

# ANÁLISIS DE TIEMPO Y RIESGO DE GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE *Hura crepitans* L IMBIBIDAS EN AGUA

Analysis of time and risk of germination in *Hura crepitans* L seeds imbibed in water

Vale Montilla César <sup>1</sup>,

Universidad de Los Andes, Núcleo Universitario Rafael Rangel

e-mail: cvale@ula.ve - cesarva2003@gmail.com

## Resumen

El análisis de germinación presenta ciertas limitaciones, especialmente cuando al final del experimento se encuentran semillas sin germinar. Para solucionar esta situación se utilizaron análisis de tiempo-evento, incluyendo métodos no paramétricos, semiparamétricos (inclusión de covariables categóricas) y paramétricos (relación entre predictores y tiempo de supervivencia). Las semillas se sembraron individualmente en envases de polietileno, en un diseño de bloques al azar. Los tratamientos consistieron de inmersión de semillas en agua durante 6, 12, 18 y 24 horas y un testigo (sin inmersión, 0 horas). La germinación se evaluó diariamente durante 30 días. Los objetivos consistieron en analizar la variación temporal y riesgo de germinación de *H. crepitans* L. Con LIFETEST (SAS), las pruebas de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ), se tiene evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula que los cinco tratamientos tienen igual función de supervivencia, es decir, la misma distribución de probabilidad para los eventos de germinación en el tiempo ( $p = 0,0003$ ). Al ajustar el modelo de Cox (PROC PHREG), las correlaciones entre las covariables y el tiempo resultaron bajas y  $p > 0,05$ , lo que implicó aceptar el modelo, para diferentes etapas de germinación. Además, se propuso un modelo ATF (PROC LIFEREG) y por Criterio de Información Akaike, se seleccionó la distribución Log normal para describir la supervivencia en el tiempo. El tratamiento sin inmersión en agua resultó con mayor prolongación de tiempo de germinación. En los tratamientos con inmersión, a mayor tiempo, la germinación obtuvo menor prolongación de la germinación.

**Palabras clave:** germinación; análisis de supervivencia; Kaplan Meier; riesgo proporcional de Cox; tiempo de falla acelerada.

**Recibido:** 28/06/2023 **Aprobado:** 27/09/2023

<sup>1</sup>Ingeniero Forestal de la Universidad de Los Andes, Magíster en Entomología de la Universidad Central de Venezuela, Profesor de la Universidad de Los Andes. e-mail: cvale@ula.ve - cesarva2003@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6528-7231>.

**Abstract**

The germination analysis presents certain limitations, especially when non-germinated seeds are found at the end of the experiment. To solve this situation, time-event analyzes were used, including non-parametric, semi-parametric (inclusion of categorical covariates) and parametric (relationship between predictors and survival time) methods. The seeds were sown individually in polyethylene containers, in a randomized block design. The treatments consisted of immersion of seeds in water for 6, 12, 18 and 24 hours and a control (without immersion, 0 hours). Germination was evaluated daily for 30 days. The objectives consisted of analyzing the temporal variation and risk of germination of *H. crepitans* L. With LIFETEST (SAS), the Wilcoxon tests ( $p < 0.05$ ), there is sufficient evidence to reject the null hypothesis that the five treatments have equal survival function, that is, the same probability distribution for germination events over time ( $p = 0.0003$ ). When adjusting the Cox model (PROC PHREG), the correlations between the covariates and time were low and  $p > 0.05$ , which implied accepting the model for different germination stages. In addition, an ATF model (PROC LIFEREG) was proposed and by Akaike Information Criterion, the Log normal distribution was selected to describe survival over time. The treatment without immersion in water resulted in a greater prolongation of germination time. In the treatments with immersion, the longer the germination time, the lower the germination prolongation.

**Keyword:** germination; survival analysis; Kaplan Meier; Cox proportional hazard; accelerated failure time.

## Introducción

El jabillo, *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae), es un árbol monoico que alcanza alturas entre 15 y 25 m y diámetros entre 50 y 60 cm. Las flores femeninas y masculinas se encuentran en el mismo árbol, pero separadas entre sí; son carnosas y no tienen pétalos. El fruto es una cápsula grande en forma discoidal de 7,2 a 9,0 cm de diámetro y de 3,6 a 4,2 cm de altura, verde y luego castaño oscuro al madurar, dividida en 15 a 16 lóculos semicirculares por donde se abre, y explota violentamente, liberando una semilla por cada celda. El peso de 1000 semillas es de 1088 gramos y en un kilo se pueden encontrar de 700 a 910 semillas (Gómez y Toro, 2008; Aristeguieta, 2003; Hoyos, 1994; Oliva, 1969).

Según Gómez y Toro (2008), las semillas de jabillo presentaron porcentajes de germinación entre 73 y 87 % a los 7,5 y 11,5 meses de almacenamiento, respectivamente. Según los autores, las semillas no requieren ningún tratamiento pregerminativo, además de que la hidratación durante 4 y 8 horas es contraproducente en semillas almacenadas por más de 11 meses, ya que la germinación puede disminuirse hasta en un 47 % con respecto a semillas no tratadas.

Son numerosos los métodos de análisis de germinación, la mayoría de los cuales se dividen en tres clases: índices de germinación, análisis de regresión no lineal y análisis de tiempo hasta el evento, también conocido como análisis de supervivencia. Se requiere de métodos estadísticos rigurosos para probar hipótesis sobre las diferencias en patrones temporales de germinación entre tratamientos, además de métodos para probar hipótesis sobre efectos potenciales de covariables cuantitativas y cualitativas en el proceso germinativo. Algunos autores han señalado, que muchos de estos

métodos son defectuosos por motivos conceptuales o estadísticos, o proporcionan información que resulta inadecuada para muchas aplicaciones (Goodchild y Walker, 1971; Scott et al., 1984; Brown y Mayer, 1988). McNair, Sunkara y Frobish (2012), enfatizan sobre las siguientes interrogantes: ¿qué métodos estadísticos se deben utilizar para probar hipótesis del proceso germinativo? Sostienen que el problema se complica por el hecho de que los datos de germinación difieren de manera importante de otros tipos de datos biológicos. Indican que los datos normalmente se recopilan siguiendo cohortes de semillas, por lo que el porcentaje acumulativo de semillas que han germinado (o no) en días sucesivos de observación, exhibe autocorrelación en serie. También, las semillas no germinadas permanecen al finalizar los experimentos, sin tener conocimiento de su condición germinativa si el experimento hubiese continuado indefinidamente. Para tales semillas, el tiempo de germinación es mayor que la duración del experimento. En el análisis de sobrevivencia son datos conocidos como censurados a la derecha. ¿Cómo estimar válidamente la media o la varianza del tiempo de germinación? La presencia de tales observaciones censuradas por la derecha viola los supuestos de muchos métodos estadísticos clásicos y se requiere de métodos especializados.

Otros autores indican que una excepción importante son los métodos estadísticos denominados análisis de tiempo hasta el evento o supervivencia que permiten analizar los resultados tomando en cuenta observaciones o datos perdidos, datos sin distribución normal o con varianzas heterogéneas o resultados que reflejan germinación prácticamente simultánea (por lo tanto, difícil de comparar entre tratamientos), el último caso se analiza por el método de falla o caída acelerada (ATF). También permite calcular curvas predictivas para diferentes combinaciones de

variables. Sin embargo, presentan la desventaja de requerir programas complejos que implican una gran especialización en su manejo (Scott y Jones, 1982; Scott, Jones y Williams, 1984; Gunjaca y Sarcevic, 2000; Fox, 2001; Onofri et al., 2010; McNair et al., 2012). Para analizar los datos, estos autores incluyen métodos no paramétricos (estimadores de tabla de vida y Kaplan-Meier y otros métodos para comparar dos o más grupos de semillas), métodos semiparamétricos (modelo de riesgos proporcionales de Cox, que permite la inclusión de covariables categóricas y cuantitativas y efectos fijos y aleatorios). Por su parte, Romano & Stevanato (2020) amplían los métodos de análisis, incluyendo los métodos paramétricos.

Por lo anteriormente expresado, los objetivos del presente trabajo consisten en definir el efecto de tratamientos de tiempos de imbibición de semillas en agua, sobre la supervivencia y riesgo de supervivencia de semillas de *Hura crepitans* L., utilizando métodos no paramétricos, semiparamétricos y paramétricos en el análisis de los datos.

## **Materiales y métodos.**

### **Sistema de recolección y procesamiento de frutos.**

Se utilizaron semillas extraídas de frutos colectados de árboles plantados en los jardines de la Villa Universitaria del Núcleo Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, municipio Pampanito, estado Trujillo, Venezuela, a 392,49 msnm. La recolección de los frutos de jabillo se hizo durante el mes de marzo de 2020, con una podadora de extensión. Para extraer las semillas y culminar el secado, las cápsulas se colocaron dentro de una caja con fondo de malla metálica para permitir la aireación y puestas al sol hasta el secado y dehiscencia. Luego de la dehiscencia, las semillas se mantuvieron a

temperatura ambiente en el interior de bolsas de papel, hasta la siembra realizada en el mes de abril de 2020.

### **Diseño experimental y tratamientos pregerminativos.**

Antes de la siembra, las semillas se sometieron a diferentes tratamientos de tiempos de inmersión en agua, los cuales fueron: T1: sin inmersión de semillas en agua (testigo, 0 tiempo); T2: inmersión de semillas en agua durante 6 horas; T3: inmersión de semillas en agua durante 12 horas; T4: inmersión de semillas en agua durante 18 horas y T5: inmersión de semillas en agua durante 24 horas. El experimento fue realizado mediante un diseño de bloques al azar, con cinco repeticiones de diez envases de polietileno cada una (2 semillas/envase).

### **Siembra de semillas y evaluación de la germinación.**

Las semillas se colocaron en un envase plástico limpio con la cantidad de agua suficiente para cubrir las 100 semillas de cada tratamiento. Posterior al remojo por tiempo de inmersión de cada tratamiento, las semillas se extendieron en un lugar sombreado y se dejaron secar durante 30 minutos. La siembra de las 2 semillas se hizo por siembra directa en cada envase (6 cm de diámetro x 14 cm de altura), a una profundidad de 0,5 cm. Los envases se mantuvieron a campo abierto (intemperie) durante la evaluación del experimento. Mientras las semillas estuvieron en germinación, los riegos con agua se continuaron 2 veces por día. Para efectos prácticos, se consideró que una semilla había germinado al emerger el talluelo de la plántula, llevando un registro diario de semillas germinadas por tratamiento durante 30 días continuos después de la siembra (DDS).

### Hipótesis y nivel de significación.

El procedimiento LIFETEST permite comparar pares de curvas de supervivencia y detectar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas y probar la hipótesis nula de que las funciones de supervivencia son iguales entre curvas. La hipótesis nula ( $H_0$ ) es una hipótesis que la investigación trata de refutar o rechazar, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) es lo que la investigación plantea que es la causa de un fenómeno, indicando que las funciones de supervivencia no son iguales. El nivel de significancia del intervalo de confianza de la función de supervivencia por defecto es 0,05, que resulta en un intervalo de confianza de 95%.

### Análisis de datos.

Afortunadamente, los métodos utilizados para analizar los datos de tiempo de falla o germinación pueden manejar correctamente los datos censurados y no requieren datos distribuidos normalmente (Fox 2001; Allison 2010).

Debido a que las hipótesis de interés se refieren a las diferencias entre tratamientos de imbibición en diferentes tiempos de inmersión en agua, cada semilla individual seleccionada para la germinación por tratamiento se consideró una unidad experimental. Las semillas que no germinaron al final de este período se trataron como censuradas a la derecha. Afortunadamente, los métodos utilizados para analizar los datos de tiempo de falla pueden manejar correctamente los datos censurados y no requieren datos distribuidos normalmente (Fox 2001; Allison 2010).

Se utilizaron tres métodos estadísticos diferentes: análisis de las tablas de vida (LIFETEST o métodos de Kaplan-Meier), modelo de riesgo proporcional de

Cox y el modelo de tiempo de falla acelerada (ATF). Se adoptó un esquema de "observación continua" durante la duración del ensayo, asumiendo que los tiempos de germinación tuvieron un "dato exacto" para cada semilla (McNair et al. 2012).

Las variables tratamientos de inmersión en agua y días (tiempo para germinar), son variables cuantitativas, cada una con cinco y 100 valores, respectivamente. Para el análisis, en cada medición se asignaron valores de 1 o 0 para las semillas germinadas y no germinadas, respectivamente. Luego de cada conteo diario, cada semilla germinada fue removida del experimento. Se utilizaron códigos para discriminar entre los tratamientos ( $T_1=0$ ,  $T_2=6$ ,  $T_3=12$ ,  $T_4=18$  y  $T_5=24$ ). Los datos se analizaron con el paquete SAS (SAS 2020; Fox 2001), de la manera siguiente:

#### a. Análisis no paramétrico.

Los datos de germinación fueron descritos y modelados bajo dos probabilidades relacionadas: supervivencia y función de riesgo, ambas dependientes del tiempo. El procedimiento PROC LIFETEST, que imprime por defecto, los estadísticos Log-rank y Wilcoxon, así como valores de chi-cuadrado para las comparaciones entre tratamientos. Se utiliza la prueba de Wilcoxon en caso de presentarse cruzamientos entre curvas de germinación y, en caso contrario, la prueba de Log-Rank (Bárceñas et al. 2013; SAS 2020; Fox 2001; Fleming et al. 1987; Lee 1996; Buyske et al. 2000; Lee y Wang 2003).

Las diferencias de supervivencia entre covariables, se analizaron a partir de curvas de supervivencia construidas por el método Kaplan – Meier (Kaplan y Meier 1958; Klein et al. 2001; Gómez et al. 2009); para ello, se tomó en cuenta el estatus de cada semilla (status 1 = germinación, status 0 = censura

debido a semilla no germinada al final del experimento), así como el tiempo de germinación de la misma en días. Según Onofri et al. (2010), los tiempos de germinación se usan para calcular la probabilidad de germinación.

#### **b. Análisis semiparamétrico.**

Para probar el supuesto de riesgo proporcional se utilizó la función de regresión de Cox, con el procedimiento PHREG en SAS, con los términos de interacción entre covariables y el tiempo, además de la propia covariable; si el término de interacción es estadísticamente significativo, el modelo AFT es más apropiado (Cox, 1972; Lee & Wang, 2003). Se utilizaron otros métodos para verificar y avalar las suposiciones. El segundo, un análisis gráfico de Kaplan – Meier, utilizando las curvas de  $\log(-\log(S(t)))$  versus  $\log(t)$  y el tercero, análisis de residuales de Schoenfeld. Además, se corrió una prueba para analizar la multicolinealidad entre las variables, basado en el diagnóstico VIF. Un valor de  $VIF > 5$  se considera evidencia de multicolinealidad y un valor  $VIF > 10$  es indicio de fuerte multicolinealidad.

#### **c. Análisis paramétrico.**

En este caso, para la distribución de supervivencia se asumió el modelo de tiempo de falla acelerado (AFT, por sus siglas en inglés), que postula una relación directa entre predictores y tiempo de supervivencia (George et al. 2014). Para determinar la distribución más apropiada y mejorar el potencial del modelo AFT, se ajustaron y compararon con PROC LIFEREG, cuatro distribuciones paramétricas (Weibull, Lognormal, Log-Logística y Exponencial). Para establecer el mejor ajuste entre las distribuciones, se utilizó el Criterio de información Akaike (AIC; Akaike, 1969).

### **Resultados y discusión.**

En ocasiones, la inmersión de semillas en agua incrementa la velocidad de germinación en semillas que no experimentan latencia o con ligeros niveles de esta, también se utiliza conjuntamente con un tratamiento más fuerte o seguido de este (CATIE, 2000). Por su parte, Schmidt (2000) ha planteado que donde la latencia física es relativamente débil, como en las semillas frescas de leguminosas, la inmersión en agua es suficiente para permitir la permeabilidad de la corteza seminal, mientras que el efecto de este mismo tratamiento en semillas duras varía con la especie; esto indica que en algunas especies las semillas se convierten en gradualmente permeables y en otras existe un pobre efecto del remojo continuo. De lo anterior se deriva la importancia de comparar los tratamientos de inmersión en agua.

Además, los datos de germinación presentan un especial problema estadístico: no se conoce si las semillas que no germinaron son capaces de germinar, están latentes, germinaron y luego murieron sin emerger el talluelo de la plántula o siempre fueron inviables. En el presente caso, las muestras presentaron mediana a alta germinación, sin saber en cual condición de las anteriores se encontraban, es decir, sin tener conocimiento de la condición germinativa que tenían las semillas sin germinar. En el análisis de sobrevivencia son datos conocidos como censurados a la derecha y para estimar válidamente la media o la varianza del tiempo de germinación se requiere de los métodos utilizados a continuación.

#### **a. Análisis no paramétrico.**

##### **Comparación entre tratamientos de inmersión.**

Para describir el proceso biológico de la germinación, existen algunos indicadores del lote de semillas, que permiten comparar tratamientos o cuantificar los efectos de factores experimentales

sobre el proceso. Entre ellos, la media y la mediana del tiempo de germinación (tiempo medio de germinación (T50): número de días transcurridos después de la incubación, para alcanzar el 50 % del porcentaje de germinación final). En algunos casos también se requieren otros tiempos para caracterizar mejor la primera y última fase del proceso, los tiempos para el 25 % o 75 % de germinación (T25 – T75), (Onofri et al. 2010). En las condiciones del ensayo, todos los tratamientos alcanzaron valores mayores al 50 % de germinación, donde el tratamiento de inmersión por 12 horas obtiene el menor tiempo medio de germinación (19 días). Los demás tratamientos presentaron tiempos medios de germinación muy cercanos, entre 20 – 22 días. Los valores de la media del tiempo de germinación resultaron variables, entre 18,7 – 21,6 días, donde inmersión durante 12 horas logró mayor velocidad de germinación, como expresión del número de días promedio empleados en la germinación (18,7 días) versus los demás tratamientos. Igualmente, presenta la mayor tasa de germinación (0,053 semillas germinadas/día), interpretada como valor recíproco del tiempo medio de

germinación (1/T50) (Cuadro 1). Según Ranal y García (2006), para los autores del índice, esta expresión debería interpretarse en el sentido de que altos valores deberían estar asociados con germinación concentrada en el tiempo. Además, para la primera fase de germinación (T25), el tratamiento de inmersión durante 12 horas, logró el menor tiempo para alcanzar el 25 % de germinación, con un tiempo estimado de 16 días, seguido por las inmersiones durante 18 y 24 horas (17 días). Estos resultados sugieren que el tiempo de inmersión óptimo es 12 horas. Según Vale (2022), al evaluar la germinación en *H. crepitans* mediante índices de germinación (Germinación acumulada, VG, TMG e IVG) y por modelos de crecimiento no lineal, el tratamiento con más alta germinación resultó inmersión en agua durante 12 horas (79 %), los tratamientos con inmersión en agua durante 6 – 18 y 24 horas, también presentaron porcentajes de germinación arriba de 70 % (74,0 – 73,0 y 75,0 %, respectivamente), mientras que la germinación más baja la presentó el tratamiento sin inmersión (68,0 %).

**Cuadro 1.** Cuantiles estimados para cada tratamiento de inmersión de semillas de *Hura crepitans* L, en días de germinación.

Variable tiempo (horas)	Media + ee	Porcentaje	Valor estimado	Intervalo de confianza (95%)		TG
				Bajo	Alto	
0	21,3±0,31	75	-	24,0	-	0,045
		50	22,0	21,0	24,0	
		25	19,5	18,0	20,0	
6	21,6±0,40	75	-	25,0	-	0,048
		50	21,0	20,0	23,0	
		25	18,0	17,0	20,0	
12	18,7±0,31	75	22,0	21,0	-	0,053
		50	19,0	17,0	20,0	
		25	16,0	15,0	17,0	
18	19,7±0,30	75	-	23,0	-	0,050
		50	20,0	19,0	21,0	
		25	17,0	16,0	18,0	
24	20,9±0,41	75	-	23,0	-	0,048
		50	21,0	19,0	22,0	
		25	17,0	16,0	18,0	

e.e: Error estándar; TG (Tasa de germinación, 1/T<sub>50</sub>).

En el Cuadro 2, se indican los resultados de las pruebas que comparan las respuestas de las curvas de germinación. Las pruebas de Wilcoxon indicaron que existen diferencias significativas entre

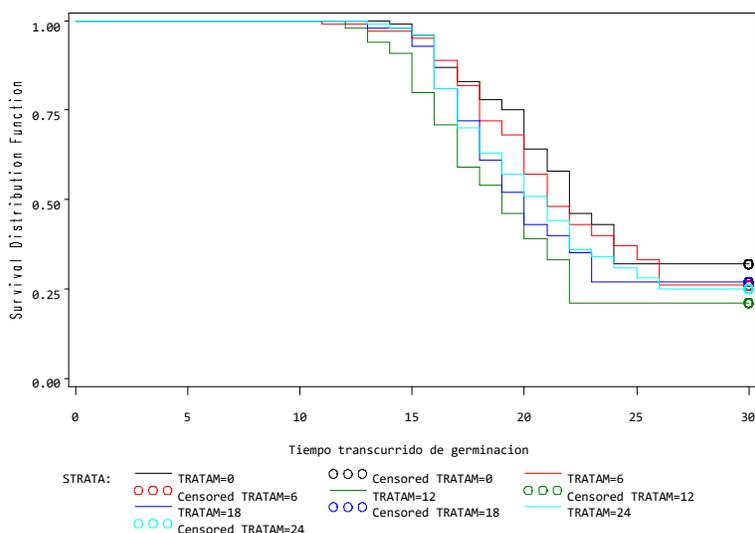
tratamientos ( $p = 0,0003$ ). Las pruebas indican que los cinco tratamientos no son homogéneos, pero no indican cuales difieren entre ellos.

**Cuadro 2.** Resultado de las pruebas de comparación para las funciones de sobrevivencia entre tratamientos de inmersión de semillas de *H. crepitans* L.

Covariable	Prueba	$\chi^2$	GL	Pr > $\chi^2$
Tratamientos de inmersión	Log-Rank	12,3942	4	0,0146
	Wilcoxon	20,8561	4	0,0003**
	-2Log (LR)	3,0095	4	0,5562
X <sup>2</sup> : Chi cuadrado; GL: Grados de libertad; Pr: Probabilidad; ** altamente significativo				

Las curvas escalonadas de Kaplan-Meier (KM) se muestran en la Figura 1, en la cual, la naturaleza no continua de las curvas KM destaca el hecho de que no son funciones uniformes, sino estimaciones escalonadas. El valor de  $S(t)$  no es constante entre

los tiempos de los eventos de germinación, y la probabilidad estimada cambia de valor solo en el momento de cada evento.



**Figura 1.** Estimados de Kaplan – Meier de las funciones de sobrevivencia para los diferentes tratamientos de inmersión en agua.

Mientras que la probabilidad acumulada, vista en el eje Y de la curva, representa la probabilidad al principio y durante todo el intervalo, la tasa de supervivencia del intervalo representa la probabilidad de no germinar después del intervalo y al comienzo del siguiente (Romano y Stevanato, 2020).

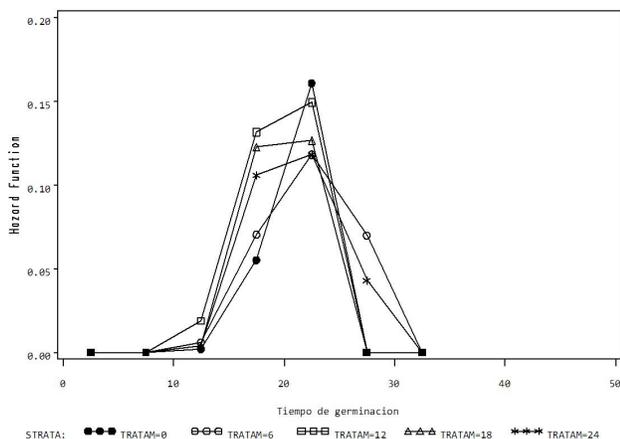
La práctica de imbibición en agua, también ha originado resultados satisfactorios en semillas de otras especies como *Solanum melongena* L. (Barraza, 2013), con tratamientos durante 72 horas para alcanzar 96% de germinación, en comparación con semillas no tratadas (71%). En el caso de *Momordica charantia* L., Barraza (2015) obtuvo 76% de germinación, con la imbibición de las semillas en agua durante 24 horas, en comparación con 62% para el tratamiento sin imbibición, del cual se reporta como promedio el 65% de acuerdo con Thapa (2011). En otro experimento, Barraza, Benavides y Torres (2016), con la misma especie (*M. charantia* L.), que presenta dificultad en la germinación debido a la testa gruesa y dura, utilizando tres tratamientos (control, sin imbibición en agua, semillas embebidas en agua a 22°C durante 24 horas y semillas embebidas en agua a 50°C durante 60 minutos, encuentran que las semillas embebidas en agua a 22°C durante 24 horas mejoraron la energía de germinación (48%), tasa absoluta de germinación (8,6 semillas-día<sup>-1</sup>) e índice de germinación (11,5).

Las funciones de supervivencia estimada en la Figura 1, sugiere que el patrón temporal de germinación es diferente para la totalidad de tratamientos. Presentan variación en los eventos de germinación, con 12 eventos para los tratamientos de 0 y 12 horas, 15 eventos para los tratamientos 6 y 24 horas y 11 eventos para el tratamiento de 18 horas. Los cinco tratamientos no presentaron germinación durante los primeros intervalos (0 – 15 días). La tasa de supervivencia para este intervalo es 1, lo que significa que aún no ha germinado ninguna semilla.

Por ejemplo, para los primeros 14 días del ensayo, ninguna semilla había germinado entre los tratamientos, lo que significa que la tasa de supervivencia de todos los tratamientos durante este intervalo es 1. La primera semilla germinó el día 14 en tratamiento sin inmersión (0 horas) y la proporción de semillas sin germinar después del día 14 cae a 0,99 en el intervalo 15 – 20 días y a 0,75 en el intervalo 20 – 25 días. A partir de estos primeros intervalos, los tratamientos presentaron probabilidades variables. Por ejemplo, para el tratamiento sin inmersión (0 horas), la incidencia de la probabilidad de germinación acumulada, expresada como  $1 - St$ , en el intervalo 15 – 20 días, es  $1 - 0,99$  (1%); por el contrario, para los tratamientos de 6-12-18 y 24 horas, es de  $3 - 9 - 2 - 2$  %, respectivamente. Las probabilidades de germinación en los tratamientos aumentaron en el intervalo final (30 – 35 días), a 0,68 - 0,74 - 0,79 - 0,73 y 0,75, respectivamente, con una razón de riesgo de 0,00 germinaciones/día, en el intervalo final (30 – 35 días).

En términos de tasas de riesgo no paramétricas y riesgo acumulativo (Figura 2), la primera representa la tasa de germinación instantánea en cualquier tiempo, dada por las relaciones entre semillas germinadas y semillas latentes, mientras que la función de riesgo acumulativo es la integral de las tasas de germinación desde el tiempo 0 y los siguientes 30 días de germinación, representa la acumulación del riesgo a lo largo del tiempo. La Figura 2, indica que, para los diferentes tratamientos, la función de riesgo es ascendente, aproximadamente hasta los 22 días de germinación, a partir del cual la razón de riesgo disminuye. Por ejemplo, el tratamiento de semillas sin inmersión tiene la razón de riesgo más alta (0,16074 germinaciones/día) en el intervalo 20 – 25 días, a partir del cual cae abruptamente hasta el final de la germinación. Por el contrario, en el mismo intervalo, los valores pico más bajos de razón de riesgo se

presentan en los tratamientos de 6 y 24 horas de inmersión, con 0,118095 y 0,11818 germinaciones/día, respectivamente.



**Figura 2.** Funciones de riesgo para datos de tratamientos de inmersión de semillas de Jabillo en agua.

## b. Análisis semiparamétrico.

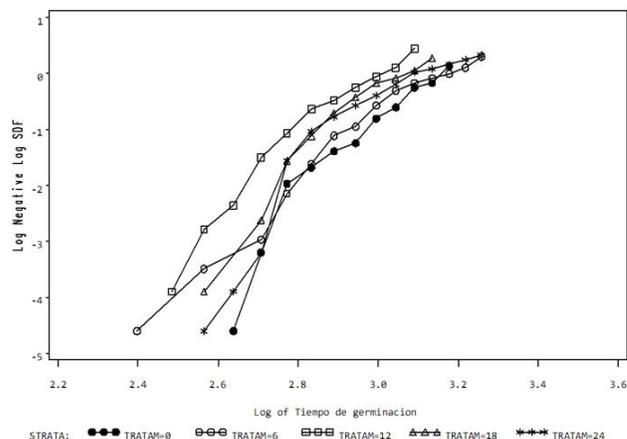
### b.1. Análisis de multicolinealidad.

La prueba de colinealidad diagnosticó que la covariable tratamientos, alcanzó valores menores de 1,00 (VIF<5), lo que indica que no existe evidencia de colinealidad en la variable.

### b.2. Análisis de supuestos del modelo.

La Figura 3 se utiliza para probar los supuestos de riesgo proporcional (PH). En caso de alcanzar o lograr la suposición, las curvas de los tratamientos o grupos serán paralelas entre sí (sin cruzarse). Al comparar las respuestas de las curvas de germinación por efecto de los tratamientos, se observan cruzamientos de las curvas de germinación entre los tratamientos sin inmersión e inmersión durante 6 – 18 y 24 horas. El único tratamiento sin cruces es inmersión durante 12 horas. Por esta razón, se utiliza la prueba de Wilcoxon para la comparación de tratamientos (Bárcenas et al. 2013; SAS 2020; Fox 2001), lo que

indica que existen diferencias entre tratamientos ( $\chi^2 = 20,8561$ ;  $gl=4$ ;  $p=0,0003$ ).



**Figura 3.** Gráficas de diagnóstico para comprobar los supuestos del modelo de riesgo proporcional de Cox mediante la función Log (-Log (S (t))) versus log de tiempo, con suposición PH violada de las funciones de germinación de *H. crepitans* L, en cinco tratamientos de inmersión.

Lo anterior indica que existe evidencia para rechazar la hipótesis nula que los cinco tratamientos tienen igual función de sobrevivencia, es decir, la misma distribución de probabilidad para los eventos de germinación en el tiempo.

Las curvas de  $\log(-\log(S(t)))$  versus  $\log(t)$  para tratamientos, presentaron líneas razonablemente paralelas para algunos de ellos (Figura 3). Además, los resultados de los residuos de Schoenfeld, para satisfacer la suposición, deben ser independientes del tiempo, es decir, no estar correlacionados con el tiempo o con alguna función del tiempo (Allison 2010). Los resultados mostrados en el Cuadro 3, indican que existen problemas de violación de supuestos de riesgo proporcional con la covariable tratamientos para las funciones de tiempo identificadas con Días, y Días2 por presentar valores de  $p < 0,05$ , es otra prueba que el modelo no se ajusta por problemas de violación

de supuestos. El número de observaciones es de 369, ya que los residuales de Schoenfeld no están definidos para casos censurados (131 valores censurados, de un total de 500 valores), es decir, al 26,2 % resultó censurado (semilla sin germinar).

**Cuadro 3.** Prueba de suposiciones de riesgo proporcional con residuales de Schoenfeld para tratamientos de inmersión, indicando coeficientes de correlación de Pearson,  $\text{Prob} > |r|$  y número de observaciones.

Variables de tiempo	Residuales de Schoenfeld
	Tratamientos
Días	- 0,10202 0,05 369
Días1	- 0,09463 0,07 369
Días2	- 0,10699 0,04 369

Días: Días de germinación; Días1:  $\log(\text{Días})$ ; Días2:  $(\text{Días})^2$ .

### b.3. Análisis del modelo con variables tiempo dependientes.

El modelo asume que la tasa de riesgo subyacente, en lugar del tiempo de supervivencia, es una función de las variables independientes o covariables. Significa que un cambio de una unidad en una variable explicativa, causa cambios proporcionales en el riesgo. Para un análisis detallado, la germinación se analizó por etapas. En una primera etapa, se analizaron los primeros 15 días del proceso germinativo (entre 0 y 15 días), luego el período entre 16 y 30 días. Para evaluar los efectos de los tratamientos y sus cambios en el tiempo (interacciones), al definir una variable tiempo dependiente (TRAT\*DIA), para los dos períodos del proceso de germinación, las interacciones produjeron

valores no significativos ( $p = 0,839$  y  $p = 0,718$ ), y sugiere que la suposición de riesgo proporcional no se viola en ambos períodos. Por este motivo se acepta el modelo de Cox. Para cada una de estas evaluaciones, el tratamiento inmersión de semillas en agua durante 24 horas, se consideró de referencia y los coeficientes de otros tratamientos se compararon con él (Romano y Stevanato 2020; McNair et al. 2012)

#### b.3.1. Primera etapa del proceso de germinación (0 – 15 días).

La toma de agua por una semilla madura es trifásica: toma rápida inicial, fase de meseta ( $\psi$  entre 1 a 1,5 MPa) y nuevo incremento en la absorción de agua, que se corresponde con el período de elongación del embrión o de la radícula. La duración de cada fase dependerá de las características de la semilla (tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de  $O_2$ , etc.) y de las condiciones externas en las que se produce la imbibición (temperatura, composición del sustrato del suelo, contenido de humedad). Esto significa que cuatro de los tratamientos de tiempos de imbibición en agua, con excepción del tratamiento sin imbibición (0 horas), cumplen con las condiciones para presentar fases idénticas en la toma de agua por las semillas, imbibirse rápidamente y luego, germinar. Los tiempos de imbibición aportarían las diferencias en los tiempos de germinación (Bewley y Black, 1994; Azcón y Talón 2013).

Según estos autores, una fase rápida de absorción de agua provocaría alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas de la semilla y, por consiguiente, una pérdida al medio circundante de los inhibidores de la germinación, acelerando o retrasando los tiempos de germinación.

Los coeficientes exponenciados,  $\exp(\beta_i)$  representan las razones de riesgo indicando el tamaño del efecto de cada covariable. Consideradas

como el cambio predictivo en el riesgo para un aumento de una unidad en el predictor. Un signo positivo del coeficiente de regresión indica que para una covariable las probabilidades de germinación aumentan durante los primeros 15 días. También significa que la covariable aumenta el riesgo, lo que reduce el tiempo de falla o germinación. El efecto contrario se produce con los coeficientes negativos. En este caso, para los primeros 15 días del proceso germinativo, los tratamientos de 0 y 6 horas en comparación con el tratamiento de referencia (T4=24 horas) disminuyen las probabilidades de germinación y, en consecuencia, aumentan el tiempo de falla o de germinación, aunque el análisis mostró un efecto no significativo en ellos ( $p=0,1114$  y  $p=0,4398$ ), indicando para ambos tratamientos que no existe relación entre ellos y el cambio decreciente de germinación, mientras que para los tratamientos de 12

y 18 horas, por tener valores positivos sus parámetros aumentan las probabilidades de germinación y, en consecuencia, disminuyen el tiempo de germinación, en comparación con el tratamiento de referencia, aunque el análisis también mostró un efecto no significativo en ellos ( $p=0,0878$  y  $p=0,8728$ ), indicando para ambos tratamientos que no existe relación entre ellos y el cambio creciente de germinación (Cuadro 4). En esta primera etapa del proceso de germinación, se observa que la interacción de los tratamientos con el tiempo también tuvo un impacto negativo en la germinación. Es decir, la interacción disminuye las probabilidades de germinación en el tiempo ( $\beta_i = -0,00621$ ), aunque no significativamente ( $p=0,8398$ ), lo cual es un indicio de no violación de supuestos ( $p>0,05$ ).

**Cuadro 4.** Análisis de covariables con interacciones con el tiempo por el método de máxima verosimilitud (ML) para la primera etapa del proceso de germinación (0 – 15 días).

Variable tiempo (horas)	GL	Parámetro estimado $\pm$ e.e	$\chi^2$	P > $\chi^2$	Razón de riesgo (HR)	Intervalo confianza (HR)
0	1	-0,27129 $\pm$ 0,1704	2,534	0,111 <sup>ns</sup>	0,762	0,55 - 1,22
6	1	-0,12791 $\pm$ 0,1656	0,597	0,439 <sup>ns</sup>	0,880	0,64 - 1,22
12	1	0,27675 $\pm$ 0,1621	2,914	0,088 <sup>ns</sup>	1,319	0,96 - 1,81
18	1	0,02636 $\pm$ 0,1646	0,026	0,873 <sup>ns</sup>	1,027	0,74 - 1,42
24		0				
TRAT*DIA	1	-0,00621 $\pm$ 0,0307	0,041	0,839 <sup>ns</sup>	0,994	0,94-1,05

GL: Grados de libertad;  $\chi^2$ : Chi cuadrada; e.e: Error estándar; TRAT: Tratamientos; DIA: Días de germinación; <sup>ns</sup> no significativo.

En el caso de los tratamientos (0 – 6 horas), que presentaron signos negativos en sus coeficientes, significa que, en este período, tienen más baja probabilidad de germinación que el tratamiento de referencia (inmersión de semillas en agua durante 24

horas). Sus valores de la razón de riesgo ( $HR<1$ ), de 0,762 y 0,88, respectivamente, revelan que experimentan menor riesgo de germinación que el tratamiento de referencia, es decir, la probabilidad de experimentar germinación se incrementa por estos

factores con el tratamiento inmersión de semillas en agua durante 24 horas, comparado con ambos tratamientos. Por lo tanto, el riesgo de germinar de las semillas es alrededor de 76 % y 88 % de la razón de riesgo de las semillas del tratamiento de referencia. Este resultado revela que las semillas de estos tratamientos tendrán tendencia a germinar posteriormente que las semillas con inmersión en agua durante 24 horas (Cuadro 4).

En el caso de los tratamientos (12 – 18 horas), que presentaron signos positivos en sus coeficientes, significa que, en este período, tienen más alta probabilidad de germinación que el tratamiento de referencia (inmersión de semillas en agua durante 24 horas). Sus valores de la razón de riesgo ( $HR > 1$ ), de 1,319 y 1,027, respectivamente, revelan que experimentan mayor riesgo de germinación que el tratamiento de referencia, es decir, la probabilidad de experimentar germinación disminuye por estos factores con el tratamiento inmersión de semillas en agua durante 24 horas, comparado con ambos tratamientos. Por lo tanto, aumentaran la función de riesgo a través del periodo de germinación por 32 % y 2,1 %, en comparación con las semillas del tratamiento de referencia. Este resultado revela que las semillas de estos tratamientos tendrán tendencia a germinar primero que las semillas con inmersión en agua durante 24 horas (Cuadro 4).

El intervalo de confianza de la razón de riesgo ( $HR$ ) de cada tratamiento, define si dentro del intervalo se incluye o no el valor nulo (1) que indica la igualdad entre cada tratamiento y el tratamiento de referencia. Al incluir el intervalo de confianza el valor nulo (1), se determina que el riesgo de germinación fue similar en los dos grupos bajo comparación (0 = 24 horas; 6=24 horas; 12 = 24 horas y 18=24 horas). Por lo tanto, no existen diferencias significativas del riesgo temporal de germinación entre las semillas de los tratamientos

bajo comparación. La interpretación correcta sería que las semillas de los tratamientos 0 – 6 - 12 y 18 horas que no hubiesen germinado tenían igual probabilidad de presentarla en el siguiente intervalo de tiempo que las semillas del tratamiento de referencia (24 horas).

Además de la comparación de los tratamientos con el tratamiento de referencia de 24 horas, se realizaron pruebas de hipótesis para comparar entre los demás tratamientos- Para la primera etapa, con un valor de chi cuadrado de 12,09 y 4 grados de libertad, la prueba resultó estadísticamente significativa ( $p=0,0167$ ). Entre los tratamientos comparados no se presentaron diferencias significativas entre 0 y 6 horas ( $p=0,394$ ), entre 6 y 18 horas ( $p=0,352$ ) y entre 12 y 18 horas ( $p=0,124$ ). Para la ocurrencia de diferencias entre tratamientos (posterior a inmersión entre 0 – 6 horas), debe existir una diferencia de tiempo de inmersión entre 12 y más horas (Cuadro 5). La absorción de agua por las semillas es esencial para el comienzo de la germinación y define cada una de las etapas del patrón trifásico de absorción de agua, que caracteriza el proceso germinativo (Bewley, 1997).

### **b.3.2. Segunda etapa del proceso de germinación (16 – 30 días).**

En esta segunda etapa del proceso de germinación, la interacción de los tratamientos con el tiempo tiene un impacto positivo en la germinación. Es decir, la interacción de los tratamientos con el tiempo, aumentaron las probabilidades de germinación ( $\beta_i = 0,00743$ ) en el tiempo. De manera individual, el signo negativo de los coeficientes de regresión para los tratamientos de inmersión de 0 y 6 horas, indica que las probabilidades de germinación también disminuyeron durante este período, con más baja probabilidad de germinación que el tratamiento de referencia (inmersión en agua durante 24 horas), a

diferencia de los tratamientos de 12 y 18 horas de inmersión, donde el signo positivo de los coeficientes indica que las probabilidades de germinación también aumentaron durante este período y, en consecuencia, disminuyen el tiempo de germinación, aunque el análisis también mostró un efecto no significativo en ellos ( $p= 0,189$  y  $p= 0,732$ ), indicando para ambos tratamientos que no existe relación entre ellos y el cambio creciente de germinación (Cuadro 6).

El valor de la razón de riesgo para los tratamientos de 0 y 6 horas, resultó mayor que durante el primer período, con valores de 0,901 y 0,997 ( $HR<1$ ), revelando que la probabilidad de experimentar germinación se incrementa por estos factores con el tratamiento inmersión en agua durante 24 horas. Es decir, el riesgo de germinar de las semillas es alrededor de 90 % y 99 %, de la razón de riesgo de las semillas del tratamiento de referencia.

**Cuadro 5.** Resultados de las pruebas de hipótesis entre tratamientos, para la primera etapa del proceso de germinación (0 – 15 días).

Variable tiempo (horas)	$\chi^2$ Wald	GL	Pr > $\chi^2$
0 vs 6	0,7265	1	0,394
0 vs 12	10,85	1	0,001
0 vs 18	3,051	1	0,081
6 vs 12	6,23	1	0,013
6 vs 18	0,87	1	0,352
12 vs 18	2,37	1	0,124

GL: Grados de libertad;  $\chi^2$ : Chi cuadrada

Al comparar con el primer período, el tratamiento de referencia, comparado con los tratamientos sin inmersión en agua y 6 horas de inmersión, presentó un aumento de las probabilidades de germinación por el orden de 14 % y 11 %. Este resultado también deja ver que las semillas de estos tratamientos tuvieron tendencia a germinar posteriormente que las semillas con inmersión en agua durante 24 horas, durante el segundo período (Cuadro 6).

En el caso de los tratamientos (12 – 18 horas), que presentaron signos positivos en sus coeficientes, significa que, en este período, también presentan más alta probabilidad de germinación que el tratamiento de

referencia (inmersión de semillas en agua durante 24 horas). Sus valores de la razón de riesgo ( $HR>1$ ), de 1,43 y 1,07, respectivamente, revelan que experimentan mayor riesgo de germinación que el tratamiento de referencia, es decir, la probabilidad de experimentar germinación disminuye por estos factores con el tratamiento inmersión de semillas en agua durante 24 horas, comparado con ambos tratamientos. Por lo tanto, aumentaran la función de riesgo a través del periodo de germinación por 43 % y 7 %, en comparación con las semillas del tratamiento de referencia. Este resultado revela que las semillas de estos tratamientos continúan con tendencia a

germinar primero que las semillas con inmersión en agua durante 24 horas (Cuadro 4).

Igual que en el primer periodo, todos los tratamientos incluyen en el intervalo de confianza el valor nulo (1), indicando que el riesgo de germinación fue similar en los dos grupos (0=24; 6=24; 12=24 y 18=24 horas). Por lo tanto, tampoco existen diferencias significativas del riesgo temporal de germinación entre las semillas de los tratamientos bajo comparación. La interpretación correcta sería que las semillas de los tratamientos 0 – 6 – 12 y 18 horas que no hubiesen germinado durante este periodo, tenían igual probabilidad de presentarla en el

siguiente intervalo de tiempo que las semillas del grupo control o tratamiento de referencia (con inmersión en agua durante 24 horas). En esta segunda etapa del proceso de germinación, también se observa que la interacción de los tratamientos con el tiempo tiene un impacto positivo en la germinación. Es decir, la interacción aumenta las probabilidades de germinación en el tiempo ( $\beta_i = 0,00743$ ), aunque no significativamente ( $p=0,7176$ ), lo cual es un indicio de no violación de supuestos ( $p>0,05$ ) durante este segundo periodo de germinación (16 -30 días).

**Cuadro 6.** Análisis de covariables con interacciones con el tiempo por el método de máxima verosimilitud (ML), para la segunda etapa del proceso de germinación (16 – 30 días).

Variable tiempo (horas)	GL	Parámetro estimado $\pm$ e.e	$\chi^2$	P > $\chi^2$	Razón de riesgo (HR)	Intervalo confianza (HR)
0	1	-0,1047 $\pm$ 0,4736	0,049	0,825 <sup>ns</sup>	0,901	0,36 - 2,28
6	1	-0,00314 $\pm$ 0,3705	0,0001	0,993 <sup>ns</sup>	0,997	0,48 - 2,06
12	1	0,3598 $\pm$ 0,2739	1,725	0,189 <sup>ns</sup>	1,43	0,84 - 2,45
18	1	0,06808 $\pm$ 0,1989	0,117	0,732 <sup>ns</sup>	1,07	0,73 - 1,58
24		0				
TRAT*DIA	1	0,00743 $\pm$ 0,0205	0,131	0,718 <sup>ns</sup>	1,01	0,97-1,05

GL: Grados de libertad; e.e: Error estándar;  $\chi^2$ : Chi cuadrada; TRAT: Tratamientos; DIA: Días de germinación; <sup>ns</sup> no significativo.

Para la segunda etapa, la comparación entre tratamientos, sin incluir sus comparaciones con el tratamiento de referencia (con inmersión en agua durante 24 horas), con un valor de chi cuadrado de 9,0145 y 4 grados de libertad, la prueba no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,061$ ). Entre los tratamientos comparados no se presentaron diferencias significativas, a diferencia de la primera

etapa del proceso de germinación (0 – 15 días) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Resultados de las pruebas de hipótesis entre tratamientos, para la segunda etapa del proceso de germinación (16 – 30 días).

Variable tiempo (horas)	$\chi^2$ Wald	GL	Pr > $\chi^2$
0 vs 6	0,2547	1	0,614
0 vs 12	2,8181	1	0,093
0 vs 18	0,2161	1	0,642
6 vs 12	3,4189	1	0,065
6 vs 18	0,0669	1	0,796
12 vs 18	2,217	1	0,1365

GL: Grados de libertad;  $\chi^2$ : Chi cuadrada

A pesar de no existir diferencias significativas entre los tratamientos, la tendencia general es que el tratamiento de 12 horas de inmersión, es el que presentó tendencia a germinar en primer lugar en ambos periodos del proceso de germinación.

A pesar de que el análisis de residuos de Schoenfeld del modelo para verificar los supuestos de proporcionalidad y el método grafico determinaron problemas de violación de supuestos, las covariables tratamientos y sus interacciones, satisfacen los supuestos de riesgo proporcional ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, el siguiente análisis paramétrico se realiza para complementar la información de la germinación y para mejorar la interpretación de los resultados generales.

### c. Análisis paramétrico.

La aplicación del Criterio de Información Akaike (Akaike 1974), permitió seleccionar la distribución Lognormal por mejor ajuste. La distribución log-normal para la función de riesgo no siempre se considera apropiada en otros campos, ya que su patrón considera un valor inicial igual a 0, aumenta hasta un máximo con el aumento del tiempo y eventualmente disminuye a cero a medida que  $t$  aumenta, y en muchos análisis la función de riesgo generalmente no

se acercará a cero en un tiempo prolongado, ya que todos los objetos eventualmente fallarán. Sin embargo, este patrón parece ajustarse a la tendencia ordinaria del proceso de germinación, lo que hace que este modelo sea adecuado para ensayos de germinación, particularmente para la presente investigación (Romano y Stevanato, 2020; Lee y Wang, 2003; Lawless 2003)

La salida de resultados del Cuadro 8, muestra las estimaciones de máxima verosimilitud (MLE) de los parámetros calculados mediante la aplicación del modelo Lognormal, expresado como regresión de tiempo de falla acelerada (AFT). La primera observación, es que el valor estimado de  $\sigma$  (Escala) es  $< 1$ , lo que implica que la función de riesgo estimada sigue la forma de una "U" invertida. Para el modelo Lognormal, cuando el parámetro de escala,  $\sigma < 1$ , el riesgo comienza en 0, asciende a un pico y luego decrece a 0. El parámetro de escala para la distribución Lognormal resulto  $0,1566 < 1$  (Allison 2010).

El coeficiente de regresión para el tratamiento inmersión en agua durante 24 horas, es 0. Su razón es que se designó como nivel de referencia para

comparar con los demás tratamientos. El análisis del Cuadro 8, indica que cada coeficiente, de manera independiente, difiere significativamente del

tratamiento inmersión en agua durante 24 horas ( $p < 0,05$ ).

**Cuadro 8.** Parámetros estimados de las distribuciones por el método de máxima verosimilitud (ML) para la distribución Log normal.

Variable tiempo (horas)	GL	Parámetro estimado ± e.e	Limites confianza		$\chi^2$	T <sub>50</sub> (días)	Razón de tiempo (γ)
Intercepto ( $\beta_0$ )	1	1,1548±0,0715	1,0146	1,295	260,8 **	3,2	1,00
0	1	1,9844±0,0735	1,8404	2,1285	729,1 **	23,1	7,2
6	1	1,4323±0,0551	1,3243	1,5402	676,1 **	13,3	4,2
12	1	0,9061±0,0423	0,8232	0,989	458,6 **	7,9	2,5
18	1	0,464±0,0312	0,4029	0,525	221,8 **	5,0	1,6
24	0	0,0000	-	-	-	3,2	1,0
TRAT*DIA	1	0,0039±0,0002	0,0036	0,0042	666,7 **		
Escala	1	0,1566±0,006	0,1452	0,1688			

TRAT: tratamientos; GL: grados de libertad; e.e: Error estándar;  $\chi^2$ : Chi cuadrada; T<sub>50</sub>: tiempo medio de germinación.

En la estimación de los parámetros para el modelo Lognormal, la intersección está representado por  $\beta_0 = 1,1548$ , tratamiento 0 horas ( $\beta_2 = 1,9844$ ), tratamiento 6 horas ( $\beta_3 = 1,4323$ ), tratamiento 12 horas ( $\beta_4 = 0,9061$ ) y tratamiento 18 horas ( $\beta_5 = 0,4640$ ). Según Romano & Stevanato (2020), estos valores se utilizan para calcular el tiempo medio de germinación (T<sub>50</sub>). El T<sub>50</sub> (mediana o tiempo medio de germinación) para referencia de cada parámetro, se calcula como  $\exp(\beta)$ . Para todo el lote (intercepto =  $\beta_0 = 1,1548$ ), fue de  $\exp(1,1548) = 3,2$  días, mientras que para el efecto de tratamiento 0 horas es,  $\exp(\beta_0 + \beta_1) = \exp(1,1548 + 1,9844) = 23,1$  días; para tratamiento 6 horas,  $\exp(\beta_0 + \beta_2) = 13,3$  días; para tratamiento 12 horas,  $\exp(\beta_0 + \beta_3) = 7,9$  días; para tratamiento 18 horas,  $\exp(\beta_0 + \beta_4) = 5,0$  días. De esta manera, se calcula el tiempo medio de germinación para cada

tratamiento, según su parámetro. Cuanto más negativo sea el coeficiente, más temprano será el tiempo medio de germinación (Romano & Stevanato 2020). Los resultados de la prueba chi cuadrada indican diferencias altamente significativas entre estas comparaciones, con el tratamiento de referencia (Cuadro 10). De manera similar, las comparaciones del análisis de las tablas de vida (LIFETES) también sugieren que existen diferencias entre los tratamientos ( $p=0,0003$ ). Sin embargo, para Fox (2001), el modelo de tiempo de falla acelerada (LIFEREG) tiene mayor poder estadístico y resulta razonable tener mayor confianza en sus resultados.

En términos de la razón de tiempo (γ), para tratamiento 0 horas  $\gamma = 23,1/3,2 = 7,2$ ; de manera similar, los demás tratamientos tienen razones de

tiempo de 4,2; 2,5; 1,6 y un valor de 1 para el tratamiento inmersión en agua durante 24 horas. Estos valores, interpretados como razones estimadas de los tiempos de supervivencia esperados para dos grupos, según la fórmula  $(100 \% (1 - \gamma))$ , se puede observar que los tratamientos 0 – 6 – 12 y 18 horas, retardan o prolongan la germinación en 620,0 %, 320,0 %, 150,0 % y en 60,0 %, en comparación con el tratamiento inmersión en agua durante 24 horas, considerado el tratamiento de referencia, respectivamente. Esto significa que el tratamiento que prolonga u origina una germinación más lenta, es el tratamiento 0 horas (sin inmersión en agua). El tratamiento 24 horas (inmersión en agua durante 24 horas) se considera de referencia, por lo que aparece con un valor neutro (0,00). En general, en los modelos AFT, una razón de tiempo  $> 1$  para una covariable, implica que prolonga el tiempo de germinación, mientras que una razón de tiempo  $< 1$  implica que es más probable un evento de germinación más temprano (Romano & Stevanato 2020). Según esta referencia, el tratamiento 0 horas (sin inmersión en agua) es el que más prolonga el tiempo de germinación. En los tratamientos de inmersión en agua (6 – 12 – 18 y 24 horas) es notable que, a mayor tiempo de inmersión, la germinación tiene menor prolongación de la germinación.

El hecho que cada coeficiente de regresión de manera independiente es significativo, indica que cada uno difiere del tratamiento de referencia. Estas comparaciones múltiples, son análogas a las del análisis LIFETEST, excepto que en este caso se utilizaron las pruebas de Wilcoxon y en el ATF, los coeficientes de regresión. El análisis LIFETEST también mostró heterogeneidad entre tratamientos, con diferencias altamente significativas entre ellos. Los coeficientes de regresión llegan a una conclusión semejante: la comparación de los demás tratamientos

con el tratamiento de referencia, es significativamente diferente del tratamiento de inmersión en agua durante 24 horas, y las comparaciones entre los tratamientos restantes permanecen variables, es decir, dependiendo del periodo o etapa de germinación, resultan significativamente diferentes o no.

Según Romano & Stevanato (2020), mientras que el modelo de Cox expresa el efecto multiplicativo de las variables explicativas sobre el riesgo (escala de riesgo), el modelo AFT expresa el mismo efecto sobre el tiempo de supervivencia (escala de tiempo). Esta característica permite una interpretación más fácil de los resultados porque los parámetros miden la fuerza y el efecto de la covariable correspondiente en la mediana del tiempo de supervivencia. Además, por la aplicación de tiempo de falla acelerado, el efecto de las covariables sobre la supervivencia se describe en términos absolutos (por. ejemplo, número de días) en lugar de términos relativos como el índice de riesgo. Además, las razones de tiempo representan índices útiles que describen los efectos de las variables explicativas sobre la germinación y más interpretable que una relación de dos riesgos.

### Conclusiones.

El análisis de supervivencia para la germinación de semilla de *H. crepitans* L, utilizando los métodos no paramétricos, semiparamétricos y paramétricos, es una técnica adecuada para datos en los que el tiempo hasta la ocurrencia de un evento se considera la variable dependiente, conteniendo datos censurados. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (KM) proporcionaron hipótesis exploratorias de la forma de la función de supervivencia para cada tratamiento de inmersión. Una vez que la forma de la línea base del riesgo de germinación se conoce, existe una buena posibilidad de utilizar la forma de distribución

adecuada. El análisis de supervivencia reveló un incremento significativo en el riesgo de la germinación, por efecto de los tratamientos con tiempos de inmersión en agua, específicamente con el tratamiento sin inmersión en agua, el cual retardó el proceso de germinación, con una germinación prolongada en el tiempo. Por el contrario, el tratamiento con inmersión en agua durante 24 horas, aceleró el proceso. El análisis de la germinación realizado por etapas, permitió evidenciar la importancia de la primera etapa del proceso (0 – 15 días) en la cual se desarrolla la primera fase del proceso, una vez que la semilla se imbebe para el inicio de la germinación. El modelo ATF se considera una herramienta útil para el potencial de germinación en semillas de *H. crepitans*, con los diferentes tratamientos de tiempos de inmersión en agua, permitiendo estimar los tratamientos más importantes y determinar la distribución de la germinación con el tiempo. De igual manera, el modelo ATF permitió interpretar la velocidad de germinación en respuesta a la covariable tratamientos, además de revelar diferencias entre tratamientos y proporcionar mayor claridad en estudios sobre tiempos de falla, no identificadas en el análisis LIFETEST.

### Agradecimientos.

El autor agradece al Departamento de Biología y Química y al Centro de Investigaciones Agrícolas, Biológicas, Educativas y Sociales (CIABES) del NURR – ULA, por el uso de sus equipos de laboratorio. Especial agradecimiento a los revisores anónimos, por su interés en mejorar la calidad del manuscrito.

### Referencias

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*, 19: 716 – 723.
- Allison P. 2010. *Survival Analysis using SAS®: A practical Guide, Second Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc. 324 p.
- Aristeguieta L. 2003. Estudio dendrológico de la flora de Venezuela. Volumen XXXVIII. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Caracas, Venezuela. 572 p.
- Azcón J y Talón M. 2013. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2.<sup>a</sup> Edición. McGraw-Hill - Interamericana de España, S. L. Madrid, España. 651 p.
- Bárceñas M, López L, Terrazas T y García E. 2013. Germinación de tres especies de *Cephalocereus* (Cactaceae) endémicas del istmo de Tehuantepec, México. *Polibotánica*, 36:105 – 116.
- Barraza F, Benavides O y Torres F. 2016. Calidad fisiológica y energía de germinación de semillas de balsamina (*Momordica charantia* L.). *Rev. Cienc. Agri.* 33(1):43 - 52.
- Barraza F. 2013. Crecimiento y calidad morfológica de berenjena (*Solanum melongena* L.) en fase de semillero. *Tem Agr.* 8:7 - 20.
- Barraza F. 2015. Physical characteristics and germination of bitter gourd (*Momordica charantia* Linn.) seeds. *Indian J Res.* 4:3 - 5.
- Bewley J. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055.
- Bewley J y Black M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Second Edition. Plenum Press, New York – London. 445 p.

- Brown R y Mayer D. 1988. Representing cumulative germination. 1. A critical analysis of single-value germination indices. *Annals of Botany* 61, 117–125
- Buyske S, Fagerstrom R y Ying Z. 2000. A class of weighted log-rank tests for survival data when the event is rare. *Journal of the American Statistical Association*, 95 (449): 249 – 258.
- CATIE. 2000. Técnicas para la germinación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico No. 39. CATIE-PROSEFOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica. 54 p.
- Collett D. 2003. *Modelling Survival Data in Medical Research*, 2nd ed. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL.
- Cox D. 1972. Regression models and life tables (with discussion). *J.R. Statist. Soc. B.*, 34, 187 – 220.
- Dixon P y Newman M. 1991. Analyzing toxicity data using statistical models for time-to-death: An introduction. In: *Metal Ecotoxicology: Concepts and Application*. (M. C. Newman and A. W. McIntosh, eds.), pp. 207-242. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Fleming T, Harrington D y O'sullivan M. 1987. Superior versions of the log-rank and generalized Wilcoxon statistics. *Journal of the American Statistical Association*, 82 (397): 312 – 320.
- Fox G. 2001. Failure-time Analysis: Studying Times to Events and Rates at Which Events Occur. In: *Design and analysis of ecological experiments*. (Scheiner S.M., Gurevitch J., eds.). pp. 235 – 266. Chapman and Hall. New York, NY, EEUU.
- George B, Seals S y Aban I. 2014. Survival analysis and regression models. *J. Nucl. Cardiol.*, 21: 686 – 694.
- Gómez G, Calle M, Oller R y Langohr K. 2009. Tutorial on methods for interval-censored data and their implementation in R. *Stat. Model.*, 9: 259 – 297.
- Gómez R y Toro J. 2008. Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque seco. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia – CORANTIOQUIA. Boletín Técnico Biodiversidad, No. 3. 73 p.
- Goodchild N y Walker M. 1971. A method of measuring seed germination in physiological studies. *Annals of Botany* 35, 615–621.
- Gunjaca J y Sarcevic H. 2000. Survival analysis of the wheat germination data. In *Proceedings of the 22nd International Conference on Information Technology Interfaces (ITI 2000)*, Pula, Croatia, 13–16 June 2000; pp. 307–310.
- Hoyos J. 1994. Guía de los árboles de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 32. Caracas, Venezuela. 384 p.
- Kaplan E y Meier P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53 (282): 457 – 481.
- Kleinbaum D y Klein M. 2005. *Survival Analysis a Self-Learning Text*. New York: Springer.
- Klein J, Rizzo J, Zhang M y Keiding N. 2001. Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants. Part I: Unadjusted analysis. *Bone Marrow Transpl.*, 28: 909 – 915.
- Lawless J. 2003. *Statistical models and methods for lifetime data*. Second edition. John Wiley and Sons: New York, NY, USA. 630 p.

- Lee E y Wang J. 2003. *Statistical Methods for Survival Data Analysis*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 513 p.
- Lee J. 1996. Some versatile tests based on the simultaneous use of weighted log-rank statistics. *Biometrics*, 52 (2): 721 – 725.
- Mcnaire J, Sunkara A y Frobish D. 2012. How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: nonparametric and semiparametric methods. *Seed Science Research*, 22: 77 – 95.
- Molina M. 2015. Hazard ratio: cuando el riesgo varía a lo largo del tiempo. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 17: 185-188.
- Oliva F. 1969. *Arboles ornamentales y otras plantas del trópico (Venezuela)*. Ediciones Armitano. Caracas, Venezuela. 368 p
- Onofri A, Gresta F y Tei F. 2010. A new method for the analysis of germination and emergence data of weed species. *Weed Res.*, 50: 187 – 198.
- Pepe M y Fleming T. 1989. Weighted Kaplan-Meier statistics: a class of distance tests for censored survival data. *Biometrics*, 45: 497 – 507.
- Romano A y Stevanato, P. 2020. Germination Data Analysis by Time-to-Event Approaches. *Plants*. 9: 617: 1 – 15.
- SAS INSTITUTE INC. 2020. *SAS/STAT Guide for personal computers, version 9.1 edition*. Ed. SAS Institute, Cary, NC. U S A.
- Scherm H y Ojiambo P. 2004. Applications of survival analysis in botanical epidemiology. *Phytopathology*, 94:1022 – 1026.
- Scott S, Jones R y Williams W. 1984. Review of data analysis for seed germination. *Crop Science* 4,1192–1199.
- Scott S y Jones R. 1982. Low temperature seed germination of *Lycopersicon* species evaluated by survival analysis. *Euphytica*, 31, 869 – 883.
- Schmidt L. 2000. *Handling of tropical and subtropical forest tree seed*. DFSC. Humbleback, Denmark. 511 p.
- Tarone R y Ware J. 1977. On distribution-free tests for equality of survival distributions. *Biometrika*, 64: 156 – 160.
- Thapa M. 2011. Quality analysis of marketed seeds of some crops in Nepal. *Agr J Nepal*. 2:149 - 156.
- Vale C. 2022. Efecto del tiempo de imbibición en agua en la germinación de semillas de jabillo (*Hura crepitans* L.). *Revista: Academia*, 17 (45): 71 – 83.
-