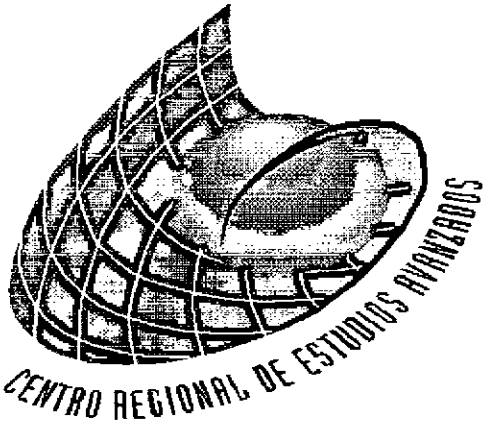
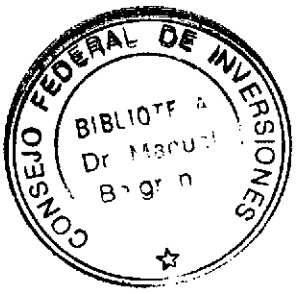
01 H. 12241
F29
V

42509





MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE SEMILLAS

Indice

	Páginas
INTRODUCCIÓN.	**1-6**
CAPITULO N°1.	**1-9**
Calidad de las semillas	**7**
CAPITULO N° 2.	**10-22**
Equipamiento y metodología del laboratorio.	**10**
Metodología de trabajo.	**19**
CAPITULO N° 3.	**23-27**
Análisis físico - botánicos.	**23**
CAPITULO N° 4.	**28-53**
Poder germinativo de las semillas.	**28**
Introducción	**28**
Sustrato.	**29**
Tratamientos especiales para romper la dormición.	**33**
Técnica operativa de la germinación.	**35**
Condiciones requeridas para la determinación del *poder germinativo* de las especies mas importantes.	**41**
Lectura del ensayo de germinación.	**43**
Expresión del ensayo de germinación.	**49**
Determinación del valor cultural o valor real.	**50**
Determinación del peso absoluto.	**51**
CAPITULO N° 5.	**54-70**
Determinación de la viabilidad por ensayo topográfico al tetrazolio (tz)	**54**
CAPITULO N° 6.	**71-77**
Ensayos rápidos de viabilidad.	**71**
CAPITULO N° 7.	**78-95**
Ensayos de vigor.	**78**
Ensayos de vigor directos.	**80**
Ensayos de vigor indirectos	**87**

INFORME FINAL

SEMILLAS.

INTRODUCCIÓN.

Trataremos en lo posible de tomar conciencia del valor estratégico del patrimonio vegetal, como potencial genético que hay que custodiar para las generaciones futuras.

La importancia de las semillas en el complejo proceso productivo de la agricultura es indiscutida, reconociéndose su rol fundamental como elemento básico de la cadena del progreso agrícolo-ganadero en el mundo.

La calidad de las simientes debe ser resguardada constantemente, en todas las tareas propias de su producción.

El control de la calidad comienza en el campo con la siembra adecuada; prosigue luego con el control óptimo de las malezas en el cultivo; elección del momento correcto de cosecha; etc. Después de la cosecha tendremos en cuenta los daños mecánicos durante el procesamiento (secado, limpieza, transporte, envasado) y asegurando las condiciones óptimas para mantener la viabilidad durante el curado y el almacenamiento.

Debemos recordar que las semillas son estructuras vivas, las cuales se hallan expuestas a las transformaciones fisiológicas propias de su naturaleza biológica, como el envejecimiento y la muerte. Es por eso que se debe conocer la calidad post-

cosecha de las simientes, mediante ensayos de laboratorio, que otorgan datos exhaustivos sobre las características que determinan su valor cultural.

Dicho lo antes mencionado, es que se tomó conciencia de crear un proyecto para la instalación y puesta en funcionamiento de un Laboratorio de Análisis de Semillas. Los servicios que el Laboratorio presta informan sobre el valor de las simientes para la siembra, estableciendo: pureza, contaminación con malezas comunes, invasoras y plagas, energía y poder germinativo, viabilidad, sanidad. Además se orienta sobre el contenido de humedad y densidad de siembra adecuada.

CALIDAD DE SEMILLAS:

Entendemos por semilla de calidad, aquella que es susceptible de desarrollar una plántula normal aun bajo condiciones ambientales no ideales, como pudiera ocurrir en el campo.

Los principales parámetros que determinan la calidad de las semillas son:

- **Pureza fisico-botánica**, indica el grado en que la muestra esta constituida por semillas intactas y sanas de la especie declarada, y por otros eventuales componentes (impurezas) como tierra, fragmentos seminales, restos vegetales y muy especialmente semillas extrañas de especies que contaminan el lote.
- **Pureza genética**: certifica la presencia de un determinado cultivar, y no de otros, o de mezclas de diferentes cultivares.
- **Poder germinativo**: expresado por el porcentaje de semillas puras que pueden producir plántulas normales. Este parámetro indica el potencial máximo del lote

para la implantación del cultivo en condiciones optimas de siembra, y es el dato generalmente mas aceptado del que se dispone para conocer la capacidad germinativa de las semillas.

- **Vigor:** de alcance mayor que el anterior en el diagnostico de viabilidad de las simientes, pues informa sobre la respuesta germinativa y la homogeneidad de implantación del cultivo en situaciones no favorables de siembra.
- **Dormición:** se refiere a los mecanismos de inhibición activa del crecimiento del embrión propios de la semilla.
- **Homogeneidad del lote**, uniformidad de los componentes y del tamaño de la semilla, de importancia en operaciones de limpieza, siembra y en cuanto al vigor de las simientes.
- **Estado fitosanitario**, importante para asegurar un lote uniforme del cultivo, evitar la dispersión de inóculos en el suelo e impedir el desarrollo de ciertas enfermedades de las plantas.
- **Humedad,** el conocimiento del contenido de agua de las semillas es el elemento clave para determinar si las semillas retendrán su potencialidad germinativa durante el almacenamiento, en el periodo que va desde su cosecha hasta la siembra.

Los criterios de calidad expuestos son de naturaleza diversa y en general no puede establecerse un orden de prioridad entre ellos.

Para la determinación de los parámetros antes mencionados, se utilizarán las siguientes técnicas:

Para determinar poder germinativo se pueden utilizar distintos tipos de sustratos que es el lecho germinativo sobre el cuál se acomodan las semillas, cuyo objetivo es proporcionar la humedad adecuada para el proceso de germinación. Generalmente los más utilizados son: papel de filtro, papel secante (mas económico), toallas de papel, algodón, arena y suelo. Todos los sustratos empleados deben estar libres de esporas, hongos, bacterias, nematodes, semillas extrañas o sustancias químicas.

El sustrato debe mantenerse constantemente húmedo para satisfacer los requerimientos de las semillas pero la humedad no debe ser excesiva pues ello perjudica las simientes con largos periodos de germinación. Así mismo, como la semilla es un órgano vivo que respira, se le debe proporcionar aire.

La temperatura es también importante para cada especie en particular, la misma deberá ser mantenida en forma constante a nivel de las semillas. Deberemos tener en cuenta la alternancia de temperaturas y cuando se usen cámaras de germinación la temperatura inferior se mantendrá durante 16 horas y la superior durante las 8 horas que restan.

Deberá usarse una fuente de luz natural o artificial la que deberá incidir con la misma intensidad sobre todos los lechos germinativos.

Las semillas a germinar van colocadas sobre el fondo de recipientes tales como:

- bandejas de plástico, de las que se usan para poner alimentos en la heladera.
- cajas germinadoras o de Koenig, son de cinc, forradas con fibra de vidrio o plástico para evitar reacciones del agua con el metal.

- Cajas de Petri, figuran en ultimo termino pues su uso en la germinación de las semillas ya no es recomendado, debido a que el vidrio Pirex filtra determinada longitud de onda de los rayos luminosos, interfiriendo en la calidad de la luz incidente sobre las semillas

Para los ensayos de las semillas mas tradicionales la experiencia indica que:

- en poroto, el ensayo en arena a 20° C, temperatura constante, o a 20-30° C no ofrece problemas.
- en trigo la germinación sobre papel es muy eficiente y tan buena como "entre papel"
- en girasol se recomienda el procedimiento de las semillas en arena .
- en maíz el ensayo en arena es el que mejor respuesta ha dado tradicionalmente en la germinación.
- en soja es conveniente sembrar las semillas en arena.
- en sorgos de pericarpio oscuro (sorgos antipájaros) la dormición se revierte con preenfriamiento. El lavado en agua elimina sustancias fenólicas del pericarpio inhibitorias de la germinación.
- en semillas de acelga el lavado con agua corriente elimina fenoles inhibidores de la germinación.

El instrumental con el cual contamos en el laboratorio del CREACYT es el siguiente:

- balanzas adecuadas para el peso de las muestras.
- lupas para el análisis detallado de simientes vegetales.
- maquina trituradora de semillas para algunas especies en particular.
- contador de semillas .
- cámara de germinación con la cual se pueden manejar parámetros como la humedad relativa, dióxido de carbono, temperatura y luz artificial.
- medidor del conteniendo de humedad de las semillas.
- estufa de germinación.
- lampara de luz ultravioleta.
- zarandas, lupas manuales, pinzas, cajas de petri, bandejas plásticas, etc.

CAPITULO N°1.

Calidad de las semillas

Definición.

Se entiende por semilla de calidad una simiente altamente viable, es decir es una semilla susceptible de desarrollar una plántula normal aún bajo condiciones ambientales no ideales, tal como puede ocurrir en el campo. Para ello, debe contar con propiedades que le aseguren germinar bajo un amplio rango de condiciones agro-climáticas. Por lo expuesto definir la calidad de las semillas significa referirse a un concepto amplio, multidimencional, puesto que ella está determinada por múltiples factores, no todos del mismo valor, ni cada uno con la misma significación en diferentes circunstancias.

Los principales parámetros que determinan la calidad de las semillas son:

- **Pureza físico-botánica:** indica en que grado la muestra está constituida por semillas intactas y sanas de la especie declarada, y por otros eventuales componentes (impurezas) como tierra, fragmentos seminales, restos vegetales y, muy especialmente, por semillas extrañas de especies que contaminan el lote.
- **Pureza genética:** certifica la presencia de un determinado cultivar, y no de otros, o de mezclas de diferentes cultivares.
- **Poder germinativo:** expresado por el porcentaje de semillas puras que pueden producir plántulas normales.
- **Vigor de las semillas:** parámetro de alcance mayor que el anterior en el diagnóstico de la viabilidad de las simientes, pues informa sobre la repuesta

germinativa y la homogeneidad de implantación del cultivo en situaciones no favorables de siembra.

- **Dormición**: son mecanismos de inhibición activa del crecimiento del embrión propios de la semilla.
- **Homogeneidad del lote:** es la uniformidad de los componentes y del tamaño de las semillas, es importante en operaciones de limpieza, siembra y en cuanto al vigor de las simientes.
- **Estado fitosanitario**: como las semillas son vehículos de transporte de agentes patógenos, el control de su sanidad es importante para asegurar un stand uniforme del cultivo, evitar la dispersión de inóculos en el suelo e impedir el desarrollo de ciertas enfermedades de las plantas.
- **Contenido de humedad:** El conocimiento del contenido en agua de las semillas es el elemento clave para determinar si las semillas retendrán su potencialidad germinativa durante el almacenamiento, en el período que va desde su cosecha hasta la siembra.

Resumiendo, una semilla de calidad debe:

◊ pertenecer a la especie y cultivar deseados;

◊ estar pura, o sea libre casi en su totalidad de elementos extraños (otras semillas o materia inerte);

◊ no presentar dormición o presentar un estado de dormición naturalmente revertible;

◊ demostrar un elevado nivel de germinación;

◊ poseer un excelente estado sanitario;

◊ ser de fácil conservación, lo cual implica un bajo contenido en agua;

◊ presentar una buena adaptación a las condiciones edáficas y climáticas de la zona a la que se destina.

Los criterios de calidad expuestos son de naturaleza diversa y en general no puede establecerse un orden de prioridad entre ellos.

CAPITULO N° 2.

EQUIPAMIENTO Y METODOLOGÍA DEL LABORATORIO.

Equipamiento para la toma de muestras.

La primera etapa en la evaluación de las semillas es la obtención de una muestra correcta y representativa. El muestreo se realiza manualmente o por caladores.

Calador de Nobbe: es un tubo hueco de 43, 60 o 65 cm. de longitud, muy puntiagudo, con un largo orificio ovalado cerca de su punta. El diámetro externo varía de 12, 15 a 19 mm. respectivamente.

Es adecuado para semillas embolsadas.

No lo es para semillas a granel.

Deberá introducirse en las bolsas, formando un ángulo de 30° con la horizontal y con el orificio hacia abajo, hasta que se llegue al centro de la bolsa. Se retirará manteniendo la misma posición, pero con el orificio hacia arriba (rotación del eje de 180°).

Calador de Neate: es un tubo largo de 1 metro aproximadamente, con una abertura cerca de su extremo y un anillo deslizable que la cierra.

Calador sonda o de caña: es un tubo de metal inserto alrededor de otro tubo que termina en punta. Ambos cilindros presentan varias aberturas que pueden hacerce coincidir girando uno de ellos.

Para el muestreo de semillas embolsadas, tréboles y otras semillas que se deslizan fácilmente se considera adecuada la sonda de 76 cm. de longitud, 12 mm. de diámetro externo y 9 aberturas.

Para semillas de cebada y semillas vestidas, es conveniente la sonda de 76 cm., pero con el diámetro mayor, de 25 mm., y 6 aberturas.

Para semillas a granel es mas práctico operar en forma vertical, pero en ese caso el calador debe poseer tabiques que dividan el instrumentos en tantos compartimentos cuantas son las aberturas, a efectos de asegurar la representatividad de los diferentes niveles.

Para semillas que fluyen en caída libre se usan los muestreadores en pico de pelícano: el tubo se ensancha en su base a modo de bolsa que recoge las simientes al caer.

Equipamiento para el fraccionamiento de muestras.

Una vez llegada la muestra al laboratorio, se la debe fraccionar en porciones a fin de obtener la " muestra de trabajo".

Esta reducción se realiza a mano o con la ayuda de divisores mecánicos, también llamados cuarteadores u homogeneizadores.

Divisores cónicos o de Boerner: se fabrican en dos tamaños, utilizándose el más grande (88 cm. de alto x 40 cm. de diámetro), para semillas del tamaño del trigo o mayores, y el más pequeño para semillas de forrajeras.

Divisor Gamet: utiliza la fuerza centrífuga para mezclar y repartir las semillas en dos submuestras. Para conseguir buenos resultados se debe nivelar bien el aparato, verter las semillas en el centro de la tolva y recién entonces poner en marcha el motor.

Separador de suelo: consta de una tolva rectangular que se abre sobre una serie de canales, los cuales a su vez desembocan en dos recipientes recolectores.

Es adecuado para separar semillas grandes (tipo maíz) y antecios vestidos de gramíneas.

Equipamiento para análisis de pureza.

Ellos son: pinzas; "pinzas bayonetas"; cajitas analíticas con tapa, de metal o de plástico; espátulas; bandejas; lupa de mano; lupa binocular. Además de estos implementos simples se pueden utilizar aventadores, diafanoscopio, zarandas, balanzas, etc.

Bandejas: son rectangulares o cuadradas, de metal ó de plástico, sin ángulos agudos ni asperezas a fin de no retener las semillas.

Cajitas analíticas: de metal (acero inoxidable) o de plástico pueden ser rectangulares (5 x 7 cm.) o redondas de 7 cm. de diámetro.

Lupas: de 2 a 10 aumentos.

Para el pesado de las muestras de trabajo y de sus fracciones se utiliza una **balanza.** Deberá ser una balanza analítica con capacidad aproximada de 150 g. y precisión hasta 0,0001 g.

Aventadores o sopladores de semillas: son aparatos que permiten separar los componentes de una muestra según su distinto peso.

Zarandas: son tamices de acero inoxidable de distinto diámetro de luz de malla, que permiten la separación diferencial de los componentes de una muestra en base a su tamaño.

Cuando son numerosas las muestras de semillas tratadas con plaguicidas o fungicidas es conveniente contar con una superficie de trabajo adosada a una **caja aspiradora,** que asegura condiciones de trabajo salubres para el analista.

Diafanoscopio: es una pequeña caja de madera (14 x 22 x 25 cm.) cuya superficie superior es de vidrio traslúcido. En el interior está instalada una lámpara conectada a un interruptor. Al encenderla, su luz permite la observación por transparencia de las semillas apoyadas sobre el vidrio, poniendo así de manifiesto las semillas vanas.

Mesas de análisis: pueden ser mesas comunes, siempre que se asegure una pequeña superficie de trabajo lisa (con vidrio o fórmica).

La orientación de los ventanales al norte es preferible para tener suficiente luz durante todo el día y a lo largo de todo el año.

Será necesario contar con luz artificial individual para cada analista. Se recomienda la iluminación con tubos fluorescentes de luz blanca.

Colección de semillas: es de gran importancia en la identificación botánica de las muestras, parte fundamental del análisis de pureza.

Equipamiento para análisis de germinación.

- Mesa o mesada para realizar las tareas.
- Heladera.
- Papel de filtro, papel secante o toallas de papel.
- Algodón.
- Diferentes tipos de contenedores de semillas.
- Aparatos para asegurar condiciones adecuadas de temperatura, humedad y luz.

Heladera: indispensable para el tratamiento de la dormición de ciertas simientes. Con espacio interior de 300 cm^3., que cubre las exigencias de un buen volumen de trabajo. En su interior se dispondrá un termómetro de máxima y mínima para el control continuo de la temperatura.

Papel de filtro, secante o toallas de papel: usadas como lecho germinativo. De ellos, el papel de filtro es el mejor, siendo el sustrato que mas comúnmente se emplea. En todos los casos, no deben producir toxicidad sobre las semillas en germinación.

Las semillas a germinar van colocadas sobre el fondo de recipientes tales como:

1) Bandejas de plástico: de las que se usan para poner alimentos en la heladera; se recomiendan de plástico transparente (paredes y tapas). En cuanto al formato, depende del espacio con que se cuente tanto sobre las mesadas como dentro de las estufas. Se sugiere el tamaño de 20 x 35 x 4 cm., apropiadas para contener 400 semillas grandes bien acomodadas para la germinación, dispuestas a 1-1,5 cm. entre sí.

2) Cajas germinadoras o de Koenig: Son de cinc, forradas con fibra de vidrio o plástico para evitar reacciones del agua con el metal, son rectangulares.

3) Cajas de Petri: Su uso es poco recomendado debido a que el vidrio pyrex filtra determinada longitud de onda de los rayos luminosos, interfiriendo en la calidad de la luz incidente sobre las semillas.

Para separar las simientes destinadas a los ensayos de germinación existen aparatos contadores de semillas.

Contadores electrónicos de semillas: cumplen con el recuento de una manera extremadamente rápida.

Contadores de semillas al vacío: cuentan con una bomba al vacío conectada a un cabezal perforado que varía de forma, tamaño y agujeros de acuerdo con los distintos sustratos de germinación y los diferentes tipos de semillas grandes o pequeñas que debe aspirar.

Tablas contadoras: para trabajar con semillas grandes; su tamaño será apropiado al tamaño del recipiente sobre el cual han de colocarse las semillas.

La siembra sobre papel se ve facilitada usando una rejilla cuadriculada de plástico, de las que se utilizan en los artefactos de iluminación con tubos fluorescentes, y que configuran celdas de 1 cm^2, espaciados 1 ó 2 cm. según los casos. Se corta una pieza de 100 agujeros. Se apoya la rejilla en cuestión sobre el sustrato y se van depositando las semillas ocupando todos los espacios sin necesidad de contarlos ni de cuidar su distribución ordenada.

Aparatos de laboratorio para ubicar las camas de siembra (proporcionan a las semillas las diferentes condiciones recomendadas para su germinación).

Estufas: aseguran a las semillas una temperatura determinada y constante.

Es preciso proveerlas de una fuente luminosa, puesto que se recomienda como norma el procesamiento de las semillas bajo ciclos de luz-oscuridad, a menos que se especifique claramente que la luz inhibe la germinación de determinada especie.

Cuando se requieren temperaturas superiores a los 25°C, utilizar una estufa mediana (76 x 65 x 54 cm.) en la cual se instalan 2 tubos de 20 watts. Es importante poner dos tubos fluorescentes, uno en la base y otro en el nivel superior del gabinete interno, pues las bandejas con las semillas producen sombra, y alteran la uniformidad de la intensidad lumínica (750 unidades lux como mínimo). La sola presencia de los tubos encendidos en el habitáculo eleva la temperatura interna alrededor de los 25°C; para obtener temperaturas superiores bastará con regular el termostato.

Cuando en cambio, se quiere mantener una temperatura de 20°C en el interior de una estufa a la cual se incorpora una fuente de luz, se utiliza un aparato de mayores dimensiones que el anterior (100 x 95 x 90 cm.), de forma tal que esa fuente de luz no signifique también una fuente de calor, independientemente del que pueda producir la estufa misma.

Las estufas modernas poseen un termómetro incorporado en su pared superior interna. Será conveniente controlar la temperatura del interior colocando un

termómetro en el medio del gabinete, a nivel del lecho de las semillas (siempre en posición oblicua, para evitar que se interrumpa la columna de mercurio).

Germinadores: Son aparatos mas grandes que las estufas.

Constan de un gabinete de acero inoxidable, de doble pared, aislado; entre la pared externa y la interna circula el aire cuya temperatura está regulada por un termostato electrónico, que controla los ciclos de refrigeración y calentamiento y ajusta también la temperatura cuando cambian las condiciones ambientales externas. El rango térmico es de 5 a 45 °C.

Un sistema de humidificación del aire asegura el nivel de humedad requerido, que puede llegar hasta la saturación.

La iluminación se logra a través de tubos fluorescentes luz-día de 40 watts, ubicados verticalmente en la pared del fondo del gabinete, obteniéndose de esta forma la misma intensidad de luz en todo el interior. Un programador electrónico ("timer") regula los períodos de luz y oscuridad.

Mesa de germinación: está provista de una superficie móvil de acero inoxidable, apoyada sobre una cuba rectangular no muy honda (15 cm.) que contiene agua. La refrigeración y el calentamiento están regulados por un sistema de control electrónico, con sensor de la temperatura incorporado; un reloj marca los ciclos térmicos día-noche.

Lámpara de rayos ultravioletas: para pruebas de fluorescencia, que emita radiaciones de onda larga entre 300 y 400 nanómetros. Estos aparatos se prenden en un cuarto oscuro: "se recomienda no exponer las manos a las radiaciones".

Equipamiento para determinación de la humedad.

La cantidad de agua presente en las semillas es el factor clave que condiciona el mantenimiento de su viabilidad desde la cosecha hasta la siembra.

Para la determinación de humedad se debe contar con un mortero o con un molinillo (tipo café) y una estufa que alcance rangos de temperatura entre 70 y 135° C, para presecado y secado.

Brabender Moisture Tester: para un análisis mas directo. Es un aparato de determinación precisa.

Permite operar con 6-8 muestras por vez.

Cada muestra ya pesada se introduce en la celda, se enchufa el aparato que trabaja a alta temperatura, 103 o 130°C según las especies. El calentamiento hace perder la humedad a la semilla. La diferencia de peso entre el valor inicial y el peso luego de eliminar el agua marca el nivel de humedad de la semilla.

Tecator Moisture System 6020: es compacto. Presenta una consola de comandos con teclas y visor, una celda con sensor que aloja las semillas y una tolva de plástico movible. En el visor se lee la humedad en 6 segundos, apretando solo dos teclas, el peso en 5 segundos y la temperatura en un segundo. Tiene memoria para establecer la humedad de semillas de 25 especies diferentes. También permite el registro del *peso hectolítrico* de la semilla, utilizando un cilindro metálico para que el volumen adecuado de semilla caiga a la tolva. Funciona a pilas.

Higrómetro DELVER: La determinación de la humedad se efectúa empleando entre 60 y 180 g. de semilla según las especies, y en su calculo interviene un factor de corrección que es función de la temperatura.

Solo orienta en las tareas agrícolas puesto que no tiene precisión absoluta. Se usa en el campo para conocer el contenido de agua de los granos a la cosecha.

METODOLOGÍA DE TRABAJO.

1) Toma de muestras.

Se tendrán en cuenta 3 pautas:

- La muestra deberá ser representativa.
- El análisis se hará sobre una pequeña parte del lote entero.
- Para juzgar la calidad de un lote basándose en pequeñas muestras, estas seran extraídas correctamente y al azar.

La obtención de una muestra significativa debe realizarse con las siguientes recomendaciones:

1) Se entiende por lote a una cantidad específica de semilla identificable físicamente y que en el muestreo no presente evidencias de heterogeneidad.

2) El peso del lote no excederá los valores indicados a continuación, sujeto a una tolerancia del 5 %:

- hasta 10.000 Kg. para semillas de forrajeras y hortalizas del tamaño del agropiro o inferior (agropiro, raigrás, festuca, pasto ovillo, lino, lotus, tréboles, alfalfa, sorgos, cebolla, achicoria, etc.).

- hasta 20.000 Kg. para semillas de soja, girasol, poroto, arveja, vicia, etc.
- hasta 25.000 Kg. para semillas de trigo, triticale, avena, cebada, arroz, centeno, maní.
- hasta 40.000 Kg. para maíz.

3) El lote deberá estar acondicionado en bolsas u otros envases. En el momento del muestreo todos los envases deberán estar etiquetados y precintados.

4) Para los lotes envasados se designarán al azar los envases a muestrear. Se tendrá presente que en las capas cercanas a las paredes de las bolsas hay mayor proporción de semillas livianas que en las partes centrales. Se tomarán muestras elementales arriba, abajo y en el medio, pero no necesariamente en más de un punto por envase.

5) Si se trata de semillas a granel o contenidas en grandes envases se muestreará al azar en el centro, en la base y en los bordes, a distintas profundidades.

6) Se entiende por *muestra elemental* la porción de semilla extraída en algún punto del lote. La *muestra global* es la combinación y mezcla de todas las muestras elementales.

7) El lote de semillas a muestrear no debe mostrar signos de heterogeneidad. Todos los envases de un lote deberán contener semillas de la misma calidad en todos los aspectos.

8) Se deberá chequear cada *muestra elemental* antes de mezclarlas todas para formar la *muestra global*.

9) La muestra para el contenido de humedad debe ser extraída simultáneamente con la muestra para pureza y germinación, y colocada rápidamente en un envase hermético.

10) Datos que van con la muestra:

- Nombre y dirección del solicitante. Productor. Vendedor.
- Especie y cultivar.
- Número del lote (o marca).
- Tamaño del lote. Cantidad de envases.
- Lugar y fecha del muestreo.
- Tipos de análisis solicitados.
- Firma y sello aclaratorio del funcionario actuante.
- Cualquier otra información que se considere de importancia.

2) Forma en que opera el laboratorio de análisis.

Una vez remitidas las muestras al laboratorio, éstas son registradas en mesa de entrada, donde se les confecciona un protocolo de recepción en donde figura un número de protocolo y un número de muestra. Ese número identificará la muestra a través de todas las pruebas a las que sea sometida.

Los parámetros que se estudian en el Laboratorio son los siguientes:

- Autenticidad de la especies.
- Pureza físico-botánica.
- Determinación de semillas extrañas en número.

- Poder germinativo.
- Valor cultural o valor real.
- Humedad.
- Estado fitosanitario.
- Viabilidad.
- Vigor.
- Homogeneidad.

Los ensayos deben ser iniciados inmediatamente después de la recepción de las semillas; no es conveniente retrasar su análisis en más de 24 horas. Cuando la demora es inevitable se deberán guardar las muestras en lugar fresco y ventilado.

Las muestras recibidas deben reducirse a una muestra de trabajo de peso inferior al prescrito para cada uno de los ensayos, la reducción debe ser también al azar, para asegurar la representatividad del lote original.

A partir de la fecha de emisión del Certificado de Análisis, cada muestra debería ser guardada durante un año o por lo menos hasta la época de siembra de ese año de la especie analizada.

CAPITULO N° 3.

ANALISIS FÍSICO - BOTÁNICOS.

1) Autenticidad de Género y Especie.

Se verificará si realmente las semillas remitidas al laboratorio pertenecen al género, especie y cultivar declarados.

La evaluación se realiza estudiando los caracteres morfológicos de las simientes, y comparándolos con las muestras de referencia pertenecientes al archivo de semillas del laboratorio.

2) Pureza.

Aquí se determina:

a) la composición en peso de la muestra, y por consiguiente la composición del lote original,

b) la identidad de las distintas especies de semillas y de materia inerte presentes en la muestra.

Forma de trabajo:

Separar una muestra de trabajo de la muestra total recibida.

Pesar la cantidad requerida según la especie.

Volcar sobre una superficie plana (vidrio, cartulina, fórmica) y manualmente, ayudándose con una pinza (bayoneta) separar los diversos componentes en las siguientes fracciones:

- Semillas puras.
- Materia inerte.
- Semillas extrañas:
    - * Semillas de plantas cultivadas
    - * Malezas comunes
    - * Malezas invasoras y plagas de la agricultura.

En el análisis utilizar cribas o zarandas, diafanoscopio y aparatos aventadores o sopladores de semillas.

La luz reflejada, principio del diafanoscopio, permite la observación de los granos vestidos en los que, por transparencia, se pone en evidencia el tamaño de los cariopses. De esta manera se pueden detectar los antecios vanos; ello es particularmente útil cuando se trabaja con gramíneas tales como *Lolium spp.* y *Festuca spp.*

Los aventadores o aparatos sopladores generan un flujo de aire que pasa através de la muestra y separa los constituyentes mas livianos tales como pajas y antecios vanos, en semillas de pasturas, o las vainas vacías de leguminosas. Los aventadores se emplean para separar muestras de 1,0 a 5,0 g. Su uso es obligatorio para análisis de *Poa pratensis y Dactylis glomerata.*

3) Definición de las fracciones en el análisis de pureza.

a) Semilla pura.

En términos de análisis de semillas, se consideran también como semillas a estructuras que son frutos o frutos envueltos en brácteas protectoras (mericarpios, antecios). Por lo tanto la semilla pura debe ser definida para cada especie, grupo de especies o familia botánica.

Se considera semilla pura a toda simiente de la especie analizada cuya identidad ha sido confirmada previamente o a la semilla de una determinada especie hallada predominante en el análisis, incluyendo todas las variedades botánicas y cultivadas de dicha especie.

b) Materia inerte.

Comprende tierra, piedras, restos vegetales y animales, trozos de corteza, agallas de nemátodes, esclerocios de hongos, semillas dañadas de plantas cultivadas y de malezas.

c) Semillas extrañas.

Aquí se incluyen las semillas o pseudosemillas de cualquier especie distinta a la especie de la semilla pura.

Se consideran *semillas extrañas de plantas cultivadas* las procedentes de cultivos distintos a la especie en estudio.

Se las analiza de acuerdo con las normas establecidas para separar la fracción "semilla pura".

Cuando la proporción de una especie cultivada ajena a la declarada supera el 5 % en peso, la muestra se considera "*mezcla*".

Se define como semilla de maleza a toda simiente extraña, sin valor agrícola-comercial, producida por una planta indeseable y perjudicial para el cultivo. El daño económico derivado será tanto mayor cuanto mas competitiva e invasora sea la especie o cuanto mayor sea su presencia en el campo.

4) Cálculo y expresión de los resultados.

Una vez separadas en cajas de metal o de plástico, las fracciones indicadas se pesan; el número de cifras decimales que corresponde tomar en la pesada está relacionado con el tamaño de la muestra de trabajo y es el siguiente:

Peso de la muestra de trabajo (gramos)	N° de decimales
menos de 1	4
1 - 9,9999	3
10 - 99,99	2
100 - 999,0	1
1.000 o mas	0

Obtenido el peso de cada fracción, se calcula el porcentaje que él representa sobre el total obtenido con la suma de los pesos de todas las fracciones. Comparar este último valor con el peso de la muestra de trabajo inicial para detectar eventuales errores o pérdidas de material. La diferencia de peso antes y después del análisis no debe se mayor o menor al 5 %, si no habrá que repetir el análisis.

El resultado de análisis de pureza se debe expresar con un solo decimal y el conjunto de todas las fracciones debe sumar 100.

En el certificado de análisis que se expide deben constar:

Nombre declarado de la muestra entregada.

- Nombre latino de la o de las especies de semilla pura resultante de la clasificación botánica de la muestra (conviene entregar también su nombre vulgar).
- Clase de materia inerte.
- Porcentajes de semilla pura, semillas extrañas cultivadas, semillas de malezas y materia inerte.
- Identificación botánica de las semillas extrañas, consignadas por orden alfabético según su nombre científico (es útil dar también su nombre vulgar).

Los componentes que presentan menos de 0,05 % se indican como "trazas" y si el resultado del análisis de alguna categoría fuera nulo, se expresará como 0 (cero).

CAPITULO N° 4.

PODER GERMINATIVO DE LAS SEMILLAS.

Introducción.

La germinación es la reanudación de las actividades de crecimiento del embrión, suspendidas o disminuidas al momento de alcanzar la semilla su madurez fisiológica.

Esta reanudación implica el establecimiento de un estado metabólicamente activo que se manifiesta fisiológicamente con división celular y diferenciación, y morfológicamente con la transformación de un embrión en una plántula.

La primera expresión visible del reactivado proceso del crecimiento es la emisión de la **radícula**.

La germinación es definida como el desarrollo, a partir del embrión de la semilla, de una plántula con las estructuras esenciales que indican su capacidad para originar una planta normal, cuando se le brindan condiciones favorables de crecimiento.

El ensayo de poder germinativo proporciona:

- Información sobre el valor de las semillas con relación a su comportamiento a campo en condiciones agroclimáticas favorables.
- Permite la comparación de la máxima capacidad de siembra de diferentes lotes.

La Asociación Internacional de Ensayos de Semillas establece para cada especie las condiciones optimas de germinación, considerando como variables: sustrato,

humedad y aireación, temperatura, iluminación y tratamientos para romper la dormición.

Sustrato.

Es el lecho germinativo sobre el cual se acomodan las semillas, cuyo objetivo es proporcionar la humedad adecuada para el proceso de germinación.

Se ha autorizado el uso de papel de filtro, papel secante, toallas de papel, algodón, arena y suelo. Todos los sustratos deben estar libres de esporas, hongos, bacterias, nematodos, semillas extrañas o sustancias químicas.

a) Papel.

Habrá que tener en cuenta lo siguiente:

- **Composición:** las fibras serán de celulosa de madera blanqueada químicamente, de algodón o de cualquier otra celulosa vegetal purificada.
- **Textura:** las raicillas no podrán penetrar en el interior del papel.
- **Color:** blanco o cualquier otro, siempre que la coloración se deba a sustancias no tóxicas para el desarrollo de las plantulas, ni solubles en agua.

Ensayo de fitotoxicidad del papel.

Utilizar como lecho germinativo el papel conocido y el nuevo que se quiere probar.

Cortar el papel según las dimensiones de las bandejas donde iran colocados, utilizandose 2 capas si es papel secante y 4 capas si es papel de filtro o toallas de papel.

Humedecer los sustratos con agua.

Existen especies cuyas plántulas en germinación se reconocen como sensibles a la toxicidasd del papel.

Ellas son: *Eragrostis curvula* (pasto llorón) y *Phleum pratense.*

Preparar 4 repeticiones de 100 semillas de una de estas especies, usar el papel conocido y hacer lo mismo con el papel a ensayar.

Realizar la evaluación del papel comparando el desarrollo radicular de las plántulas germinadas sobre el sustrato de calidad conocida y sobre el sustrato a probar.

La evaluación no se realiza al finalizar el ensayo, sino en el primer recuento recomendado para la especie utilizada (6° día para pasto llorón), puesto que los síntomas de inhibición radicular son más evidentes en un estado precoz de desarrollo.

Los síntomas a tomar en cuenta son:

- Encorvamiento de las raicillas por encima del papel.
- Pelos radiculares entrelazados.
- Punta de la raíz acortada y a veces sin color.
- Plúmula acortada.

Este tipo de plántulas se cuentan y registran en "plántulas anormales".

Comparar luego los datos obtenidos según las tolerancias establecidas para los resultados de diferentes ensayos de germinación de una misma muestra.

Si los valores registrados en el ensayo con papel nuevo y en el ensayo con papel conocido superan las tolerancias permitidas se desecha el papel nuevo, por causar fitotoxicidad.

b) Arena.

Es el sustrato que mejor respuesta germinativa provoca en las semillas en general.

Deberá ser arena de río con pH entre 6,0 y 7,5.

Sus partículas deberán pasar por tamiz de malla 20 de mesh (0,833 mm.), y ser retenida por uno de malla 270 de mesh (0,053 mm.).

Lavar la arena y esterilizar antes de su empleo.

Someter la arena a alta temperatura (120 - 150°C) durante 3 horas en autoclave, en estufa de esterilización o directamente en horno común.

Usar la arena una sola vez, pero puede ser utilizada para varios ensayos, volviendo a esterilizarla después de cada uno.

c) Suelos.

Está limitado a aquellos casos en que las semillas acusan síntomas de fitotoxicidad al desarrollarse sobre papel. Provoca grandes variaciones en los resultados obtenidos debido a la dificultad que ofrece su normalización.

Humedad y aireación.

El sustrato debe mantenerse constantemente húmedo para satisfacer los requerimientos de las semillas, pero la humedad no debe ser excesiva pues ello perjudica las simientes con largo período de germinación. La humedad no deberá ser tan elevada como para que se forme una película de agua alrededor de cada semilla.

El agua deberá ser pura, pH neutro, entre 6,5 y 7,0. Si se usa agua destilada se deberá airear para aumentar el contenido de oxigeno; el agua desmineralizada asegura resultados mas uniformes que el agua de las canillas y no necesita aireación como el agua destilada.

Temperatura.

Cuando se trabaja con luz, tanto solar como artificial, hay que cuidar que las variaciones térmicas provocadas por la fuente de luz no supere el nivel recomendado, siendo la oscilación admitida ± 1°C. Cuando se requieren temperaturas alternas, la temperatura inferior se mantendrá durante 16 horas y la superior durante las 8 horas restantes.

Luz.

La fuente de luz puede ser natural o artificial y debe incidir con la misma intensidad sobre todos los lechos germinativos. Se aconseja el uso de lámparas fluorescentes,

blancas y frías, pues su emisión espectral es débil en el infrarrojo y elevada en la región del rojo, que favorece la germinación.

La intensidad luminosa óptima para favorecer los requerimientos de las semillas varía entre 750 y 1250 unidades lux.

Tratamientos especiales para romper la dormición.

Existen semillas de determinadas especies que son potencialmente viables, pero no germinan con rapidez al colocarlas en condiciones favorables para hacerlo, esto significa que se encuentran en estado de dormición, el cual desaparece naturalmente con el tiempo.

Métodos para romper dormición en Laboratorio.

a) ***Para romper la dormición fisiológica.***

Prerrefrigeración: mantener las semillas ya ubicadas en el sustrato húmedo, a temperaturas entre 5 y 10°C durante un período variable de 3 a 7 días.

Poner a germinar bajo las condiciones prescriptas para cada especie.

Presecado: someter las semillas a una temperatura alta, pero no superior a los 35 - 40°C, durante un período de 2 a 7 días, antes de ponerlas a germinar.

Nitrato potásico: humedecer el sustrato hasta la saturación con una solución de NO_3K al 0,2 % (colocar en un vaso de precipitación de 1000 ml. 2,0 g. de NO_3K pesados en balanza analitica, disolver en 1000 ml. de agua).

Colocar sobre el las semillas, directamente en condiciones de germinación.

De allí en más, para mantener la humedad se emplea solo agua.

Ácido giberélico: recomendado para *Avena sativa (*avena), *Hordeum vulgare* (cebada), *Secale cereale* (centeno*) y Triticum aestivum* (trigo). Humedecer el sustrato con una solución de GA_3 de 500 ppm (500 mg. de GA_3 disueltos en 1000 ml. de agua) antes de colocar los granos bajo condiciones de germinación.

Ensayo en sobres de polietileno: si al finalizar el ensayo normal de germinación se encuentra un porcentaje elevado de semillas frescas no germinadas (ej. leguminosas), procesar de nuevo las semillas, encerradas en sobres de polietileno del tamaño justo para contenerlas a fin de aumentar la concentración de CO_2 , lo cual parecería intervenir en la ruptura de la dormición.

b) ***Para remover la dureza de las capas seminales.***

Remojo: dejar las semillas a remojo en agua durante 24 - 48 horas.

Escarificación mecánica: tratar de lesionar la pared de la semilla por abrasión, corte, pinchado o perforado.

Tener cuidado de no dañar el embrión.

Es apropiado para semillas de Lotus spp. y Eragrostis curvula.

Escarificación química: en este caso la remoción de la capa seminal es por digestión química (ej. Lotus spp).

Remojar las semillas en una solución hecha con ¾ partes de ácido sulfúrico y ¼ parte de agua. El tratamiento se prolonga hasta que las paredes seminales se ablanden; generalmente 5 - 10 minutos o más.

Lavar las semillas luego con agua corriente antes de ser puestas a germinar.

c) ***Para remover sustancias inhibidoras.***

Prelavado: lavar las semillas en agua corriente para eliminar sustancias inhibidoras.

Secar luego a una temperatura no superior a los 25°C. (ejemplo: *Beta vulgaris*, remolacha).

Remoción de glumelas: en ciertas especies de gramíneas la germinación se ve favorecida eliminando manualmente las estructuras que encierran la semilla, como las glumelas (ejemplo: en determinados sorgos híbridos).

Técnica operativa de la germinación.

Utilizar semillas de la fracción " semilla pura".

Mezclar para homogeneizar.

Separar al azar 400 semillas con las cuales se harán repeticiones que incluyen 100, 50 ó 25 unidades, según el tamaño de la semilla y de la cama de siembra.

Distribuir las semillas sobre el sustrato espaciadas uniformemente, dejando alrededor de 1 - 1,5 cm. entre sí para evitar que las raicillas se mezclen o enreden.

Ubicar luego las semillas en estufas, germinadores, mesas germinadoras, etc.

Forma de operar en los distintos ensayos de germinación.

a) Ensayos de germinación con papel.

El sustrato de papel se emplea en los siguientes métodos:

SP (= sobre papel; en inglés **TP** : top of paper).

Disponer las semillas sobre su lecho germinativo humedecido, conformado por una fina capa de algodón hidrófilo recubierta por una lámina de papel secante o papel de filtro, colocado sobre el fondo de una bandeja.

Cubrir las bandejas con las semillas con su tapa transparente, o con una lámina de vidrio, o son envueltas en una bolsita de polietileno y cerradas con dos aprietapapeles (manitos) de librería.

Con el algodón no se puede estandarizar la cantidad de agua. Por lo tanto se puede usar toallas de papel tipo Sussex.

La cama de siembra constará de 4 toallas mojadas en 40 ml. de agua, siendo de 20 x 20 cm. para 200 semillas y 30 x 20 cm. para 400 semillas.

Llevar las bandejas a la cámara de germinación, a estufa o al germinador.

Si se cuenta con regulador de humedad no se deberán tapar ni encerradas en bolsitas de polietileno, programando el aparato para valores de humedad relativa del 80 - 85 %.

EP (= entre papel; en inglés **BP:** between paper).

Poner las semillas a germinar entre dos capas de papel humedecido formando un "sandwich".

Para ello se necesitan dos rectángulos de papel de filtro o papel secante del tamaño de una hoja de papel oficio (por ejemplo: piezas de 25 x 15 cm.); una bolsita de polietileno transparente; dos broches o manitos, una bandeja con agua para mojar los papeles.

Remojar el rectángulo pasándolo por agua.

Dejar escurrir las gotas.

Disponer sobre una superficie plana (vidrio, plástico, fórmica).

Acomodar las semillas por arriba ordenadamente.

Mojar otro rectángulo.

Dejar escurrir las gotas de agua y colocar por encima del otro tapando las semillas.

Apoyar este sandwich de dos papeles mas semillas sobre la palma de una mano, se lo introduce con la otra en una bolsita de plástico, se doblan sus bordes y se cierran con dos "clips".

Llevar este lecho germinativo a estufa.

No conviene apilar mas de 2 - 3 "sandwich" pues la presión de los lechos germinativos superpuestos perjudica el desarrollo normal de las plantas.

b) Ensayos de germinación con arena.

Se emplea en los siguientes métodos:

A (= en arena, en inglés **S**: sand).

Distribuir las semillas sobre una capa uniforme de arena húmeda.

Cubrir con una capa de arena de 1 a 2 cm. de espesor, sin presionar.

SA (= sobre la arena; en inglés **TS** top of sand).

Presionar suavemente las semillas sobre la superficie, sin introducirlas en el interior del sustrato.

En todos los casos la arena debe ser húmeda, y la cantidad de agua que se adiciona depende de las características propias de la arena y del tamaño de los granos que se analizan.

Aquí se toma en cuenta la capacidad de retención de agua de la arena:

- Los cereales, a excepción del maíz, se procesan en arena húmeda al 50 % de su poder de retención del agua.
- Las leguminosas de semilla gruesa, el girasol y el maíz germinan bien en la arena humedecida al 60 %.

Calculo de la capacidad de retención de agua.

Pesar en balanza granataria, 100 g. de arena.

Tapizar un embudo con un redondel de papel de filtro al que se humedece.

Llenar el embudo tapizado con la arena ya pesada.

Ubicar sobre un vaso de precipitación.

Volcar lentamente 100 ml. de agua medidos con probeta. Esta pasa a través de la arena y se recoge en el recipiente situado por debajo.

El escurrimiento del agua se lleva a cabo muy lentamente.

Dejar reposar el embudo en cuestión durante 24 horas.

Pesar la cantidad de agua recogida y por diferencia se obtiene la cantidad de agua retenida. Para conocer cuántos ml. de agua son retenidos por kg. de arena se extrapola el valor obtenido multiplicándolo por 10.

De ese valor, se calcula el 50 ó 60 % según los granos a estudiar.

Ejemplo:

Pesar 100 g. de arena con balanza granataria.

Medir con probeta graduada, 100 ml. de agua.

Verter el agua en la arena.

Dejar escurrir.

Pesar la cantidad de agua escurrida: 75 g.

Por diferencia, fueron retenidos 25 ml. de agua en 100 g. de arena, es decir 250 g. de agua en 1 kg. de arena.

Para conocer el 60 % de la capacidad de retención del agua se realiza el siguiente cálculo:

si 250 ml. de agua representan el 100 %, **x** ml. de agua representan el 60 %, o sea:

250 ml.---------- 100 %

x---------- 60 %

x= 150 ml.

Por lo tanto, se deben incorporar 150 ml. de agua por kg. de arena para obtener una humedad del 60 % de la capacidad de retención de agua. Ese valor luego debe ser ajustado a la cantidad de arena que se utiliza realmente en el ensayo, la cual depende del tamaño de la bandeja.

c) Condiciones requeridas para los ensayos de germinación.

La duración del ensayo de germinación y el tiempo adecuado para la primera lectura varían con la especie.

El tiempo de la primera lectura se ha establecido como el período mínimo durante el cual las plántulas alcanzan un estadio de desarrollo apropiado para su correcta evaluación.

Si al terminar el ensayo de germinación algunas semillas han empezado apenas a germinar, el tiempo del ensayo será prolongado, y si la máxima germinación se alcanza antes de que finalice el período normal del test, éste se dará por terminado anticipadamente (como pasa en trigos de buena calidad).

Condiciones requeridas para la determinación del *poder germinativo* de las especies mas importantes.

MAÍZ (*Zea mayz*).

Sustrato: EP (entre papel de filtro ó papel secante); A.

Temperatura: 20-30 °C, (la temperatura citada primero será mantenida por 16 horas y la segunda se mantiene por 8 horas). Cuando no se cuenta con cámaras con alternancia de temperaturas se usan temperaturas de 20 ó 25 °C.

Primer recuento (días): 4, (este número es usado para energía germinativa).

Recuento final (días): 7, (este número es usado para poder germinativo).

TRIGO *(triticum aestivum y durum)*.

Sustrato: EP; A; SP (sobre papel de filtro ó secante).

Temperatura: 20°C.

Primer recuento (días): 4.

Recuento final (días): 8.

Recomendaciones adicionales para romper la dormición: Presecado (30-35 °C); preenfriamiento; ácido giberélico.

GIRASOL *(Heliantus annuus)*.

Sustrato: EP; A.

Temperatura: 20-30°C. (en cámaras con alternancia de temperatura).

25°C; 20°C. (en cámaras sin alternancia de temperatura).

Primer recuento (días): 4.

Recuento final (días): 10.

Recomendaciones adicionales para romper la dormición: Preenfriamiento; presecado.

AVENA (*Avena sativa*).

Sustrato: EP; A.

Temperatura: 20°C.

Primer recuento (días): 5.

Recuento final (días): 10.

Recomendaciones adicionales para romper la dormición: Presecado (30-35 °C); Preenfriamiento; ácido giberélico.

CEBADA (*Hordeum vulgare*).

Sustrato: EP; A.

Temperatura: 20°C.

Primer recuento (días): 4.

Recuento final (días): 7.

Recomendaciones adicionales para romper la dormición: Presecado (30-35°C); preenfriamiento; ácido giberélico.

SORGOS *(Sorghum spp.).*

Sustrato: EP; SP.

Temperatura: 20-30°C. (para cámaras con alternancia de temperatura).

25°C. (para cámaras sin alternancia de temperatura).

Primer recuento (días): 4.

Recuento final (días): 10.

Recomendaciones adicionalespara romper la dormición: Preenfriamiento.

SOJA (*Glycine max).*

Sustrato: EP; A.

Temperatura: 20-30°C. (para cámaras con alternancia de temperatura).

25°C. (para cámaras sin alternancia de temperaturas).

Primer recuento (días): 5.

Recuento final (días): 8.

Lectura del ensayo de germinación.

Para evaluar los resultados del ensayo de germinación, realizar la "lectura" del material durante su procesamiento y al finalizar el mismo. Determinar, dentro de cada repetición, el número de semillas y plántulas que integran cada una de las siguientes categorías:

- plántulas normales
- plántulas anormales

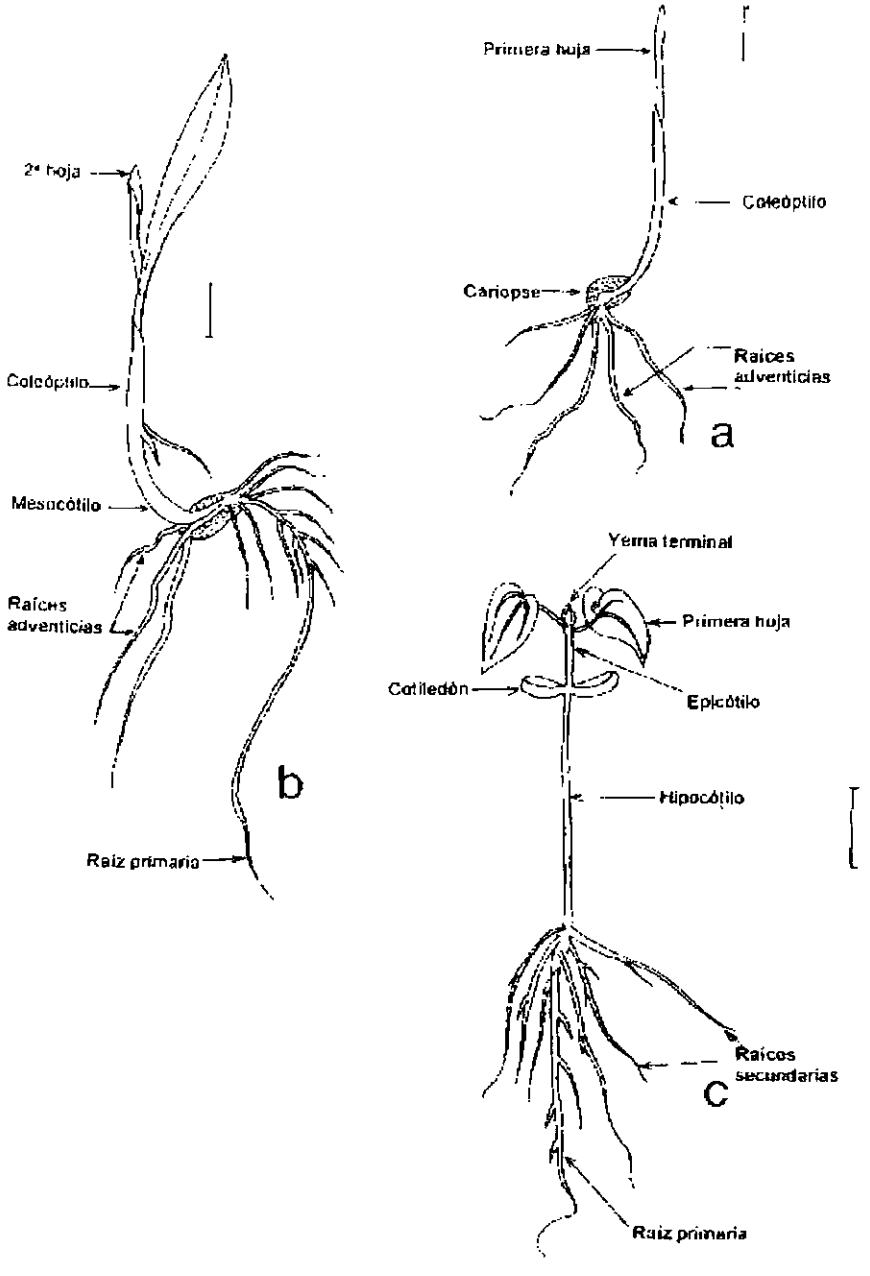
- semillas duras
- semillas frescas no germinadas
- semillas muertas.

Plántulas normales.

Son aquellas cuyo aspecto pone de manifiesto su capacidad para continuar el desarrollo normalmente, presentando en buen estado los órganos esenciales para su ulterior crecimiento.

Constarán de:

- un sistema radicular bien desarrollado, con una raíz principal y/o raíces laterales normales (como en la mayoría de las dicotiledoneas) o dos o mas raíces seminales en plantas con sistema radical fibroso (como en Gramíneas, excepto Sorghum spp.);
- un eje embrionario bien desarrollado, con epicótilo o hipocótilo alargado (según la especie), plúmula (yema terminal), cotiledones; en algunas Gramíneas, mesocótilo normal (ej. maíz); un cotiledón en plántulas de monocotiledoneas y dos cotiledones en plántulas de dicotiledóneas;
- hojas primarias verdes, fotosintéticas, expandidas (una hoja en plantas con hojas alternas, dos hojas en plantas con hojas opuestas);
- un coleóptilo bien desarrollado en Gramíneas, con la primera hoja verde emergente de él o alargada en su mitad superior.

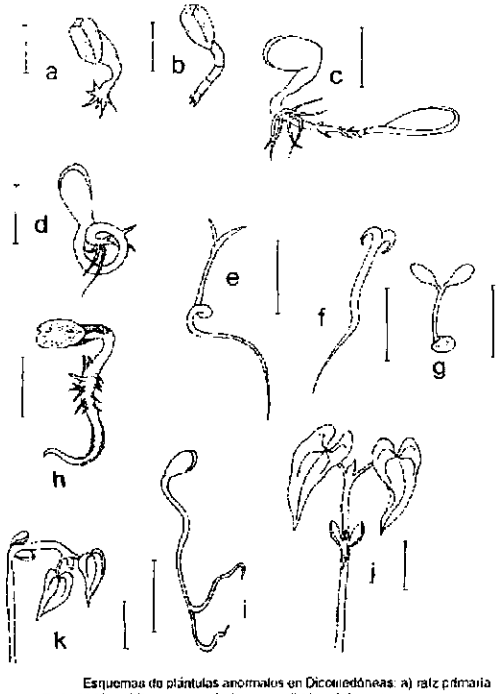


Esquemas de plántulas normales en germinación. Monocotiledóneas Gramíneas: (a) plántula de trigo; (b) plántula de maíz; Dicotiledóneas: (c) plántula de poroto. La escala de longitud que acompaña cada esquema equivale a 1 cm.

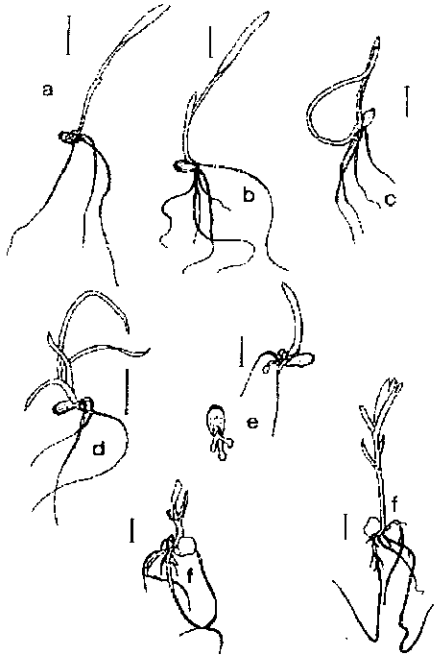
Plántulas anormales.

Son las que no pueden desarrollar en planta normales uno o varios de los siguientes defectos:

- raíz primaria: ausente; mazuda; deforme; fisurada desde el ápice; etc.
- raíces seminales: ausentes; en número de uno;
- epicótilo, hipocótilo, mesocótilo: atrofiados; ausentes; cortos y gruesos; etc;
- cotiledones: deformes; rotos; hinchados o curvados; de aspecto vítreo;
- yema terminal y tejidos adyacentes: ausentes; deformes o dañados;
- hojas primarias: ausentes; de forma normal pero reducidas a menos de ¼ del tamaño normal; deformes; dañadas; etc;
- plántulas: amarillas o blancas; con los cotiledones que emergen antes que la raíz; ahiladas; aspecto vítreo; etc.



Esquemas de plántulas anormales en Dicotiledóneas: a) raíz primaria atrofiada; b) hipocótilo con constricciones; c y f) hipocótilo corto y grueso; d y e) hipocótilo en espiral; g) raíz primaria atrapada por la cubierta seminal; h) hipocótilo podrido; i) raíz primaria hendida desde el extremo, j) hipocótilo con hendidura longitudinal; k) epicótilo curvado. La escala de longitud que acompaña cada esquema equivale a 1 centímetro.



Esquemas de plántulas anormales en Monocotiledóneas: a) coleóptilo enrollado; b) coleóptilo hendido más de 1/3 de su longitud; c) coleóptilo hendido en la base; d) hojas fragmentadas y coleóptilo hendido; e) raíces mazudas; f) coleóptilo hendido. La escala de longitud que acompaña cada esquema equivale a 1 centímetro.

Semillas duras.

Son las simientes que al finalizar el período prescrito de ensayo, permanecen duras, tales como fueron puestas a germinar, dado que por la impermeabilidad del tegumento no son capaces de absorber agua y comenzar el proceso de germinación (en Leguminosas).

Semillas frescas no germinadas.

Se diferencian de las duras puesto que absorben agua y se hinchan, pero no germinan ni entran en estado de putrefacción (esto se puede comprobar pues cuando se aprietan con una pinza se aprecia una consistencia firme).

Cuando son puestas en condiciones adecuadas para germinar se produce la imbibición de agua, pero no se verifica la reanudación del crecimiento del embrión, pues está bloqueado su ulterior desarrollo. Estas semillas permanecen aparentemente viables al finalizar el ensayo de germinación.

Este fenómeno se debe a un problema de dormición.

Solamente al revertir los mecanismos fisiológicos de inhibición se pondrá en marcha el proceso activo de la germinación.

Semillas muertas.

Son las simientes no viables, que se deshacen al ser apretadas al término del período de ensayo.

La imbibición tiene lugar como consecuencia de fuerzas que responden a leyes físico-químicas, por lo tanto ingresa agua a las semillas, estas se hinchan, pero como su deterioro es irreversible no ha de producirse la reactivación metabólica propia de la germinación y terminan descomponiéndose por putrefacción.

Expresión del ensayo de germinación.

De cada repetición (bandeja) que se lee, se anota el número de individuos de cada categoría, a saber:

- el número de plántulas normales,
- plántulas anormales,
- semillas frescas no germinadas,
- semillas duras,
- semillas muertas, evaluadas en el primer recuento y en el recuento final.

Los datos se registran en el formulario interno de análisis de germinación, anotando los defectos de las plántulas anormales con un código de dos números: a cada órgano afectado le corresponde un número romano, a cada anormalidad le corresponde un número arábigo.

En el **certificado de análisis** se registrará:

- nombre latino de la especie analizada,
- nombre vulgar de la especie analizada,
- marca del lote,
- resultado de la prueba de germinación (en porcentaje),
- datos de las condiciones de germinación impuestas, su duración y el tratamiento para romper la dormición, cuando tuvo lugar.

Determinación del valor cultural o valor real.

Una vez completados el análisis de pureza y el ensayo de germinación se está en condiciones de calcular el *valor cultural o valor real* de un lote de semillas, que indica el número de semillas puras capaces de germinar.

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
BIBLIOTECA

$$\text{Valor cultural} = \frac{\text{Pureza (\%)} \times \text{Poder Germinativo (\%)}}{100}$$

Determinación del peso absoluto.

Se evalúa con el objetivo de conocer el peso de 1000 semillas de la muestra remitida, dato necesario para el cálculo de la densidad de siembra.

Se emplea como muestra de trabajo la fracción de la semilla pura obtenida en el análisis de pureza; pesar en su totalidad o pesar repeticiones de 100 semillas.

Si se usa la fracción pura completa, es conveniente usar un contador electrónico de semillas.

Colocar la muestra en su interior.

Registrar el número de semillas que la componen.

Pesar.

Anotar el peso con el mismo número de cifras decimales que en el análisis de pureza.

Conociendo el peso de la muestra y el número de semillas que la componen, se calcula el peso de 1.000 semillas.

Si no se cuenta con un contador de semillas, la separación de los granos se hará manualmente, sin seleccionarlos.

Se los separa en 8 repeticiones de 100.

Pesar cada repetición.

Registrar el valor con 2 cifras decimales.

Calcular la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación para el conjunto de repeticiones de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{Varianza} = \frac{n\,(\sum x^2) - (\sum x)^2}{n\,(n-1)}$$

siendo:

n: número de repeticiones.

x: peso de cada repetición en gramos.

$\sum$: sumatoria de.

Desviación típica (S)= $\sqrt{\text{varianza}}$.

Coeficiente de variación CV = $\frac{S}{\bar{x}}$ x 100.

siendo x: peso medio de cada repetición.

Calculado el coeficiente de variación, éste no debe ser mayor de 4 para todas las semillas, a excepción de las semillas vestidas de gramíneas, cuyo límite es 6. Si el valor obtenido respeta estos limites se procede al cálculo final del peso absoluto.

Extrapolar a 1000 semillas el valor obtenido para 800.

Consignar ese valor con 2 decimales.

Si el coeficiente de variación calculado excede el límite fijado, se vuelven a separar y pesar otras 8 repeticiones de 100 semillas cada una.

Calcular luego la desviación típica de las 16 repeticiones y el promedio de todas (X).

Calcular la diferencia entre el valor de cada repetición (x) y la media (X).

Desechan aquellas repeticiones cuya diferencia sea inferior al doble de la desviación típica nuevamente determinada.

Las semillas de buena calidad de las especies mencionadas a continuación registran un peso absoluto que varía en los siguientes rangos:

trigo pan	25 - 40 grs.
trigo fideo	45 - 60 grs.
girasol	40 - 80 grs.
lino	5 - 7 grs.
maíz	250 - 400 grs.
soja	130 - 180 grs.

CAPITULO N° 5.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

POR ENSAYO TOPOGRÁFICO AL TETRAZOLIO (TZ)

Introducción.

Es un análisis bioquímico que permite determinar en forma rápida la viabilidad de las semillas y da una referencia de su poder germinativo. Es útil en el caso de simientes dormidas o lentas en germinar.

Debido a que permite una estimación de la potencialidad germinativa de las semillas en 24 horas, proporciona en breve tiempo elementos de juicio para tomar decisiones referidas a compras de lotes, su acondicionamiento, despacho de mercaderías de gran demanda, mezclas de dos o mas lotes, etc.

También permite diagnosticar las causas del deterioro de la semilla (secado, plagas, lesiones mecánicas inherentes a su manejo).

En este ensayo el cloruro o bromuro de tetrazolio es usado como un indicador de las reacciones de oxido-reducción que tienen lugar en las células que respiran, poniendo de manifiesto la actividad metabólica propias de las células vivas.

Esta sal, soluble en agua e incolora, es absorbida por las semillas; al penetrar en las células reacciona con las enzimas de la respiración y se transforma en un compuesto rojo (formazán) insoluble en agua, estable y no difusible, que permanece en las células donde se formó. Por lo tanto el uso de esta droga permite distinguir las células vivas del embrión que se colorean de rojo, de las células muertas que

permanecen incoloras y de las células que respiran débilmente o enfermas, que se colorean de rosado.

El método aconseja el uso de una solución de cloruro o bromuro de trifenil tetrazolio al 0,5 ó 1,0 %.

Emplea dos repeticiones de 100 semillas, o 4 repeticiones de 50 cada una, tomadas al azar de la fracción "semilla pura".

También puede efectuarse la prueba sobre las semillas individuales que permanecen dormidas al realizar la prueba de germinación normal.

Etapas del ensayo del Tetrazolium.

En la etapa 1, se dejan las semillas unas horas (generalmente una noche) en remojo en agua (o entre papeles de filtro o papeles secantes humedecidos) para permitir el ablandamiento de las capas seminales y con ello la imbibición.

Esto facilita su tratamiento posterior (etapa 2), durante el cual los granos deben cortarse longitudinal o transversalmente con una hoja de afeitar bien filosa, o lastimarse de algún modo, según las especies, para ayudar la penetración del reactivo en la región del embrión. Los granos así preparados *han de mantenerse húmedos.*

Etapa 3, las semillas se sumergen en la solución de tetrazolio,

(conviene usar un recipiente pequeño - tipo tubo de ensayo o crisol- para no desperdiciar la droga, y taparlo).

Mantener en oscuridad, a 30°C. *La oscuridad es indispensable* porque la droga reacciona en presencia de luz falseando los resultados.

Luego de la exposición al reactivo, las simientes se lavan, se mantienen mojadas (colocadas sobre un papel de filtro humedecido o directamente en agua).

Estudiar individualmente bajo lupa binocular (etapa 4).

En todos los casos es conveniente controlar la tinción de las semillas al cumplirse el período de exposición a la droga y no enjuagarlas sino alargar ese período si se observa que la mayoría de ellas no han logrado una coloración uniforme.

La viabilidad de cada semilla se determina por comparación de su coloración con un patrón de tinción, considerando los siguientes aspectos:

- Tamaño de la región coloreada.
- Intensidad de la coloración.
- Presencia o ausencia de manchas irregularmente distribuidas.

Criterio general para evaluar la viabilidad de las semillas.

Semillas viables:

- Embrión completamente teñido de rojo.
- Embrión teñido de rojo a excepción de la porción terminal de la radícula (no mas de 1/3 medido desde el extremo radicular.
- Embrión teñido de rojo, con pequeñas áreas sin teñir sobre los cotiledones (menos de la mitad de los cotiledones sin colorear).

- Embrión coloreado, a excepción de los extremos del escudete, en las Gramíneas.

Semillas no viables:

- Embrión sin teñir.
- Embrión teñido completamente de rosa.
- Eje embrionario teñido solo en sus dos terceras partes.
- Área de inserción de los cotiledones sobre el eje embrionario sin teñir.
- Presencia de manchas rojas anormalmente oscuras.

La intensidad del color depende de cuán activa es la solución preparada y de la tasa de liberación de iones hidrógenos por las enzimas deshidrogenasas que intervienen en la respiración de las células.

La temperatura favorece la velocidad de reacción: en un rango de 15 a 45 °C cada aumento de 5 °C significa duplicar la tasa de reacción.

No se debe superar los 45 °C durante el ensayo, o las células morirán.

Para cada repetición se calcula el porcentaje de semillas viables. Las diferencias máximas admitidas son las mismas que para el ensayo de poder germinativo.

El porcentaje medio es redondeado al número entero mas próximo.

El resultado se expresa en porcentaje de semillas viables.

No es válido para semillas que hayan iniciado el proceso de germinación, ni para las tratadas con fungicidas. Solo pone de manifiesto la potencialidad germinativa de las semillas, sin evaluar la influencia de los factores agroclimáticos, de nutrición, de dormición o agentes patógenos que puedan intervenir en el proceso de la

germinación y nada se puede inferir sobre la eventual respuesta de las simientes frente a ellos.

Preparación de la solución.

Reactivos:

Para la preparación de 500 ml. de solución al 0,5% se necesitan:

- 500 ml. de agua destilada.
- 2,5 g. de sal de tetrazolio.
- 1,81 g. de fosfato monopotásico anhidro, KH_2PO_4.
- 3,56 g. de fosfato disódico dihidratado, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$.

Procedimiento:

Solución 1

En un vaso de precipitación de 500 ml. colocar 1,81 g. de fosfato monopotásico anhidro.

Agregar 200 ml. de agua bidestilada.

Agitar con varilla de vidrio.

Solución 2

En un vaso de precipitación de 500 ml. colocar 3,56 g. de fosfato disódico dihidratado.

Agregar 300 ml. de agua destilada.

Disolver.

Trasvasar esta solución al vaso de precipitación que contiene la solución 1.

Agitar con varilla de vidrio.

Incorporar a esta solución tampón, 2,5 g. de sal de tetrazolio.

Mezclar bien con varilla de vidrio, hasta su total disolución.

El pH óptimo de la solución debe situarse en 6,5 - 7,0 para asegurar una coloración normal.

Colocar esta solución en un frasco color caramelo.

Recomendación: usar agua destilada hervida durante 15 minutos y dejar enfriar tapada para obtener un pH neutro de la solución aun cuando no se cuente con la solución tampón.

Conservar la solución en la heladera a 7 - 10 °C, en la oscuridad, así como las sales.

Cabe mencionar que en los casos que se recomienda utilizar una solución al 1 %, los resultados experimentales han revelado una *muy buena tinción con la solución al 0,5 %,* cuyo uso significa un claro ahorro en el gasto de la droga, que es muy cara. Inclusive se está usando con éxito la concentración de 0,1 %.

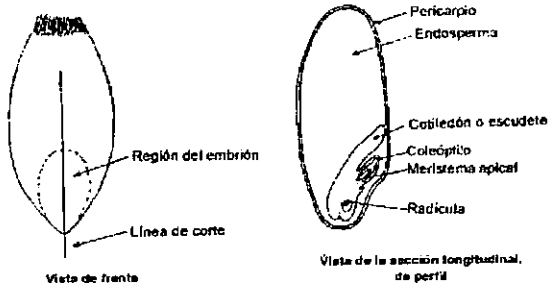
La cantidad de solución que se prepara, dependerá del volumen de trabajo previsto: es conveniente preparar pequeñas porciones (de 100 a 200 ml.) y renovarlas frecuentemente.

Aplicación de la prueba a las semillas de mas importancia.

TRIGO.

Etapa 1: remojar las semillas en agua o entre papeles de filtro humedecidos, durante 6 - 18 horas, a temperatura ambiente.

Etapa 2: cortar longitudinal y parcialmente el cariopse a través del embrión, llegar hasta ¾ partes del endosperma, mantener las partes humedecidas.



Etapa 3: teñir en solución de tetrazolio al 0,5 % durante 2 - 4 horas, a la temperatura de 30°C, en oscuridad.

Etapa 4:

Lavar bajo corriente de agua no violenta.

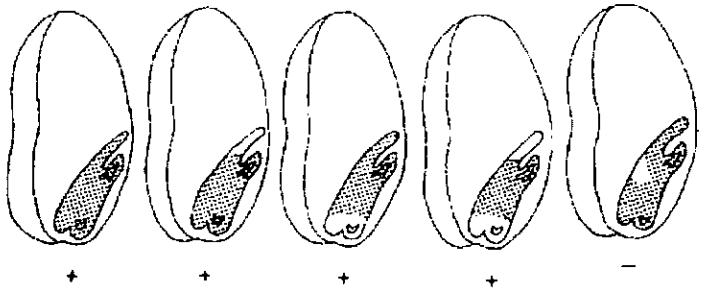
Observar y estudiar bajo lupa binocular, las dos superficies cortadas.

Evaluar: las semillas viables tienen el embrión teñido.

Se permite presentar como máximo de tejido necrótico o no coloreado la región radicular, a excepción de dos raicillas iniciales, y hasta 1/3 de los extremos del escutelo.

La presencia de tejido muerto en el centro del cotiledón significa daño por calor o recalentamiento de la semilla, es considerada no viable.

A continuación se detalla el **patrón de tinción** para las semillas viables y las semillas con daños por calor.



Modificación del procedimiento anterior:

Acortar la *etapa 1* (sumergir las semillas en agua durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente) y cambiar la *etapa 3* (colocar los granos cortados en solución de tetrazolio durante 2 - 3 horas, a 35-37°C en oscuridad).

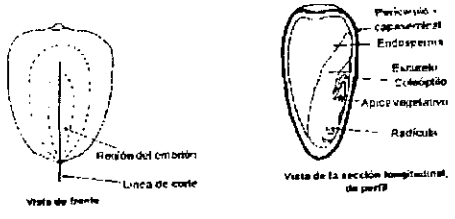
La exposición de las semillas a la droga a la temperatura mas alta permite una muy buena tinción. Todas las etapas restantes siguen igual.

Si no se cuenta con una estufa a 35-37°C se logra un microclima adecuado colocando la preparación bajo el calor de 2 lámparas de mesa con un termómetro para controlar la temperatura.

La oscuridad se logra encerrando la muestra en una caja y envuelta en papel de aluminio. La exposición será mas larga (4-5 horas, a veces 8-10 horas).

MAÍZ.

Etapa 1: remojar los granos durante 4-6 horas a temperatura ambiente, o entre papeles de filtro humedecidos, durante 16-18 horas, a 25°C, o a temperatura ambiente.



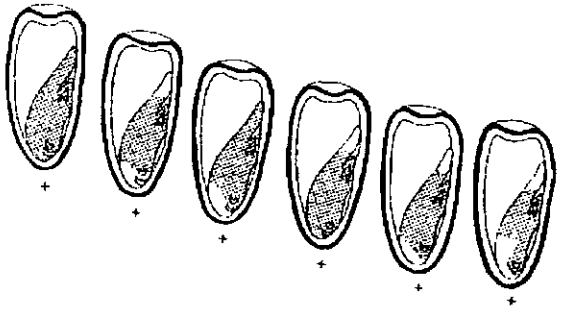
Etapa 2: cortar longitudinalmente el cariopse a lo largo del embrión y de la mayor parte del endosperma, sin separar las dos mitades, las cuales serán mantenidas húmedas.

Etapa 3: colorear en la solución de tetrazolio al 0,5 ó 1 % durante 2-6 horas, a 30-35°C, en oscuridad.

Etapa 4:

- lavar con agua,
- "lectura" de las dos superficies de cada semilla y evaluar.

Son viables los embriones totalmente teñidos, o los que presentan no teñidas pequeñas áreas de la radícula y/o 1/3 de los extremos del escutelo, según los siguientes patrones:



Todos los demás casos de coloración significan semillas no viables.

CEBADA, CENTENO, AVENA.

Las normas ISTA (Asociación Internacional de Ensayos de Semillas), citadas para el estudio de la viabilidad en el trigo sirven también para semillas de **cebada** (*Hordeum vulgare*), **centeno** (*Secale cereale*), **avena** (*Avena spp.*), asimismo los patrones de coloración descritos.

La metodología aplicada normalmente para avena implica:

Etapa 1: sumergir los granos en agua durante 5 horas a temperatura ambiente.

Etapa 2: cortar longitudinal e incompletamente los antecios, con glumelas.

Etapa 3: exponer los antecios a la droga al 0,5% durante 2-3 horas, a 35-37°C, en oscuridad.

Etapa 4: evaluar las dos mitades de cada embrión.

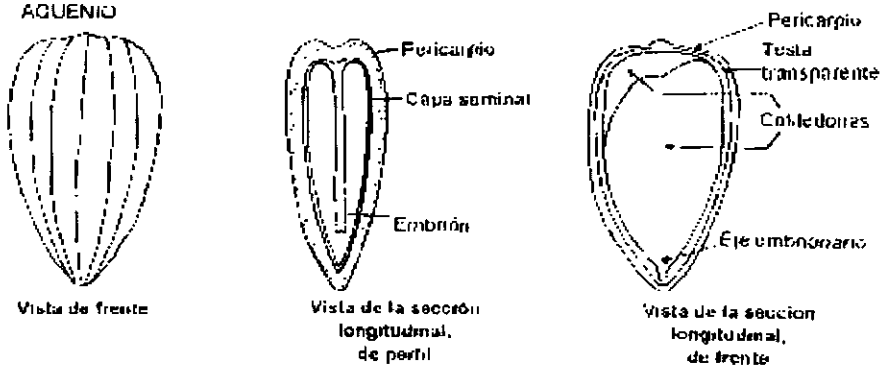
SORGO.

El procedimiento descrito para cariopses de maíz es válido también para granos de sorgo (*Sorghum spp.*). Igual es la interpretación de los patrones de tinción.

GIRASOL.

Las reglas ISTA para el tratamiento del girasol (*Helianthus annuus)* prescriben:

Etapa 1: sumergir los aquenios en agua o colocarlos entre papeles de filtros humedecidos, durante 18 horas.

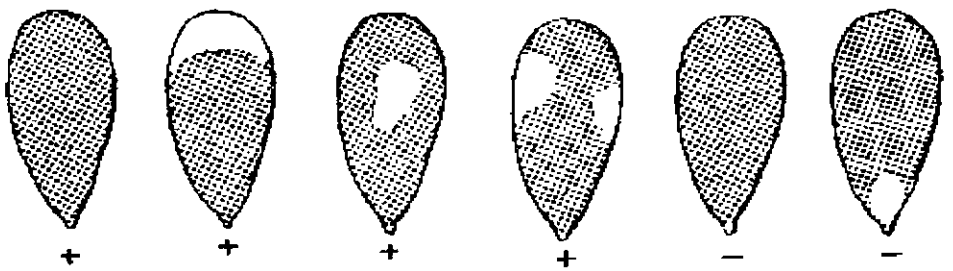


Etapa 2: eliminar luego tanto el pericarpio como la membrana transparente de la semilla (atención de no dañar los tejidos embrionarios). Mantener los embriones húmedos o en agua durante esta operación.

Etapa 3: colocar los embriones desnudos en la solución al 0,5 ó 1% de tetrazolio, durante 3-6 horas, a 30°C, en oscuridad.

Etapa 4: lavar y cortar cuidadosamente en sentido longitudinal a lo largo del eje embrionario; evaluar las superficies cortadas. Se admiten como semillas viables las

que presentan no coloreado como máximo 1/3 de la radícula medida desde la punta y/o 1/3 de los cotiledones, en la región opuesta a su punto de inserción con el eje raíz-hipocótilo.



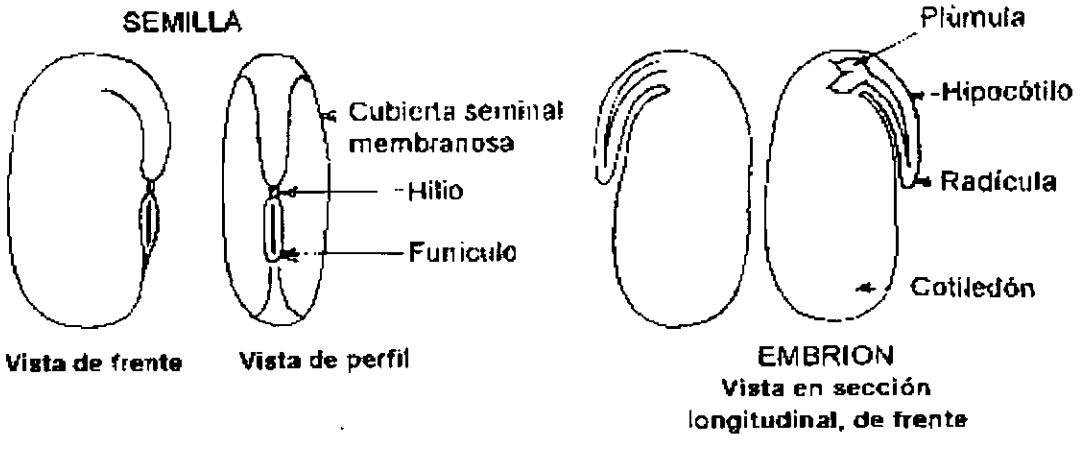
La experiencia indica que la tinción en droga al 0,5% a 35-37°C durante 2 horas, en oscuridad (*etapa 3*), es muy efectiva y por eso es usada por muchos analistas.

Se recomienda cuidar particularmente la remoción total de la capa seminal pues impide la penetración de la droga en aquellas áreas del embrión donde queda adherida (es transparente y, por tanto, pueden quedar porciones de ella sobre el embrión que no se detectan fácilmente).

SOJA.

Etapa 1: acondicionar las semillas entre papeles humedecidos durante 18 horas, a temperatura ambiente.

Luego por lo menos 2-3 horas en agua (el humedecimiento es lento y la sumersión en agua asegura una imbibición completa).



Etapa 2: si se está en presencia de semillas **duras**, incidir o pinchar la capa seminal y po

ner a remojar durante 4-6 horas.

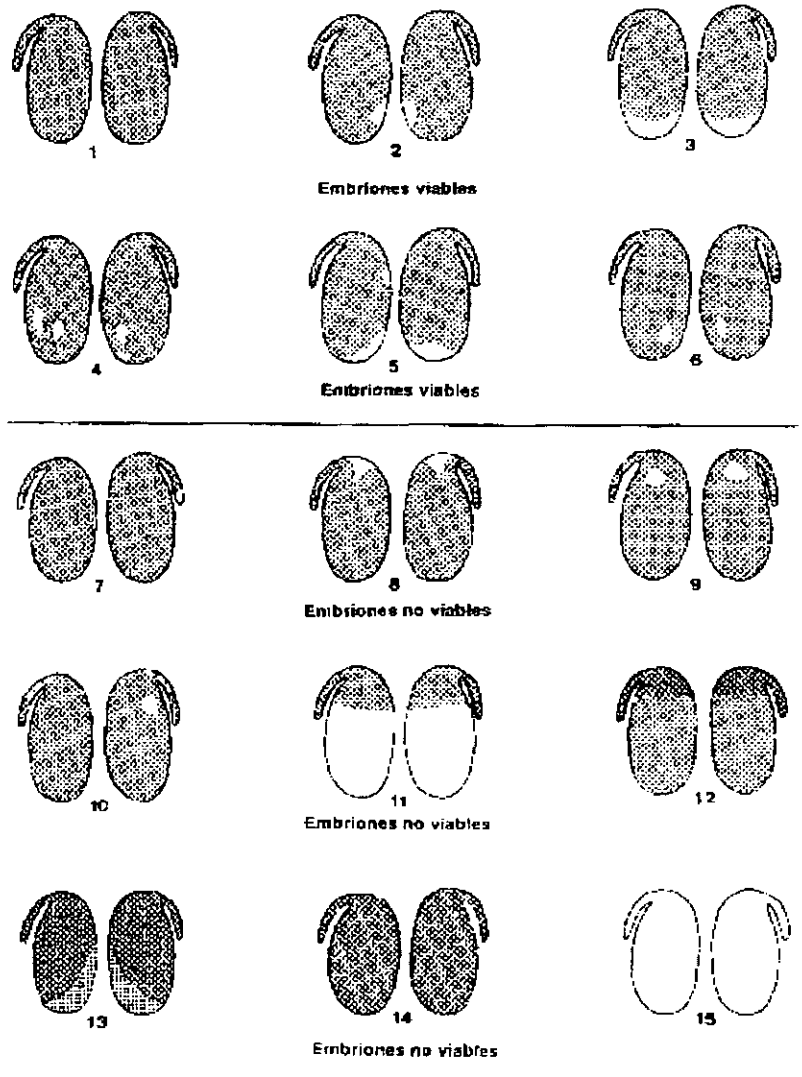


Figura 44. Patrón de tinción y de evaluación de embriones de soja tratados con tetrazolio. **(1)** Embrión viable, completamente teñido de rojo. **(2-5)** Embrión viable: pequeñas áreas de los cotiledones sin colorear. **(6)** Embrión viable: el extremo de la radícula y pequeñas áreas de los cotiledones sin teñir. **(7)** Embrión NO viable: más de 1/3 del extremo de la radícula sin colorear. **(8)** Embrión NO viable: región de inserción de los cotiledones sobre el eje embrionario sin teñir. **(9)** Embrión NO viable: región de la plúmula no teñida. **(10)** Embrión NO viable: región superior del eje embrionario con manchas. **(11)** Embrión NO viable: más de la mitad de los cotiledones sin colorear. **(12-13)** Embrión NO viable: eje embrionario y base de los cotiledones o más superficie cotiledonar de color rojo lechoso, rojo borravino. **(14)** Embrión NO viable: embrión totalmente teñido de rojo intenso. **(15)** Embrión NO viable: embrión sin coloración alguna, blanco.

Etapa 3: colocar las semillas humedecidas en una solución de tetrazolio al 0,5-1% durante 6-24 horas.

Etapa 4: enjuagar las semillas.

Remover la capa seminal membranosa.

Cortar longitudinalmente el eje embrionario hasta los cotiledones. Evaluar.

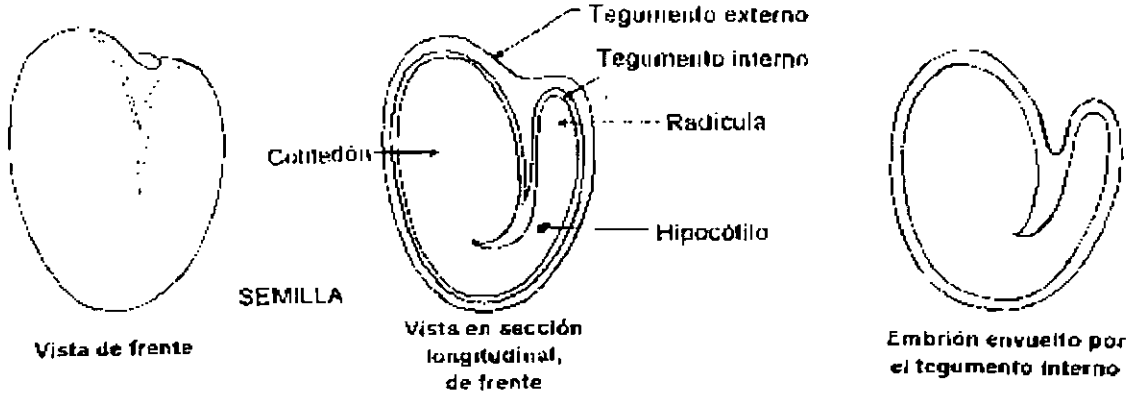
Son viables las semillas que presentan no teñido hasta 1/3 de la radícula, medida desde su extremo, y/o hasta la mitad de los cotiledones medidos desde el extremo opuesto a su inserción sobre el eje embrionario, o lateralmente.

La evaluación de la semilla implica también la observación de la plúmula y de la yema apical. Su coloración óptima será de un tono rosado homogéneo, al igual que la superficie interna de los cotiledones que los encierra.

ALFALFA, TRÉBOLES, LOTUS.

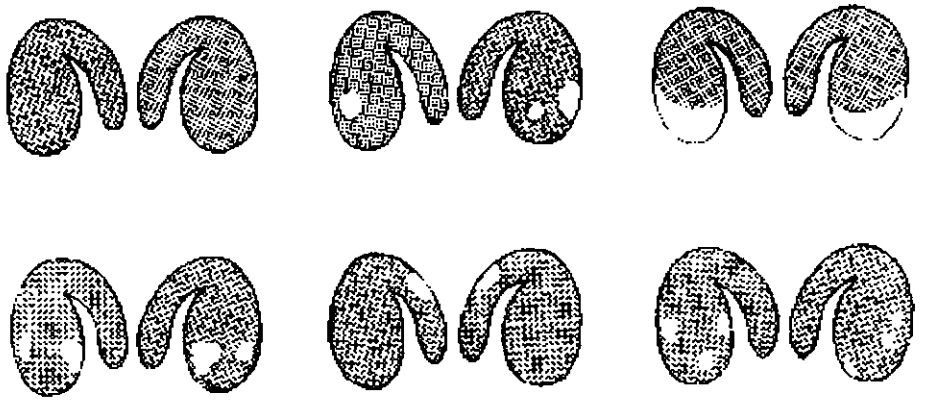
Etapa 1: remojar las semillas en agua durante 4-6 horas o colocarlas entre papeles de filtro humedecidos durante 16 horas, a 25 °C.

Etapa 2: incidir las semillas *duras* en el extremo opuesto a la radícula, luego colocarlas de nuevo en agua durante 2-4 horas.



Etapa 3: colocar las semillas embebidas en una solución de tetrazolio al 0,5%, durante 4-6 horas, a 30°C, en oscuridad.

Contabilizar como semillas duras las que permanecen sin absorber agua.



Etapa 4: lavar.

Eliminar el tegumento para poner de manifiesto el embrión.

Evaluar.

Son viables los embriones totalmente teñidos, a excepción de la punta de la radícula (1/3 de su longitud medida desde su extremo) y/o pequeñas áreas hasta 1/3 de los

cotiledones, en la región opuesta a su inserción con el eje embrionario, o lateralmente.

También se admite como viable el embrión con pequeñas áreas sin teñir en la parte superior del eje embrionario.

CAPITULO N° 6.

Ensayos rápidos de viabilidad.

Introducción.

Las pruebas rápidas dan información sobre los daños ocasionados en los granos por problemas mecánicos o mal trato asociados al manejo post-cosecha.

Estos ensayos, permiten obtener en breve tiempo datos sobre la incidencia de los daños en la viabilidad de las semillas en fase de acondicionamiento. La correcta interpretación permite realizar estudios sobre la posibilidad de introducir cambios y/o ajustes en la maquinaria a fin de asegurar la integridad de los granos. Su valor es orientativo; de ninguna forma sustituyen el análisis riguroso de la capacidad germinativa en el laboratorio.

Ensayos.

1.- Prueba del "naftol blue black". (para maíz).

Daños en el pericarpio o en el embrión de maíz pueden ser detectados con esta prueba.

- Preparación del colorante

En un vaso de precipitación de 500 ml. adicionar 5,0 g. de naftol pesados en balanza analítica.

Agregar 500 ml. de agua destilada.

Mezclar con varilla de vidrio.

Guardar en frasco color caramelo.

Esta solución es un colorante que penetra internamente en los tejidos a través de lesiones y los tiñe.

EVITAR ASPIRAR el polvo de naftol y EVITAR EL CONTACTO de la piel con la solución preparada.

- ***Tinción***

Cubrir 400 semillas con la solución.

Dejar reposar **30 segundos.**

Retirar el liquido (que puede ser reutilizado).

Lavar repetidamente con agua.

Distribuir las semillas sobre papel de filtro o papel secante para su estudio.

- ***Lectura***

El área teñida del cariopse y su extensión ponen en evidencia la gravedad del daño producida. Reconocemos tres casos:

- grano con daño grave, cuando presentan manchas que interesan al embrión o el área alrededor de él.
- grano con daño menor, cuando se tiñe la "corona", es decir la parte periférica del cariopse en la región del endosperma. Este daño quita calidad a las semillas y afectará la germinación dependiendo de la magnitud de la ruptura.
- materia inerte, cuando se tiñen fragmentos de cariopses de tamaño inferior a la mitad.

2.- Prueba del verde rápido.

Es una prueba simple y no requiere sustancias peligrosas. Además, la coloración en baja concentración no es tóxica para el embrión, por lo cual las semillas teñidas pueden ser puestas a germinar para comparar los resultados en base a los daños registrados.

Sirve para detectar lesiones en el pericarpio de las semillas de maíz y en la capa seminal en leguminosas de semillas pequeñas (Lotus, alfalfa, tréboles).

No se recomienda para soja.

- ***Preparación del colorante***

Se usa una solución al 0,1 %.

En un vaso de precipitación de 500 ml. agregar 0,5 g. de oxalato verde de malaquita (polvo verde rápido o "fast green") pesados en balanza analítica.

Agregar 500 ml. de agua destilada.

Mezclar con varilla de vidrio.

- ***Tinción***

Colocar 4 repeticiones de 100 semillas en 4 recipientes de tamaño adecuado al tamaño de las semillas.

Cubrir completamente con la solución, revolviendo durante los primeros 30 segundos.

Dejar reposar 2 minutos.

Retirar la solución (la que puede ser recuperada para ser usada de nuevo, si no conserva residuos).

Enjuagar cuidadosamente bajo agua corriente.

Extender las semillas sobre papel absorbente.

- ***Lectura***

Toda lesión, ruptura o craqueado se evidencian porque se tiñe de verde.

La gravedad del daño depende de la ubicación y de la extensión de la mancha, tal como se vió anteriormente.

Un porcentaje de daños del 30 a 50 % en el pericarpio en maíz debe alertar en el manejo de los granos.

Un lote de maíz con más del 50 % de daños debe ser descartado pues habrá pérdidas significativas en el rendimiento, aunque la semilla haya sido tratada con fungicida.

3.- Prueba del cloruro férrico.

Sirve para estimar daños por injurias mecánicas en semillas de leguminosas. Permite el ajuste de maquinarias a fin de reducir el daño en el manejo de las simientes. Vale para soja, poroto, alfalfa, tréboles y leguminosas en general.

- ***Preparación del colorante***

Moler el cloruro férrico ($FeCl_2$) en un mortero de ágata hasta pulverizarlo.

En un vaso de precipitación de 500 ml. colocar 20,0 g. de cloruro férrico pesados en balanza analítica.

Agregar 100 ml. de agua destilada.

Mezclar con varilla de vidrio.

Añadir media cucharadita de detergente líquido.

Mezclar nuevamente.

- Tinción.

Contar 4 repeticiones de 100 semillas.

Poner en 4 recipientes adecuados.

Cubrir completamente con la solución.

Empujar las semillas al fondo si quedan flotando (las pequeñas).

Separar las semillas que se colorean de negro **desde 5 minutos hasta 15 minutos,** después de adicionar la solución. NO separar semillas más allá de ese tiempo.

En alfalfa se ve muy bien la tinción negra del tegumento dañado.

En soja la mancha es de color marrón, con arrugas en la capa seminal. En poroto cv. Painé el color variegado de la testa puede confundir en la evaluación.

En todos los casos, lo importante es valorar si las manchas interesan áreas vitales del embrión y en que extensión.

Semillas totalmente teñidas están muertas o desarrollan en plántulas anormales.

Calcular el porcentaje de tipos de daños según lo visto en la prueba de naftol blue black (para maíz).

4.- Prueba de inmersión en lavandina.

Sirve para determinar el porcentaje de semillas dañadas internamente. Por lo tanto NO se aplica a lotes de semillas que presentan daños profundos en el tegumento seminal.

Es útil para conocer el efecto del manipuleo a campo durante la cosecha, o durante el acondicionamiento, en soja, poroto y posiblemente en otras dicotiledóneas de semillas grandes (garbanzo y arveja).

- Preparación de la solución.

Medir en una probeta graduada de 1000 ml. 950 ml. de agua destilada.

Trasvasar a un vaso de precipitación de 1000 ml.

Agregar 50 ml. de hipoclorito de sodio.

Mezclar con varilla de vidrio.

Esta solución puede ser usada un máximo de 3 veces.

- Tinción.

Contar al azar 4 repeticiones de 100 semillas.

Colocar cada repetición en un frasco adecuado.

Cubrir con solución de agua lavandina.

Esperar **10 a 15 minutos, NO MAS.** Después de ese lapso las semillas sanas también experimentan imbibición, alterando los resultados de la prueba.

Volcar el líquido y distribuir las semillas sobre papel absorbente.

-Lectura.

Contar las semillas hinchadas en cada repetición (se formará una burbuja de aire entre el embrión y el tegumento).

Calcular el porcentaje.

Un valor superior al 10 % indica falta de ajuste en la cosechadora en el campo.

En una planta clasificadora es conveniente calcular el porcentaje de semillas hinchadas antes y después de las operaciones de limpieza, para detectar el daño causado por el equipo.

En el caso de semillas de soja y poroto, el mismo resultado se puede obtener utilizando solamente agua en lugar de lavandina.

CAPITULO N° 7.

Ensayos de vigor.

Introducción.

El ensayo de germinación es el criterio principal y el mas aceptado para estudiar la viabilidad de las semillas.

Este test apunta a determinar la potencialidad de los lotes de semillas para desarrollar plántulas normales y producir una implantación rápida y homogénea del cultivo.

La elaboración del concepto de vigor se ha basado en dos ideas fundamentales:

- Vigor "per se" de una semilla, en términos de velocidad de crecimiento y de tamaño de plántula alcanzado.
- Susceptibilidad a condiciones de siembra no favorables.

El ISTA (International Seed Testing Association), encontró consenso para la definición de vigor según los siguientes términos: "el vigor de las semillas es la suma de aquellas propiedades que determinan el nivel potencial de actividad y de perfomance de la semilla o de un lote de semillas durante la germinación y la emergencia de plántulas. Las semillas con buen comportamiento serán denominadas de *alto vigor*, las de perfomance pobre serán llamadas de *bajo vigor*".

Otros consideran que el vigor de las semillas "comprende todas aquellas propiedades que determinan su potencialidad para una emergencia rápida y

uniforme, y para el desarrollo de plántulas normales bajo una amplia gama de condiciones".

El vigor es una cualidad sumamente compleja que está determinada por muchos factores intrínsecos, entre los cuales se han reconocido los siguientes como los más importantes:

- **Constitución genética:** el genotipo de la semilla establece su máximo potencial fisiológico.
- **Condiciones ambientales y nutrición de la planta madre:** éstas influyen en el peso, tamaño y densidad de las semillas.
- **Estado de madurez a la cosecha**: es en el estado de madurez fisiológica que la semilla alcanza la máxima expresión potencial de su vigor, que se manifiesta también en el tamaño, peso y densidad de las semillas.
- **Integridad física:** el vigor de las semillas es inversamente proporcional al grado de daño mecánico; las fisuras y daños en la capa seminal son puertas de entrada de agentes patógenos.
- **Deterioro y envejecimiento:** desde el momento de alcanzar la madurez fisiológica, las semillas empiezan a envejecer, aún permaneciendo en la planta madre. El deterioro sigue irreversiblemente hasta la muerte de todas las células. La tasa de deterioro, que incluye pérdida de vigor y por último de capacidad germinativa, está determinada por el genotipo, por las circunstancias que acompañan la formación de la semilla y los factores externos involucrados en su manejo (cosecha y post-cosecha).

- **Presencia de patógenos**: pueden alojarse en el interior de las semillas, habiendo desarrollado en la planta madre o pueden ingresar a ellas después de su formación.

Un solo test es insuficiente para indagar en forma consistente la potencial perfomance a campo de los lotes de semillas.

La mayoría de los laboratorios implementa una serie de test de vigor, 3 o 4 en general, complementarios en cuanto evalúan parámetros distintos asociados a la calidad de las semillas. Características específicas propias de ellos deben ser: *reproductibilidad; rapidez; objetividad; simplicidad; practicidad; bajo costo.*

ENSAYOS DE VIGOR DIRECTOS.

Las pruebas de vigor directas reproducen en el laboratorio las condiciones a campo. Los factores de estrés que se supone reducen la emergencia a campo son impuestos bajo condiciones controladas en el laboratorio (test de Hiltner, test de frío). Todos los ensayos de vigor se realizan con semillas tomadas de la fracción "semilla pura".

1.- Test de Hiltner.

En este ensayo de vigor las simientes son sometidas a un efecto de estrés hídrico y de resistencia mecánica a la emergencia. Este método evidencia la merma en la viabilidad de los granos causados por agentes físicos (frío), químicos (exceso de fungicidas), desgrane o germinación anticipada.

Para trigo y cebada se procede de la siguiente manera:

Analizar 400 semillas. En 4 repeticiones de 100 semillas.

Utilizar como sustrato partículas de ladrillo triturado de 2-3 mm. de tamaño, tamizadas, lavadas y esterilizadas.

Embeber con agua: 1.100 g. de grava se humedecen con 250 ml. de agua.

Dejar reposar 1 hora.

También se puede usar arena de grano gueso, de 2-3 mm. de tamaño, lavada y esterilizada antes de cada ensayo.

Usar cajas de germinación de metal, cinc o plástico transparente, de tamaño adecuado para sembrar 50 semillas en cada una.

Disponer en el fondo de las cajas, como lecho germinativo una capa de 3 cm. de espesor de ladrillo picado húmedo.

Colocar por encima 100 semillas (usar una pinza, no tocarlas con los dedos para evitar toda contaminación).

Recubrir las semillas con otra capa de ladrillo humedecido de 3-4 cm. de alto.

Cerrar las cajas con sus tapas.

Guardar en cámaras de germinación a 20 °C, sin luz, de 10 a 14 días.

Controlar y evitar que el sustrato se seque.

Para romper la dormición se sugiere prerrefrigeración a 5-10 °C durante 5 días, antes del tratamiento.

Evaluar las plántulas, se tendrá en cuenta lo siguiente:

- Plántulas normales emergidas.

- Plántulas normales no emergidas.
- Plántulas anormales.
- Semillas muertas.

El porcentaje de plántulas normales emergidas indicará el lote de alto vigor.

Las plántulas normales que no logran emerger, es decir que no superan la barrera mecánica ofrecida por la grava, indicarán semillas de bajo vigor (también expresado en porcentaje).

Para trigo se admite un valor mínimo de 80 % de plántulas normales emergidas como nivel de buen vigor.

La suma de los porcentajes de las plántulas normales emergidas y no emergidas conformará el poder germinativo del lote.

Este ensayo es útil para detectar lotesde semillas de bajo vigor causado por microorganismos.

Se usa para cereales (trigo, maíz y cebada), leguminosas (soja, treboles y maní), hortícolas (zanahoria, espinaca y remolacha azucarera).

2.- Ensayo de frío (cold test).

2.a.- cold test "en bandejas" (o cajas).

Por medio de este test la semilla es sometida a condiciones de estrés debido a la acción combinada de las bajas temperaturas y de patógenos.

Los resultados correlacionan positivamente con los obtenidos con la emergencia a campo. Lo mas importante del método es calibrar bien la humedad del sustrato, a partir de su máxima capacidad de retención de agua.

2.b.- cold test con rollos de papel + suelo (método de viena)

Es un método alterno, aplicado inicialmente a maíz, que economiza la cantidad de suelo y de espacio requeridos en el test aumentando la eficacia real del laboratorio. En esa metodología se siembran las semillas en rollos de papel secante y suelo. Para ello es conveniente contar con el siguiente material:

- Una lámina de plástico, de 60 x 50 cm por lo menos, sobre la cual se apoya el sustrato para preparar los rollos.
- Papel de filtro o papel secante cortado en tiras de 58 x 15 cm.
- Un rectángulo de 60 x 19 x 0,6 cm, con una ventana central de 55 x 12,5 cm, de acrílico; éste será el marco dentro del cual se acomoda el sustrato de tierra.
- Tabla contadora de 50 x 15,5 cm, con orificios de 15-20 mm de diámetro, de acrílico para acomodar las semillas sobre el sustrato.
- Bandejas de plástico de por lo menos 30 x 40 x 20 cm, donde se guardan los rollos. El fondo debe ser acanalado por donde se despliega el sistema radicular de las plántulas.
- Papel secante o de filtro.
- Suelo proveniente de un campo cultivado con la misma especie que se está analizando.

Preparación de los rollos:

◊ Apoyar sobre la base de plástico reticulado 2 tiras de papel secante mojadas en agua y escurridas.

◊ Sobre las tiras ubicar el rectangulo de acrílico o madera. rellenar con el suelo ya humedecido y retirar el rectángulo.

◊ Apoyar encima del sustrato el contador de semillas, depositar en cada orificio una semilla, con el embrión dirigido hacia abajo; retirar el contador y presionar suavemente los granos en su lecho.

◊ Tapar el lecho germinativo con 2 tiras de papel humedecidas y escurridas, enrollar sin apretar, guardar los rollos en posición vertical en las bandejas de plástico con fondo acanalado.

Se analizan 4 repeticiones de 50 semillas cada una. Lo demás se realiza según el cold test tradicional (en frío a 10 °C, sin luz, durante 7 días, luego germinación a 25 °C, 6 días, con 8 horas de luz diarias).

La evaluación de las plántulas desarrolladas en rollos de papel-suelo o rollos de papel-compost se realiza según criterio muy ajustado en el cual se impone una severidad mayor que en la clasificación de las plántulas obtenidas de semillas sembradas en suelo.

Para maíz se realiza la siguiente clasificación:

PLANTULAS CON VIGOR.

Grupo 1: Plántulas normales, fuertes.

Grupo 2: Plántulas normales, fuertes, pero con menor desarrollo con respecto al grupo 1, o con leves imperfecciones (raices cortas, extremidades de las hojas fragmentadas, coleóptilo levemente dañado, mesocótilo moderadamente enrollado).

PLANTULAS SIN VIGOR.

Grupo 3: Plántulas normales, pero debilmente ahiladas o cortas, con pocas raices laterales presentes; plántulas robustas, gruesas, con desarrollo desproporcionado.

Grupo 4: Plántulas clasificadas como anormales.

Grupo 5: Semillas muertas.

La metodología (rollo + compost y demás condiciones) usadas en maíz es válida para girasol, variando solo la temperatura de germinación (20 °C).

Tambnién puede ser usado en sorgo, arvejas y habas.

La metodología usada para sorgo es la siguiente: siembra de 50 semillas por caja, a 10 °C durante 7 días en oscuridad, que son transferidas luego a 25 °C durante 5 días sin luz. Se registran las plántulas normales emergidas.

2.c.- Cold test con rollos de papel sin suelo.

Introducción.

La variación del sustrato suelo de región en región es un obstáculo para la estandarización del método. De allí el interés en desarrollar técnicas con compost, o directamente usando un medio inerte como vermiculita, toallas de papel o papel de filtro, y evaluando como único factor ambiental adverso la baja temperatura.

Trigo.

Acondicionar la semillas en rollos de papel humedecidos y envueltos en bolsitas de polietileno, a 5°C, durante 7 días, en oscuridad.

Llevar a germinación a 20°C durante 4 días, con 8 horas de luz diarias. Para registrar los resultados se aplican los criterios de evaluación del ensayo de germinación estándar.

Las semillas que originan plántulas normales son consideradas con vigor según la siguiente escala:

◊ Poder germinativo > 80 % : ***semillas con vigor alto.***

◊ Poder germinativo entre 70 y 80 % : ***semillas de vigor mediano***

◊ Poder germinativo < 70 % : ***semillas de vigor bajo.***

Maíz.

Ubicar 50 semillas sobre una hoja doble de papel toalla humedecido, orientadas con su punto de inserción de la mazorca hacia abajo.

Cubrir con otra hoja de papel toalla humedecida.

Acondicionar cada rollo y envolver en una bolsa de polietileno transparente.

Todos los rollos (4 x 50 semillas) de una muestra son mantenidos en oscuridad en heladera a 8°C durante 7 días.

Llevar luego a cámara de germinación a 25°C durante 6 días con luz. La evaluación de las plántulas desarrolladas toma en consideración el tamaño del coleóptilo, puesto que la falta de suelo se traduce en mayor efecto del frío y en menor nutrición de las plántulas, experimentando éstas crecimiento mas lento que con las otras pruebas de frío.

Por lo tanto, se consideran plántulas normales con una longitud mínima del coleóptile de **10 mm**, si las demás características son normales. La hoja primaria no logra sobresalir del coleóptilo por falta de alargamiento durante el tiempo de ensayo, pero la plántula es considerada normal.

El poder germinativo está dado por el porcentaje de plántulas cuya longitud es de 10 a 25 mm. Plántulas con coleóptilos > a 25 mm son consideradas con vigor.

ENSAYOS DE VIGOR INDIRECTOS.

En estos ensayos las características fisiológicas de las semillas, medidas en el laboratorio, son relacionadas con el comportamiento a campo.

1.- Ensayo de velocidad de germinación.

Aquí la velocidad de germinación se calcula realizando recuentos de las plántulas normales, desarrolladas en sucesivos tiempos durante el ensayo de germinación estándar, y dividiendo el número de plántulas **nuevas** registradas en cada recuento por el número de días de ensayo correspondiente a ese recuento, desde la fecha de siembra.

Los valores obtenidos en cada recuento son sumados al final del test de germinación para calcular la velocidad de germinación (VG).

El número total de semillas sembradas debe ser el mismo en todas las pruebas (4 x 100 ó 4 x 50 semillas). Esto se resume con la siguiente fórmula:

$$VG = \sum \left(\frac{n_i}{\sum t_i} \right)$$

siendo:

n_i = número de plántulas registradas en el intervalo de tiempo t_i,

$\sum t_i$ = período desde la siembra hasta t_i.

A mayor velocidad de germinación, mayor vigor.

Este dato se muestra válido para la evaluación comparativa del vigor en diferentes cultivares, o distintos lotes dentro de los cultivares, aplicándoselo a soja, arroz y

forrajeras. Sin embargo, cabe recordar que variaciones de humedad o de temperatura durante el procesamiento pueden afectar los resultados.

Por otra parte, al requerir observaciones frecuentes (hasta diarias) para establecer la relación germinación-tiempo, esta metodología no es operativamente fácil de aplicar a muchas poblaciones seminales.

2.- Ensayo de envejecimiento acelerado.

En este test las semillas son sometidas a condiciones de humedad y de temperatura consideradas inadecuadas para la conservación de la viabilidad.

Pone de manifiesto una estrecha correlación entre la germinación posterior al envejecimiento y la emergencia a campo en condiciones desfavorables.

Usar cámaras de envejecimiento o "minicámaras" en cuyo interior se deben depositan las semillas que deben ser envejecidas.

Procesar estas semillas en un ensayo de germinación estándar.

Usar recipientes de vidrio o plástico, con tapa no metálica. Pueden ser rectangulares o cuadradas pues permiten alojar un elevado número de semillas por caja, distribuidas en una sola capa. Las medidas serían de 8 x 13 x 4,5 cm.

En el interior de la caja se coloca una canasta casi de las mismas dimensiones (7 x 12 x 1 cm.), construida manualmente con malla de bronce o de plástico la cual se suspende a 2 cm. sobre el nivel de agua.

Agregar a la caja 100 ml. de agua.

Colocar las semillas sobre la canasta, distribuidas en forma homogénea en una sola capa, pues si se disponen en distintos niveles y apretadas entre sí, el envejecimiento no va a ser uniforme, por absorber, las simientes, diferente cantidad de agua según su mayor o menor contacto con el vapor.

Cerrar las minicámaras con sus tapas. Disponer 100 semillas por caja y se procesan 200 semillas por muestra.

Llevar el conjunto a estufa a 40°C durante 72 hs. (soja), ó a 45°C durante 48 hs. (trigo), lográndose en el interior de la cámara una humedad cercana al 100 %.

Retir las cajas de la estufa y someter las semillas a las condiciones de germinación normal propias de cada especie, en 4 repeticiones de 50 semillas cada una.

Hacer el recuento anotando como semillas con vigor aquellas que producen plántulas normales.

Considerar nivel alto de vigor cuando se obtienen valores de poder germinativo de 70-75 % para trigo y 75-80 % para maíz y soja.

Para tener seguridad que dentro de la minicámara se alcanza la temperatura de envejecimiento recomendada, la temperatura externa a allá (es decir la del interior de la estufa) y la de la minicámara deben ser controladas con exactitud antes de comenzar el test.

Controlar también cuanto tiempo tarda la minicámara en lograr la temperatura deseada, para prolongar el ensayo en ese período. Para favorecer el ajuste rápido a la condición prescrita, es conveniente acondicionar la minicámara con agua caliente (50-60°C), en seguida poner las semillas y llevar a estufa.

Cuanto mayor sea la germinación de un lote después de un envejecimiento tanto mayor será el vigor y tanto mas largo será el período esperado para retener la viabilidad en almacenamiento.

3.- Complex Stressing Vigour Test.

Introducción.

El CSVT es un nuevo método desarrollado para evaluar el vigor en trigo y en maíz.

Se basa en un conjunto de condiciones de estrés hídrico durante los primeros 4 días de ensayo, que simulan la acción de desgaste de la naturaleza, seguido por una germinación con posición controlada de los cariopses y una evaluación de las plántulas.

Metodología

* **Período de estrés:**

1. Inmersión de las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,15 %.

A un vaso de precipitación de 1000 ml. agregar 1 litro de agua destilada medido con probeta.

Agrgar 1,5 ml. de hipoclorito de sodio medidos con pipeta graduada.

Mezclar con varilla de vidrio.

Poner 200 semillas en 250 ml.de solución.

Tiempo: 48 horas.

Temperatura: 20°C para trigo

25°C para maíz.

2. Ulterior inmersión:

Tiempo: 48 horas.

Temperatura: 2°C para trigo

5°C para maíz.

* **Período de germinación:**

1. Acondicionar los cariopses con la radícula del embrión orientada hacia abajo, ubicados en fila a lo largo de la línea media de un papel de filtro humedecido, y luego cubiertos con otro papel.

Cada unidad es plegada, enrollada y envuelta en una bolsita de polietileno.

50 semillas por rollo en trigo, 25 en maíz.

2. Germinación.

Disponer cada rollo verticalmente con los coleóptilos orientados hacia arriba, en una caja con fondo acanalado.

Llevar a estufa, germinador o cámara de germinación, 8 horas diarias de luz.

Tiempo: 96 horas.

Temperatura: 20°C para trigo.

25°C para maíz.

Humedad relativa: arriba de 70 %.

* **Evaluación de las plántulas de acuerdo con las Reglas Internacionales:**

a) Plántulas normales (N):

_ ALTO vigor: plántulas más largas que ¼ del promedio de las 5 más largas;

_ vigor MEDIO: plántulas más cortas que ¼ del promedio de las 5 más largas.

b) Plántulas anormales (son consideradas de vigor BAJO).

c) Semillas muertas.

4.- Ensayo al metanol.

Introducción.

El estrés por metanol es otro método indirecto que pone de manifiesto el vigor de las semillas.

La acción deletérea del alcohol se produce a nivel de las membranas celulares, ocacionando cambios en su organización molecular con alteración y hasta remoción de los fosfolípidos y desnaturalización parcial de las proteínas.

Esto conlleva una alteración de la permeabilidad selectiva de las membranas, depresión en la actividad respiratoria y desorden en el desarrollo ulterior de todo el embrión. Este ensayo presenta analogías con el ensayo de envejecimiento acelerado, pues ambos producen efectos fisiológicos de la misma naturaleza.

Métodología.

Poner las semillas (4 repeticiones de 100) entre papeles humedecidos (o en cámara húmeda) a temperatura ambiente durante 24-48 hs para permitir una imbibición lenta.

Trasladar a un recipiente con una solución de metanol al 15 % durante 2 horas (soja) o 4-5 horas (girasol) o al 20 % durante 1 hora (soja, girasol).

Preparar las soluciones mezclando 15 ó 20 partes de alcohol metílico líquido puro con 85 u 80 partes de agua común, respectivamente. Poner a germinar las semillas según las normas ISTA.

Las plántulas con vigor son las que presentan un poder germinativo > al 70 %.

Los tratamientos descritos se han revelado buenos predictores del comportamiento a campo para estas especies, pero diferentes tiempos de exposición de las semillas a

las soluciones generan valores de germinación significativamente diferentes de la emergencia a campo.

Se ha registrado además una caída sustancial de la germinación tratando las semillas con la solución al 20 % más allá de 1 hora, o con una concentración mayor.

Se recomienda este test como una alternativa válida al envejecimiento acelerado tanto en términos de procesamiento de calidad de semillas como paraestudios básicos de fisiología de la germinación.