana. 2013. Tolerancia a la desecación de semillas de *Prosopis ferox* y *Pterogyne nitens* (Fabaceae). *Revista de Biología Tropical* 61: 335-342.
- Mounce, R.; P. Smith & S. Brockington. 2017. *Ex situ* conservation of plant diversity in the world's botanic gardens. *Nature Plants* 3: 795-802. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0019-3>
- Nascimento, J. P. B.; B. F. Dantas & M. V. Meiado. 2021. Hydropriming changes temperature thresholds for seed germination of tree species from the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Journal of Seed Science* 43: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v43238649>
- Newton, R.; F. Hay & R. Probert. 2014. *Protocol for comparative seed longevity testing*. London: Millennium Seed Bank Partnership.
- Ortega-Baes, P.; M. Aparicio-González, G. Galíndez, P. del Fueyo, S. Sühling & M. Rojas-Aréchiga. 2010. Are cactus growth forms related to germination responses to light? A test using *Echinopsis* species. *Acta Oecologica* 36: 339-342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actao.2010.02.006>
- Ortega-Baes, P.; G. Galíndez, S. Sühling, M. Rojas-Aréchiga, M. I. Daws y H. W. Pritchard. 2011. Seed germination of *Echinopsis schickendantzii* (Cactaceae): The effects of constant and alternating temperatures. *Seed Science & Technology* 39: 219-224. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.21>
- Otegui, M. B.; D. S. Ojeda, M. E. Totaro, B. I. Eibl, M. B. Valdés & G. Y. Mallozzi. 2016. Comportamiento y longevidad de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. Frente al Ultrasecado. *Revista de Ciencia y Tecnología* 25: 15-19.
- Oyarzabal, M.; J. Clavijo, L. Oakley, F. Biganzoli, P. Tognetti, I. Barberis, H. M. Maturo, R. Aragón, P. I. Campanello, D. Prado, M. Oesterheld & R. J. C. León. 2018. Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral* 28: 40-63.
- Pece, M.; C. Gaillard, M. Acosta, C. Bruno & S. Saavedra. 2010. Tratamientos pre germinativos para tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul.). *Foresta veracruzana* 12: 17-25.
- Pelissari, F.; A. C. José, M. A. L. Fontes, A. C. B. Matos, W. V. S. Pereira & J. M. R. Faria. 2018. A probabilistic model for tropical tree seed desiccation tolerance and storage classification. *New forests* 49: 143-158. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9610-8>
- Pritchard, H. W. & J. B. Dickie. 2003. Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations. En R. D. Smith, J. B. Dickie, S. H. Linington, H. W. Pritchard & R. J. Probert (eds.), *Seed conservation: turning science into practice*, pp. 653-722. Richmond: Royal Botanic Gardens Kew.
- Pritchard, H. W.; J. F. Moat, J. B. Ferraz, T. R. Marks, J. L. C. Camargo, J. Nadarajan & I. D. Ferraz. 2014. Innovative approaches to the preservation of forest trees. *Forest Ecology and Management* 333: 88-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.08.012>
- Pritchard, H. W. 2020. Diversity in seed longevity amongst biodiverse seeds. *Seed Science Research* 30: 75-80. <https://doi.org/10.1017/S0960258520000306>
- Probert, R. J.; M. I. Daws & F. R. Hay. 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany* 104: 57-69. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcp082>
- Ribeiro, L. C. & F. Borghetti. 2014. Comparative effects of desiccation, heat shock and high temperatures on seed germination of savanna and forest tree species. *Austral Ecology* 39: 267-278. DOI: <https://doi.org/10.1111/aec.12076>
- SER, INSR, RBGK. Society for Ecological Restoration, International Network for Seed Based Restoration and Royal Botanic Gardens Kew. 2023. Seed Information Database (SID). <https://ser-sid.org/>
- Solberg, S. Ø.; F. Yndgaard, C. Andreassen, R. Von Bothmer, I. G. Loskutov & A. Asdal. 2020. Long-term storage and longevity of orthodox seeds: A systematic review. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01007>
- Urtasun, M. M.; E. M. Giamminola & M. L. De Viana. 2015. Tolerancia al ultrasecado y a la temperatura de almacenamiento en semillas de tres especies nativas del Noroeste Argentino. *Lhawet* 4: 27-31.
- USDA. 2023. GENESYS database. <https://www.genesys-pgr.org/>
- Volante, J. N.; M. J. Mosciaro, G. I. Gavier-Pizarro & J. M. Paruelo. 2016. Agricultural expansion in the Semiarid Chaco: Poorly selective contagious advance. *Land use policy* 55: 154-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2016.03.025>
- Walters, C.; L. M. Wheeler & J. M. Grotenhuis. 2005. Longevity of seeds stored in a gene bank: species characteristics. *Seed Science Research* 15: 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1079/SSR2004195>
- Walters, C. 2015. Genebanking seeds from natural populations. *Natural Areas Journal* 35: 98-105. DOI: <https://doi.org/10.3375/043.035.0114>