

ANALISIS DE SEMILLAS¹

Karen M. Poulsen

1. INTRODUCCION

El objetivo del análisis de semillas puede ser variado:

Antes de la recolección:

- evaluar la cosecha; estimar la cantidad de cosecha.
- prueba de madurez; establecer el tiempo óptimo para la recolección

Durante el procesamiento:

- determinar la necesidad de postmaduración
- determinar la necesidad de secado
- determinar la necesidad de limpieza

Después del procesamiento:

- determinar si la semilla es adecuada para producción de plántulas
- determinar el potencial para la producción de plantas viables de un lote de semillas
- determinar la necesidad de tratamiento para romper la latencia
- determinar la densidad de siembra adecuada (kg de semillas por m o m²)
- determinar si la semilla es apropiada para almacenamiento
- determinar el precio y comercialización de la semilla

La información confiable sobre la calidad de la semilla es de gran importancia para operaciones tales como: la planeación de la recolección, procedimientos para el procesamiento, monitoreo de la calidad del producto, comercialización, almacenamiento y siembra. Por lo tanto, se necesitan métodos de análisis confiables y estandarizados, para asegurar resultados uniformes y replicables.

Los métodos descritos aquí se basan en normas establecidas por Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA).² El ISTA se creó en 1921 con el objetivo de estandarizar los análisis de semillas y facilitar el mercadeo internacional. Inicialmente las reglas se elaboraron solamente para semillas agrícolas, pero progresivamente se incluyeron muchas especies forestales. Aún si no existen prescripciones para muchas

¹ Trad. "Seed Testing". Humlebaek, Denmark. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-8. 35p. 1994.

² El ISTA es un ente intergubernamental, cuyos miembros son trabajadores individuales en semillas y estaciones de análisis de semillas. Algunas de estas estaciones tienen la autorización ISTA, para expedir oficialmente sus certificados. Estas estaciones han sido inspeccionadas y revisados sus procedimientos de análisis. El comercio de semilla forestal es limitado y ocasionalmente una certificación oficial del ISTA se utiliza para respaldar la calidad de semilla.

especies forestales tropicales, la mayoría de las reglas del ISTA se pueden aplicar con pequeñas modificaciones.

En el análisis de semillas forestales, las pruebas mínimas incluyen contenido de humedad, pureza, peso de semilla y porcentaje de germinación, ya que esta información será requerida por el usuario. El análisis antes de la recolección y durante el procesamiento, no se describe en las reglas del ISTA, algunas directrices se encuentran en Willan (1985), Barner y Olesen (1984) y Stubsgaard y Baadsgaard (1989).

Las reglas del ISTA se modifican con nuevo conocimiento y solicitudes de nuevos estándares. Cada tres años se revisan las reglas, las cuales están disponibles en:

ISTA Secretariat
Reckenholz, PO Box 412
CH-8046 Zurich, Suiza
Tel: 41 01 371 31 33
Telfax: 41 01 377 72 01
E-mail: istach@iprolink.ch

2. MUESTREO

2.1 Principios

Un requisito para análisis confiables de semillas es un procedimiento de muestreo que resulta de una muestra representativa. Si la muestra no representa bien al lote de semillas, los resultados del análisis no tienen valor y se vuelven innecesarios.

“El objetivo del muestreo es obtener una muestra de tamaño adecuado para los análisis, en el cual la probabilidad de un componente presente se determine sólo por su nivel de ocurrencia en el lote de semillas” (ISTA 1993).

Sin embargo, obtener una fracción del lote original que realmente represente todo el lote de semillas, no es fácil. Para obtener un verdadero panorama, es esencial que la muestra tomada sea representativa. Esto es posible únicamente utilizando métodos correctos y teniendo cuidado en todo el proceso. Por consiguiente, el muestreo es una operación de extrema importancia.

Si los componentes de un lote de semillas se distribuyeran uniformemente, sería suficiente tomar un puñado de semillas de un punto determinado del lote y utilizarlo como una muestra de análisis. Sin embargo, un lote de semillas en la práctica nunca es uniforme en su totalidad, y si se toman puñados de diferentes puntos, los componentes se presentan en diferentes proporciones. Las razones por las cuales los lotes nunca son uniformes según Thomson (1979), se pueden resumir así:

- ◆ La separación por gravedad de semillas livianas y pesadas dentro de un bulto o de una bolsa.

- ◆ Las diferencias dentro del cultivo del cual se han cosechado las semillas. Puede haber variación en madurez, peso de semilla o enfermedad entre diferentes lugares de un área o entre distintos árboles.
- ◆ Duración de las operaciones de cosecha. Si ésta se interrumpe por mal tiempo, la condición de la semilla no será la misma antes y después de la interrupción.
- ◆ Escasa uniformidad en la extracción y procesamiento consiguiente y almacenamiento de semilla del mismo cultivo. Ej: diferente maquinaria, diferencias en los ajustes de la misma máquina, diferentes condiciones de almacenaje.
- ◆ Colocar semilla de dos o más cultivos juntos para formar un lote.
- ◆ Fallas en la mezcla adecuada del lote antes de empacar.

Si existe alguna sospecha de mezcla inadecuada y por consiguiente una gran variación en la calidad de la semilla entre un número de recipientes de un lote, se debe mezclar de nuevo.

2.2 Métodos

"Una muestra se obtiene de un lote de semillas, tomando pequeñas porciones al azar de diferentes puntos del lote y mezclándolas. De esta muestra, se obtienen muestras más pequeñas para una o más etapas. En cada etapa, la mezcla completa es seguida por una subdivisión progresiva o por la extracción y combinación al azar de pequeñas porciones" (ISTA 1993). Las diferencias entre los dos métodos se ilustran en las Fig. 1 y 2.

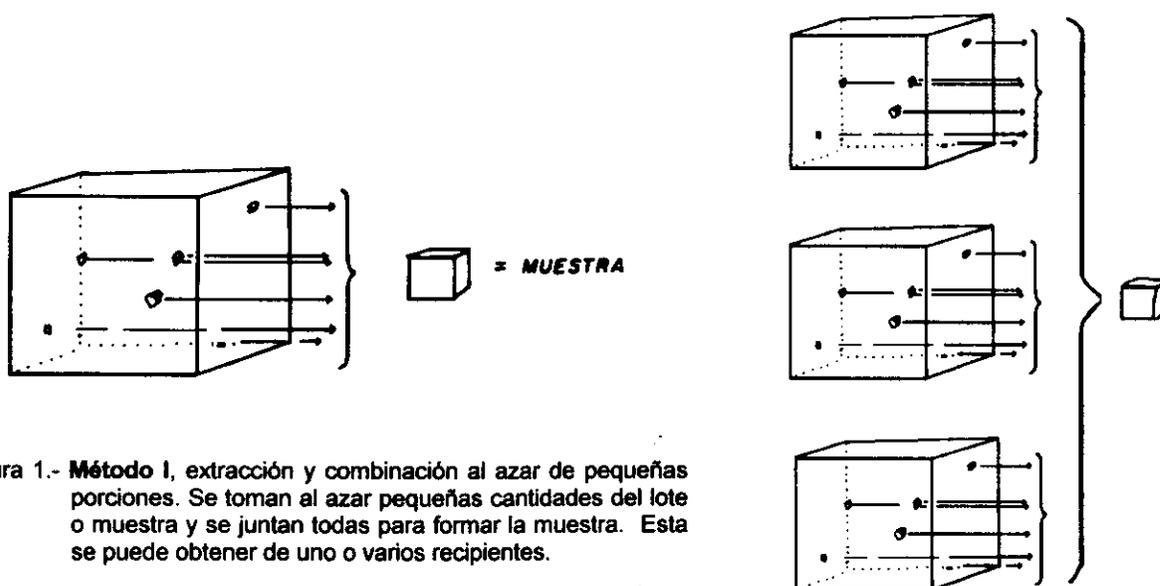


Figura 1.- **Método I**, extracción y combinación al azar de pequeñas porciones. Se toman al azar pequeñas cantidades del lote o muestra y se juntan todas para formar la muestra. Esta se puede obtener de uno o varios recipientes.

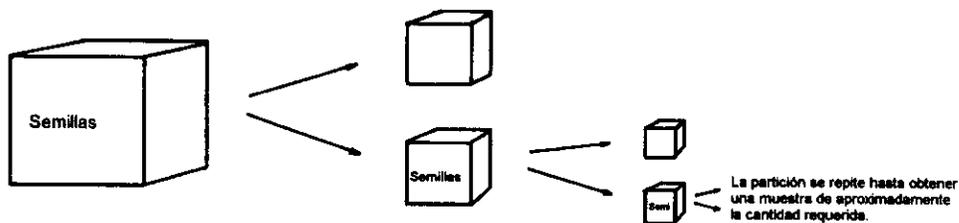


Figura 2.- **Método II**, subdivisión progresiva (también denominada partición sucesiva). La muestra o lote de semilla, se divide aproximadamente en dos porciones iguales sobre una mesa o en un separador de semillas. Una porción se saca y la otra se mezcla completamente y se divide otra vez. Este proceso de partición se repite hasta obtener una muestra del tamaño aproximado que se requiere.

Teóricamente no existe diferencia entre ambos métodos de muestreo; pues, la muestra obtenida es una fracción que representa los componentes del lote original. Generalmente el método I se usa antes de las operaciones de laboratorio y el método II durante las operaciones de laboratorio.

2.3 Tamaño e intensidad de muestreo

Si el lote de semillas a ser analizado se encuentra en más de un recipiente, la muestra se debe basar en muestras tomadas del mismo número de recipientes. Estas muestras se conocen como muestras primarias. Las muestras se deben tomar de diferentes puntos en los recipientes, pero no necesariamente de más de un punto en cualquier recipiente.

Los requerimientos mínimos establecidos por ISTA para la intensidad de muestreo de muestras primarias son:

- | | |
|------------------------|--|
| Hasta 5 recipientes: | Muestrear cada envase. Siempre tome al menos 5 muestras primarias. |
| 6 a 30 recipientes: | Muestrear 5 recipientes o al menos uno de cada tres, cualquiera que sea mayor. |
| 31 a 400 recipientes: | Muestrear 10 recipientes o al menos uno de cada cinco recipientes, cualquiera que sea mayor. |
| 401 o más recipientes: | Muestrear 80 recipientes o al menos uno de cada 7 recipientes, cualquiera que sea mayor. |

Las muestras primarias se mezclan y la muestra resultante se reduce (por partición repetitiva o por extracción y combinación aleatoria de pequeñas porciones) al tamaño apropiado; esta muestra, llamada muestra de análisis, se presenta a la entidad que la analiza. Esta muestra se reducirá a los tamaños de las muestras de trabajo como se

especifica para cada tipo de análisis. Los tamaños apropiados de las muestras se especifican para algunas especies en las reglas del ISTA.

Cuadro 1.- Ejemplos de pesos de muestras para lotes de semillas de hasta de 1000 kg.

Especie	Peso mínimo de muestras para análisis (g)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	15
<i>Eucalyptus globulus</i>	60
<i>Pinus caribaea</i>	100
<i>Pinus patula</i>	40
<i>Tectona grandis</i>	2000

Como se ha encontrado mucha variación dentro de semillas forestales, es difícil una estandarización completa para la especie. El analista debe procurar muestrear una cantidad mayor a la requerida para los análisis que realice. Como regla general, la muestra de trabajo debe contener 2500 semillas.

2.4 Instrumentos para muestrear

Se utilizan muestreadores de semillas para obtener un bulto de muestra representativa de un lote grande de semilla, tomando un número de pequeñas muestras primarias de diferentes partes del lote (Fig. 3). La muestra compuesta se puede mezclar y dividir para proveer pequeñas muestras de análisis.

El muestreador de semilla es una sonda, lo suficientemente larga para alcanzar todas las áreas del recipiente y diseñada para extraer un volumen regular de semilla de cada área por donde se introduce. El más utilizado es el muestreador de tipo de forro (también llamado muestreador de tubo) el cual consiste de un tubo interior hueco de bronce que se ajusta a la medida dentro de un tubo exterior (Fig. 3).

El tubo interior puede girar dentro del tubo exterior. Ambos tubos tienen ranuras en sus paredes, de tal forma que cuando el tubo interior gira las ranuras coinciden y las semillas caen dentro del tubo. Cuando se le da media vuelta al tubo, las aberturas se cierran, y así el muestreador retiene la muestra de semillas a su retiro. Las ranuras se abren en una cavidad central o en compartimentos separados. En el último caso, el muestreador se puede usar en dirección vertical u horizontal. Los muestreadores de una cavidad deben utilizarse horizontalmente, ya que la semilla cae dentro del tubo en la parte inferior de la ranura. Si se sostiene verticalmente, la parte superior del recipiente tendrá mayor proporción de la muestra que del resto del lote de semilla; por ejemplo: la muestra será sesgada. Los muestreadores conocidos como "ladrones" tienen una sola ranura y deben también utilizarse horizontalmente. Existen muestreadores de diferentes diámetros y longitudes.

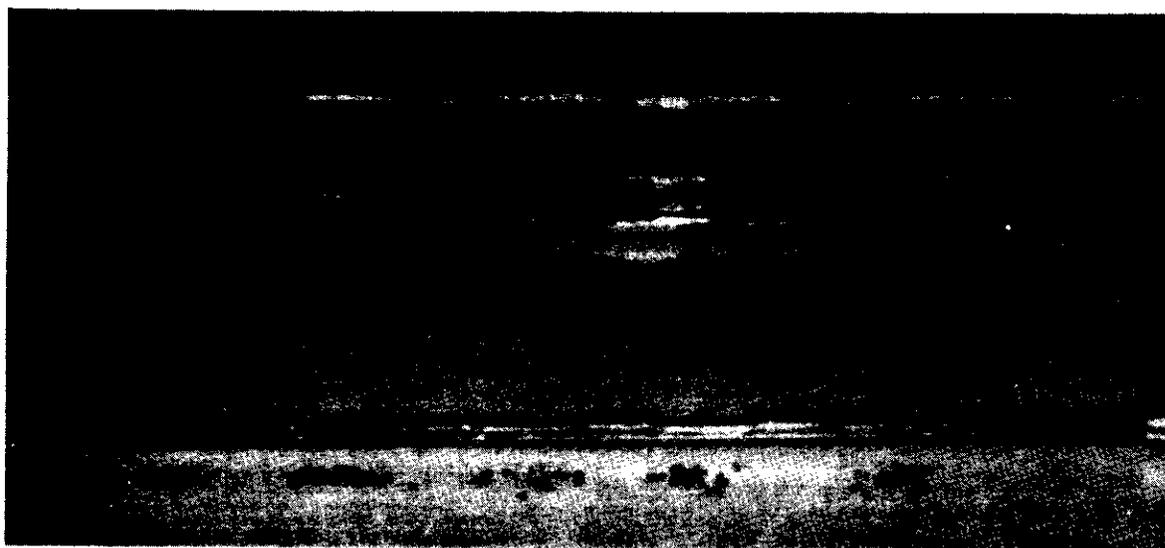


Figura 3. Muestreadores de semillas o tubos de muestreo. Dos tamaños de los muestreadores de tubo camisa. El muestreador grande de bronce (arriba) tiene ranuras en compartimentos individuales, que se pueden sostener verticalmente durante el muestreo. El muestreador pequeño (abajo) tiene ranuras en un compartimento central y se debe sostener horizontalmente durante el muestreo. En la parte superior, el tubo interior pequeño del muestreador ha sido separado del tubo exterior. La ilustración inferior de la figura presenta el mismo muestreador: las dos partes están unidas de nuevo. Algunas semillas se han salido de varias ranuras.

La división en dos partes de un lote pequeño o muestra se puede hacer manualmente mezclando la muestra sobre una mesa hasta formar una pila simétrica; luego se divide la pila en cuatro partes con una regla o cartón. Los dos cuartos opuestos entre sí se separan y los otros dos se mezclan y esta muestra se puede reducir después por mezcla y división nuevamente hasta obtener la muestra del tamaño requerido. Cuando la semilla se vierte en los divisores de semillas (Fig. 4 y 5), esta mezcla y división se hace mecánicamente. Los divisores de suelo o de rifle presentan portillas rectangulares con un marco; estas se abren alternativamente hacia la derecha o izquierda. La semilla se vierte en forma pareja sobre el marco; la bandeja de semillas utilizada para vaciar la semilla en el divisor (Fig. 4) facilita una distribución pareja u homogénea de la semilla. Cayendo a través de las portillas, la semilla se divide en dos porciones iguales.

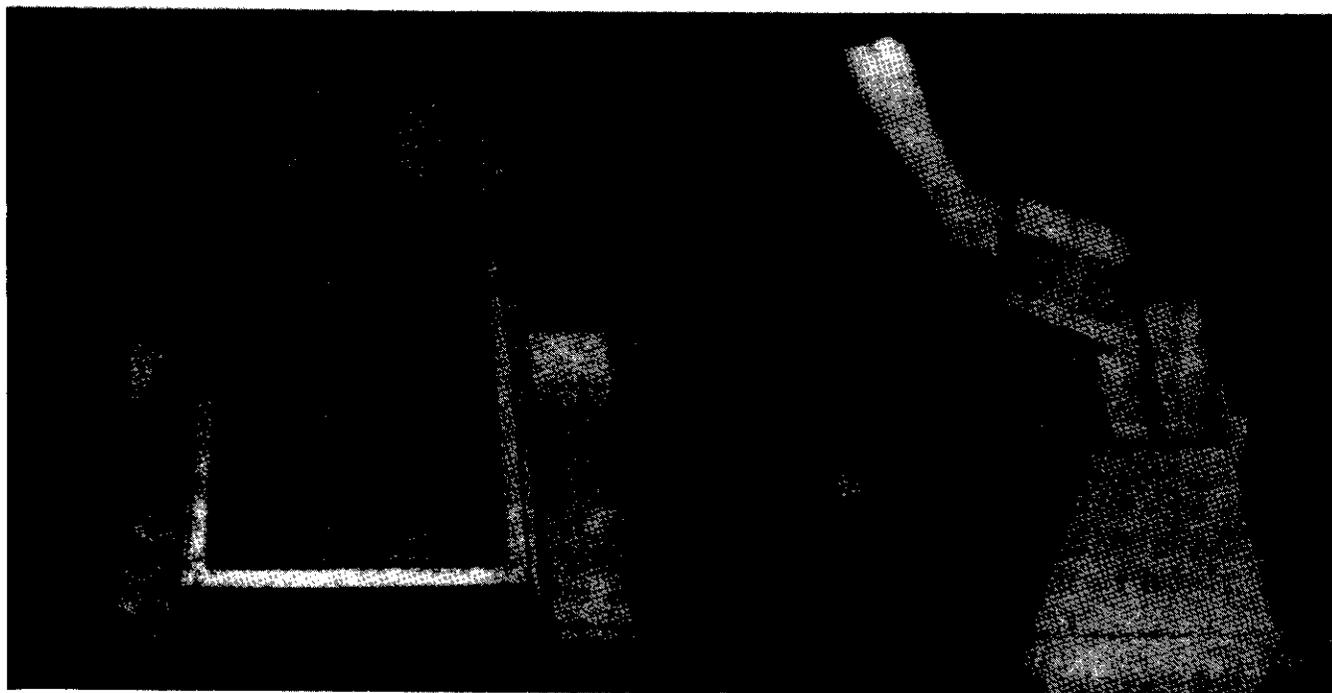
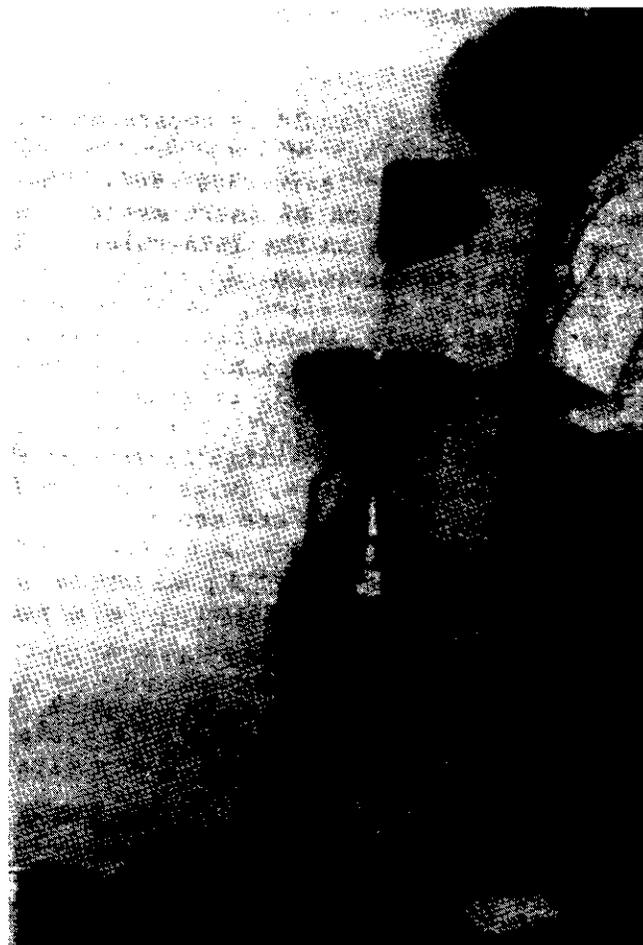


Figura 4. Divisor de suelo o de rifle.

Figura 5. Divisor "Boerner". Una muestra de semillas se coloca en un embudo colocado sobre un cono invertido, el punto donde está directamente bajo el centro de la abertura. Alrededor de la base del cono existen 2 o 3 aberturas o platillos. La semilla cae por el borde del cono y se divide entre 38 canales separados, conduciendo hacia dos canales que se vierten en los platillos.



3. PUREZA

3.1 Propósito

El objetivo del análisis de pureza es determinar la composición por peso de la muestra de análisis. Las muestras de semillas forestales pueden contener impurezas tales como malezas, semillas de otras especies, estructuras desprendidas de la semilla, partículas de hojas y ramitas como también otros materiales diferentes a la semilla. El tipo y cantidad de impurezas ofrece información importante sobre la calidad de la semilla. Por ejemplo, material de hojas y ramitas juntas con partes de semillas y semillas quebradas, pueden ser el punto inicial para el ataque de hongos. El rendimiento de las sembradoras mecánicas o de precisión se puede reducir por las impurezas. Las malezas y otras semillas forestales pueden incrementar los costos de limpieza en el banco. Por último, la pureza influye en el número de semillas/kg y por lo tanto el rendimiento de las plantas y la densidad apropiada de siembra.

3.2 Método

Para determinar la pureza se divide la muestra de trabajo entre semilla pura, otra semilla y materia inerte. Se calcula el porcentaje por peso de cada parte. La muestra de trabajo debe contar por lo menos con 2500 semillas. El análisis de pureza es el primero que se debe realizar. La definición de materia inerte, semilla pura y otra semilla se da para cada especie en las reglas del ISTA (ISTA 1993). La semilla pura se refiere a la de la especie en consideración. Adicionalmente a semilla madura y no dañadas incluye: semilla pequeña, marchita, inmadura y germinada, teniendo en cuenta que se puede identificar como semilla de la especie en consideración. Además, la fracción de semilla pura incluye pedazos de semillas resultantes de quebramiento y que deben tener más del 50% del tamaño original.

Otra semilla incluye semilla pura de otras especies (de acuerdo a la definición!!). Materia inerte comprende estructuras derivadas de semillas como alas de semilla, otras materias no definidas como semilla pura, Ej: piedras, hojas, ramitas, etc. La semilla de coníferas y de leguminosas sin la testa se considera materia inerte.

Las definiciones del ISTA contemplan todas las semillas de especies forestales tropicales, pero basados en experiencias se puede obtener una definición propia o se puede aplicar una definición a otra especie.

La muestra de semillas se puede esparcir sobre una mesa o mejor sobre una lámina de vidrio ajustable con luz por debajo, colocada sobre una mesa. Las fracciones son examinadas y separadas con un cuchillo plano de madera o un bisturí. El porcentaje de semilla pura se calcula así:

$$\text{Pureza \%} = \frac{\text{Peso de la fracción de semilla pura}}{\text{Peso total de la muestra de trabajo}} \times 100.$$

4. PESO DE SEMILLA

4.1 Objetivo

Su objetivo es determinar el peso de 1000 semillas. Esto permite el cálculo del número de semillas por kg, lo cual es una información muy importante en las operaciones del vivero y para determinar el rendimiento de las plantas. Además, el peso de la semilla está positivamente relacionado con calidad de semilla.

4.2 Método

ISTA (1993) recomienda el conteo de ocho repeticiones al azar de 100 semillas puras. Las ocho repeticiones se pesan individualmente. El peso de las 1000 semillas se calcula así:

Peso de 1000 semillas = Σ de los pesos de ocho repeticiones individuales x 1.25

Calcular el coeficiente de variación:

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

Donde:

x = peso de cada repetición en gramos

n = número de repeticiones

Σ = sumatoria de

Desviación estandar (s) = $\sqrt{\text{varianza}}$

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{S \times 100}{\bar{x}}$$

Donde

\bar{x} es el promedio del peso de 100 semillas.

Si el coeficiente de variación excede 4, la prueba se debe repetir y determinar la desviación estándar para las 16 repeticiones. Para calcular el peso final de 1000 semillas, se descartan las repeticiones desviadas del promedio por más de dos veces la desviación estándar.

El resultado depende del contenido de humedad de la semilla. Si éste es inusualmente alto, el peso es sobrestimado. Por lo tanto el análisis se debe realizar con semilla a un contenido de humedad normal para almacenamiento y distribución.

5. CONTENIDO DE HUMEDAD

5.1 Introducción

El contenido de humedad y la temperatura son factores cruciales durante el almacenamiento y manejo de la semilla. El contenido de humedad determina la actividad fisiológica y bioquímica de la semilla. Por lo tanto, la determinación del contenido de humedad de la semilla es de vital importancia para las operaciones de manejo (Stubsgaard 1990).

5.2 Principios

Existen dos métodos principales para medir la humedad de las semillas: los métodos directos, en donde se elimina el agua y se cuantifica la cantidad; y el método indirecto, que utiliza parámetros eléctricos (Grabe 1989). Los métodos directos incluyen secado al horno, destilación, extracción. Los métodos indirectos incluyen por ejemplo, medidas de conductividad y capacitancia e higrometría. Los métodos indirectos son siempre calibrados contra un método directo, generalmente el método de secado al horno.

Para evitar cambios en el contenido de humedad, la muestra se debe mantener en un recipiente a prueba de humedad y la exposición al aire del laboratorio se debe reducir al mínimo. Un recipiente frío, tomado de un cuarto frío, debe dejarse equiparar a la temperatura del laboratorio antes de abrirse. Si se abre frío, una película de humedad puede condensarse sobre la semilla.

La determinación se debe realizar en duplicado en dos muestras de trabajo obtenidas independientemente de la muestra de análisis. El tamaño de la muestra de trabajo es de 4-10 g. Para semilla grande una norma es utilizar no menos de 30 semillas en total (Krishnapillay y Marzalina 1993). La experiencia del DFSC señala que se requieren 2 x 30 semillas de *Azadirachta indica* (neem).

5.3 Método de secado al horno

Este método es recomendado por ISTA (1993) para determinar el contenido de humedad de semilla. El método recomendado para semilla forestal es llamado el "método del horno a temperatura baja constante". Los dos duplicados son secados en dos recipientes durante 17 ± 1 horas a 103 ± 1 °C. El horno debe tener una precisión dentro de ± 1 °C y no se debe sobrecargar con muestras que puedan interferir con la circulación del aire y por tanto obstaculizar la evaporación. Los recipientes se llevan inmediatamente después del secado a un desecador donde se les deja enfriar. Los duplicados se pesan en una balanza con aproximación al 0.001 g. El contenido de humedad se calcula con base en peso fresco de la semilla:

$$(M_2 - M_3) \times \frac{100}{(M_2 - M_1)}$$

M_1 = peso del recipiente en g.

M_2 = peso del recipiente y su contenido en g antes del secado

M_3 = peso del recipiente y su contenido en g después del secado

El resultado se establece como el promedio de las dos repeticiones, expresado en un decimal.

Si el resultado no está dentro de los límites de tolerancia entre las dos repeticiones, como se muestra a continuación, la prueba se debe repetir.

Semillas/kg (No)	Contenido de humedad inicial (%)		
	< 12	12-25	>25
>5000	0.3	0.5	0.5
< 5000	0.4	0.8	2.5

Antes del secado se recomienda cortar las semillas de más de 10 mm de diámetro en 4-5 pedazos para facilitar un secado completo (Bonner 1991). Esta operación se debe realizar rápidamente para evitar pérdida de humedad. Se recomienda también cortar o moler semillas más pequeñas, al menos las semillas duras. Molerlas puede causar problemas si son grasosas y se adhieren a la máquina, o si la rotación de la trituradora calienta la semilla en exceso causando una evaporación rápida. Cortarlas es un método apropiado. Molido o cortado se debe hacer siempre en dos sub-muestras seleccionadas independientemente y las muestras se deben escoger del lote original.

Si el contenido de humedad es muy alto, por ejemplo, superior a un 20%, la semilla se puede pre-secar y dejarla de un día para otro en un lugar seco y caliente, tal como encima de un horno. Las semillas grandes se deben cortar antes de secar. Al día siguiente se pesa la semilla y luego se seca al horno como de costumbre. En esta forma se determinan dos contenidos de humedad (CH_1 Y CH_2), por ejemplo, el contenido de humedad después del pre-secado y después del secado al horno. El contenido de humedad total se calcula así:

$$CH_1 + CH_2 - \frac{CH_1 \times CH_2}{100} = CH \text{ total}$$

Los contenidos de humedad se calculan con base en pesos frescos, por lo tanto los dos CH (CH_1 y CH_2) no se pueden sumar, sus bases son diferentes.

El método de secado al horno supone que sólo que se evapora agua durante el secado. Sin embargo, también se evaporan compuestos volátiles, lo cual resulta en una sobreestimación del CH. La evaporación de resinas de algunas semillas de *Abies* es más alta cuando se corta la semilla, resultando en un CH artificialmente alto después de

cortada. En otros casos pueden ocurrir oxidaciones durante el secado, resultando en un aumento de peso y subestimación del CH (Bonner 1991). La conclusión es que se debe considerar que el CH determinado por el método del horno puede no representar el CH real. Sin embargo, este método se utiliza como estandar frente al cual se calibran otros métodos.

5.4 Otros métodos

Varios métodos ofrecen posibilidades de pruebas rápidas, pruebas en el campo y evitan la destrucción de la muestra. Una publicación que se puede consultar sobre varios tipos comerciales de equipo es la siguiente: Survey of equipment and suppliers for seed testing" (Disponible en el ISTA).

Un ejemplo de un método eléctrico para uso en el campo es el "Dickey John moisture meter" (Fig. 6). Este medidor mide la capacitancia, la cual se incrementa a medida que la humedad de la semilla aumenta. Comparado con el equipo medidor de la conductividad, este principio de medición podría estar menos influido por una distribución no uniforme de la humedad dentro de la semilla (Grabe 1991). La prueba no es destructiva.

Una prueba rápida se obtiene mediante el secado de la semilla bajo un bombillo infrarrojo durante unos 35 minutos. Comparado con el secado al horno las temperaturas son más altas y la pérdida de humedad es más rápida (Fig.7).



Figura 6. Medidor de humedad para el campo Dickey John.

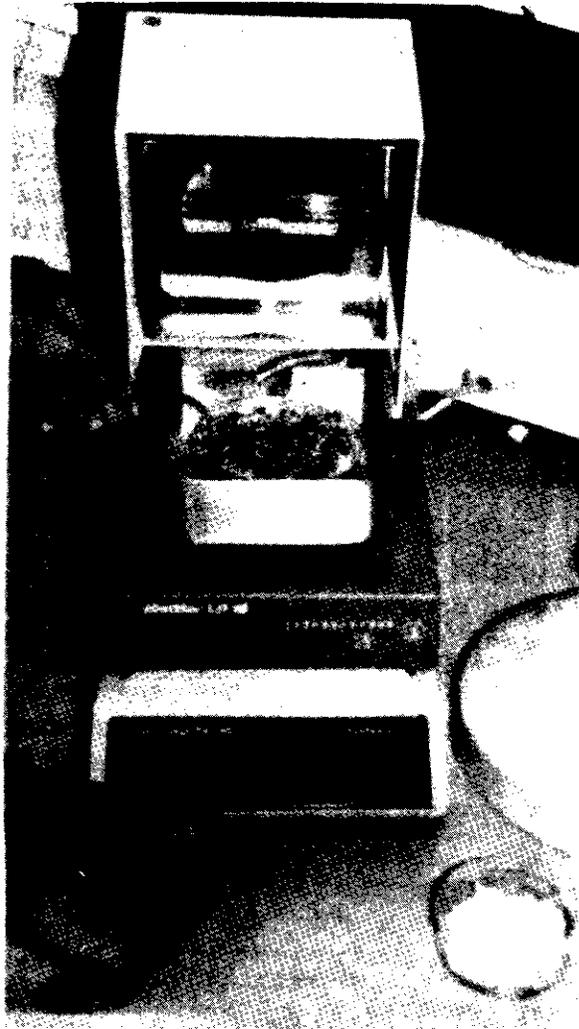


Figura 7 . La semilla se seca mediante un elemento infrarrojo caliente. La balanza mide la pérdida de peso.

Los métodos higrométricos se basan en el principio de que la semilla es higroscópica y alcanzarán un equilibrio con la humedad del aire que las rodea. Una vez que esta curva de equilibrio se establece, se conoce la relación entre el contenido de humedad de la semilla y la humedad relativa del aire.

Por tanto se puede usar un higrómetro para determinar el equilibrio de la humedad relativa del aire en una cámara pequeña donde la semilla se puede equilibrar. La ventaja de este método es que hay una relación simple entre la humedad relativa y el potencial de agua, la última expresión es una medida más

absoluta de la disponibilidad de agua para reacciones químicas. El método no es preciso a bajos y altos contenidos de humedad (Grabe 1991). Especialmente el equilibrio de semilla grande tomará semanas cuando la testa y la semilla no están dañadas, y para semilla dura no se equilibrará en absoluto si la semilla no se escarifica. Por lo tanto para semilla dura, y probablemente también muchas otras semillas, será necesario cortar o moler la semilla para lograr un equilibrio en corto tiempo. Ej. 30-60 minutos. El método no está todavía en uso para pruebas prácticas de semillas forestales.

Todos los métodos se deben calibrar contra el método de secado al horno. En Scholer y Lauridsen (1998) se describen los procedimientos y las curvas de calibración para varias semillas forestales del trópico.

6. PRUEBA DE GERMINACION

6.1 Introducción

El objetivo principal de la prueba de germinación es establecer el número máximo de semillas que puedan germinar bajo condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura. El uso de condiciones ideales estandarizadas en el laboratorio tal como lo prescribe el ISTA asegura que:

- 1- Las diferencias entre los resultados se pueden adscribir a diferencias reales entre muestras de semillas y no a diferentes métodos de análisis.
- 2- Los resultados obtenidos para un determinado lote de semillas en un laboratorio deben ser idénticos a los obtenidos en cualquier otro. Esto es, que los resultados deben ser reproducibles.

La capacidad de germinación determinada así no es igual a la germinación en el vivero o el campo, pero en la mayoría de los casos las dos cifras están estrechamente relacionadas. En esta forma el viverista gradualmente estará en capacidad de pronosticar el desempeño del vivero basado en la germinación de laboratorio.

Una serie de pruebas de calidad están disponibles para determinar la habilidad de la semillas para resistir los diversos factores de estrés en el vivero (Poulsen 1993).

6.2 General

De acuerdo a las normas del ISTA (1993) la germinación se prueba sobre la fracción de semilla pura. Normalmente una prueba consiste de cuatro réplicas de 100 semillas al azar de semilla pura. La semilla se extiende uniformemente sobre el sustrato humedo. Para evitar difusión de hongos, las semillas deben espaciarse a 1.5 – 5 veces el ancho de las semillas (Willan 1985). Puede ser necesario subdividir la prueba en ocho réplicas de 25 semillas dependiendo del tamaño de las semillas, etc. Unidades de multigerminación, (Ej. *Tectona grandis*) no se dividen sino que se toman como una sola semilla.

Semillas muy pequeñas como las de *Eucalyptus* se prueban por peso, cuatro réplicas de 0.1 – 1.0 gramos dependiendo de la especie (ISTA 1993). Luego de la germinación se calcula el número de semillas que germinan por gramo en lugar del porcentaje de germinación.

Para cada especie las reglas del ISTA prescriben periodos de luz, temperatura para el día y la noche, duración de la prueba. Ej: día del primer y último conteo, tipo de sustrato, y en caso de latencia, también el método de pretratamiento.

La semilla bajo prueba no debe estar en latencia y las reglas del ISTA recomiendan tratamientos de rompimiento de la latencia. Para un número grande de

semillas tropicales de testa dura existe un tratamiento simple de cortar un pedazo de la testa o quemar un pequeño agujero con un cautín o pirógrafo. Si se utilizan métodos con agua caliente o ácidos deben ser completamente estandarizados (Willan 1990, pretratamiento de la semilla).

La germinación se define como la emergencia y desarrollo de las plántulas en una fase donde sus estructuras esenciales señala si es capaz de desarrollarse en una planta satisfactoria bajo condiciones favorables del suelo (ISTA 1993).

La prueba (quizás usando un método alterno) se puede repetir si la desviación entre réplicas de 100 semillas excede el rango máximo tolerado (Anexo 1).

6.3 Plántulas normales, anormales y su registro

Dos ejemplos de un formato de registro de semillas germinadas y otros factores durante prueba de germinación se presentan como Anexo 2a y 2b. Se registran las siguientes categorías de semillas:

- Germinadas normales
- Germinadas anormales
- Semillas duras ej: no embebidas
- Semillas frescas, diferentes a semillas duras que no germinan pero permanecen limpias y firmes, las cuales al final de la prueba no germinan, ni son duras ni frescas.
- Semillas vacías
- Otras categorías. En caso de que prevalezca el daño por insectos, este factor se registra en forma separada.

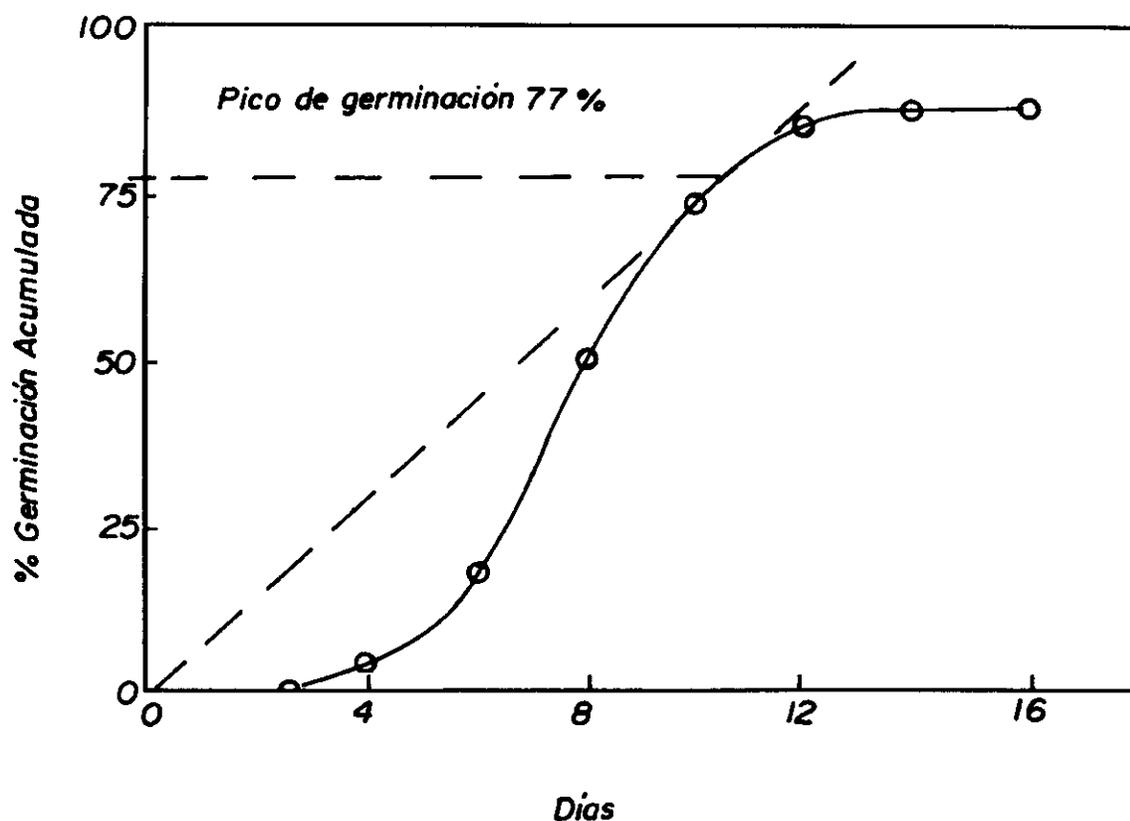
El conteo ocurre usualmente una vez por semana, pero para semillas de rápida germinación, se puede hacer dos veces por semana. La duración de la prueba depende de la especie, pero usualmente es de 3-4 semanas. Las diversas categorías de semillas contadas se sacan durante la prueba. Esto puede evitar la propagación de hongos a causa de semillas muertas. La categoría de "semilla fresca" no se puede contar hasta el fin de la prueba. Ej. en el último conteo. La categoría de "germinadas normales" se define como plántulas intactas con todas sus estructuras esenciales (Ej. Raíz, brotes axilares, cotiledones, cogollos) completas, sanas y bien desarrolladas. También se incluyen plántulas con defectos menores pero en capacidad de desarrollarse como plantas satisfactorias, y plántulas que han sido infectadas en forma secundaria. Esto es donde la infección no se origina de la semilla madre.

Se pueden definir varias anomalías y se puede conducir a la determinación de sus causas, si el tipo de anomalía está registrado. Esto es, decolorada, pasmada, doblada, quebrada, enana, retorcida, defectuosa, incompleta, etc.

Sin embargo, en muchos casos, semillas que muestran una proyección normal de la raíz a una determinada longitud (5-10 mm o 1-3 veces el tamaño de la semilla) se cuentan como germinadas normales. Esto es para reducir el consumo de tiempo y espacio, pero es más correcto y seguro contar las plántulas.

Si prevalece la categoría de semilla fresca, esto indica que la latencia está presente. Consecuentemente se deberá repetir la prueba una vez hecho el tratamiento para romper la latencia.

Es evidente que una prueba de germinación que registra todas las categorías anteriores suministra mayor información que el sólo conteo de las germinadas. La función del laboratorio de un centro de semillas no sólo implica el reporte de la capacidad de germinación de un lote de semillas. En el caso de una baja calidad de las semillas el laboratorio es responsable de suministrar información sobre las secciones de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas, sugiriendo las posibles causas de esta baja calidad. Por tanto el laboratorio debe registrar todas las categorías relevantes descritas anteriormente.



Cuadro 2. Porcentaje de semillas germinadas hasta el momento de germinación pico.

El resultado de la prueba de germinación se estima con base en la categoría "germinadas normales". El porcentaje promedio de germinación es la mediana de las cuatro réplicas redondeadas al número entero más cercano. El formulario de análisis (anexo 2a y b) también debe incluir información sobre las demás categorías de semillas, el sustrato, la temperatura, la duración y el pretratamiento utilizado. Para unidades de multigerminación debería quedar claro cómo se calcula el porcentaje de germinación. Un certificado oficial del ISTA se presenta en anexo 2c.

Se puede extraer información adicional sobre calidad de semillas de la prueba de germinación, por ejemplo la "energía de germinación". Esta es una medida de qué tan rápida, uniforme y enérgica es la germinación. Existen varias definiciones (Czabator 1962): 1) el porcentaje de semillas que ha germinado dentro de un período dado, por ejemplo al sétimo día, o el día diez de haber iniciado la prueba. 2) El porcentaje de semillas que ha germinado hasta el momento de la germinación pico. Esto es el momento cuando el mayor número de semillas por unidad de tiempo ha germinado. Este punto se puede determinar sobre un diagrama (X,Y) mostrando la relación entre días de iniciación de la prueba y el porcentaje de germinación acumulado (Cuadro 2). El punto se encuentra donde la tangente más pendiente partiendo de (0,0) se encuentra con la curva.

6.4 Luz, temperatura, sustrato

Muchas clases de semillas forestales requieren luz para germinar normalmente o para germinar de todos modos. Se requiere una buena distribución de luz en la cámara de germinación, se recomiendan lámparas de tubos fluorescentes blancos. Si la germinadas se cuentan por la proyección de la radícula, el factor de iluminación podría no ser demasiado crítico. Pero si solo se cuentan plántulas con sus primeras hojas, el nivel de iluminación es crítico para la producción de plántulas normales. En caso de poca iluminación las plántulas se vuelven etioladas, esto es alargadas y de color verde pálido. Una selección natural para el ciclo de iluminación sería seguir el ciclo diurno experimentado por la especie en su área de distribución. Para especies de clima templado se recomendaría un ciclo de 16 horas de luz seguido por ocho horas de oscuridad.

La temperatura es un factor crítico durante la germinación. Especialmente afecta la velocidad de germinación. Pero además la capacidad de germinación puede sufrir gravemente a causa de condiciones inapropiadas de temperatura. Es común usar un ciclo de temperatura correspondiente al de la luz. Temperatura de 5-10°C bajo oscuridad inferior a la temperatura bajo luz. Si no se conocen las condiciones óptimas, una selección natural sería seguir el ciclo diurno experimentado por la especie en su área de distribución.

Durante las fases iniciales de germinación la semilla se nutre solamente de sus reservas. Por tanto el sustrato de germinación no requiere nutrientes. Debe ser estéril, inerte, capaz de mantener y distribuir bien la humedad, facilitar buena aireación y tener un pH neutral (6.0 – 7.5). Arena es el sustrato más barato y fácil de conseguir. Se puede esterilizar al horno a 130°C durante unas pocas horas. Para obtener partículas de tamaño uniforme la arena se debe cernir. ISTA (1993) recomienda que la mayor parte de partículas debe pasar a través de una zaranda de 0.8 mm y retenida en un cedazo con huecos de 0.05 mm. También se utiliza papel filtro de buena calidad, poniendo la semilla a germinar en rollos de papel (anexo 3) o colocar la semilla sobre el papel (Fig.8).

Las ventajas de los métodos con papel son su rapidez y facilidad de observar las semillas ya que no están cubiertas por el sustrato. Esto facilita el registro final de los tipos de semillas que no germinaron. Las desventajas son que los ataques de hongos se propagan con facilidad, y que la semilla de muchas especies no podrán desarrollarse en plántulas normales sin un medio propio de enraizamiento. Por tanto durante la prueba de

germinación solamente se registra la proyección de la radícula. Sin embargo, el uso de papel doblado tipo acordeón (Fig.9) reducirá la velocidad de propagación de hongos puesto que cada semilla está separada de las demás. El desarrollo de plántulas también es apropiado.

Un tipo especial de múltiples capas de papel llamado "kimpak" presenta una excelente capacidad de retención de agua. Agar es otra posibilidad, con la ventaja de que la semilla puede desarrollar en plántulas y que es posible distinguir cada semilla en su medio, por no estar cubiertas como en la germinación en arena. El sustrato de agar se prepara mediante calentamiento de un 1% de solución de agar a 90°C; enfriamiento hasta unos 50°C y vaciado en un plato petri. Vermiculita (Fig. 10) es un material de fibra de vidrio esponjoso en su mayor parte consistente de SiO_2 y MgO ; es estéril, con gran capacidad de retención de agua y se presta para una buena distribución de la humedad. Se considera que es un medio más uniforme que la arena. Sin embargo, puede ser difícil distinguir la proporción de semilla no germinada en la vermiculita al final de la prueba.



Figura 8. Germinador Jacobsen. La mesa mantiene agua caliente por dos elementos caloríferos controlados por termóstatos y cubierto por dos láminas removibles (en la fig. una lámina ha sido quitada). Al frente: germinación bajo cubiertas plásticas en forma de campana sobre papel filtro. Un cordón de mecha desciende desde el papel filtro entre las dos láminas, hasta el agua. La mecha mantiene húmedo el sustrato.

La semilla cubierta con plaguicidas será germinada en un sustrato que no permita a los plaguicidas concentrarse alrededor de la semilla, por ejemplo, arena, o vermiculita (papel no es apropiado). No se recomienda como sustrato el suelo ni el compost (ISTA 1993). Estos sustratos no son estériles, no son estandarizados en relación con la composición y son complicados de manejar en el laboratorio.



Figura 9. Germinación de la semilla en papel tipo acordeón. Una pieza rectangular de papel filtro se coloca sobre una malla de alambre con una mecha entre el recipiente de agua al fondo de la caja. El papel plisado se coloca encima con cinco semillas en cada pliegue, para un total de 100.

Figura 10. Germinación en vermiculita. Se quita la tapa de la caja de germinación.

Cualquier sustrato se debe remojar hasta su nivel de capacidad de retención, no se debe dejar agua corriente porque la semilla se daña debido a la reducida disponibilidad de oxígeno, pero la semilla tampoco debe sufrir por estrés de agua. Por experiencia, el nivel correcto de humedad del medio se puede percibir a mano, y la cantidad de agua añadida por volumen o peso de arena o vermiculita debe ser estandarizada. Las condiciones más uniformes se alcanzan al contar con la humedad correcta inicialmente, reduciendo la evaporación al cubrir el recipiente de germinación y sin añadir agua durante la prueba. Si



se agrega agua después de la siembra, parte del medio se puede humedecer más que el resto.

Una recomendación general es que la semilla se debe cubrir con una capa de arena/vermiculita no más gruesa que el tamaño de la semilla.

Se recomienda germinar *Euclayptus* sobre papel, donde la plántula se desarrolla bien y se puede contar con facilidad. Muchas especies de acacia emiten gases de olor extremadamente fuerte. Se sospecha que grandes concentraciones de estos gases pueden impedir la germinación. Por tanto no se recomienda germinar semillas de *Acacia* en rollos de papel, un sustrato de arena/vermiculita puede permitir la eliminación de estos gases.

6.5 Germinadores

El mercado ofrece varios tipos de germinadores, los más corrientes son:

- **Aparatos Jacobsen/tanque Copenhagen.** Este consiste de un tanque contenedor de agua con un termostato que controla la temperatura del agua (Fig.8). La parte superior del tanque está cubierta con tapas de metal o vidrio con ranuras en medio o perforadas. Las semillas se colocan sobre el papel filtro con una mecha que desciende al tanque de agua y mantiene el papel filtro con la humedad apropiada. La semilla y el papel filtro se cubren con una tapa de vidrio o plástico en forma de campana para reducir la contaminación y la evaporación. El tanque también se puede usar para germinar semillas en rollos de papel filtro, cubiertas con una lámina plástica.
- **Camara de germinación.** Esta es una cámara cerrada, a menudo con el tamaño y apariencia de un refrigerador grande (Fig.11). La temperatura se cambia automáticamente entre dos niveles, y la luz se prende o apaga en forma automática simulando el día y la noche. Los modelos costosos permiten controlar la humedad del aire. Para evaluar una cámara de germinación se debe enfatizar siempre que es necesario alguna circulación de aire para reducir la diferencia de temperatura entre superior e inferior. En las cámaras las temperaturas pueden ser 4-5°C más bajo en la parte inferior puesto que el aire frío es más denso y tiende a estabilizarse. Esto no es aceptable!. Un lleno completo de la cámara puede entorpecer el movimiento del aire, de tal forma que la caja de germinación/platos/rollos siempre se deben separar unos cuantos centímetros para facilitar la circulación del aire. Más comúnmente un ventilador se coloca en la parte superior de la cámara. También se debe verificar que se cuente con luz apropiada y que todas las bandejas reciban una iluminación suficiente y uniforme.

Las muestras de semillas se colocan en bandejas dentro de la cámara. Para evitar la desecación de las muestras se pueden tapar, por ejemplo en platos petri o en cajas de germinación tapadas (Fig.11) o rollos de papel filtro dentro de bolsas de polietileno cerradas. El balance es evitar desecación pero aún así, permitir cierto intercambio de aire para un suministro continuó de oxígeno y el escape de gases potencialmente tóxicos liberados de las semillas durante la germinación.

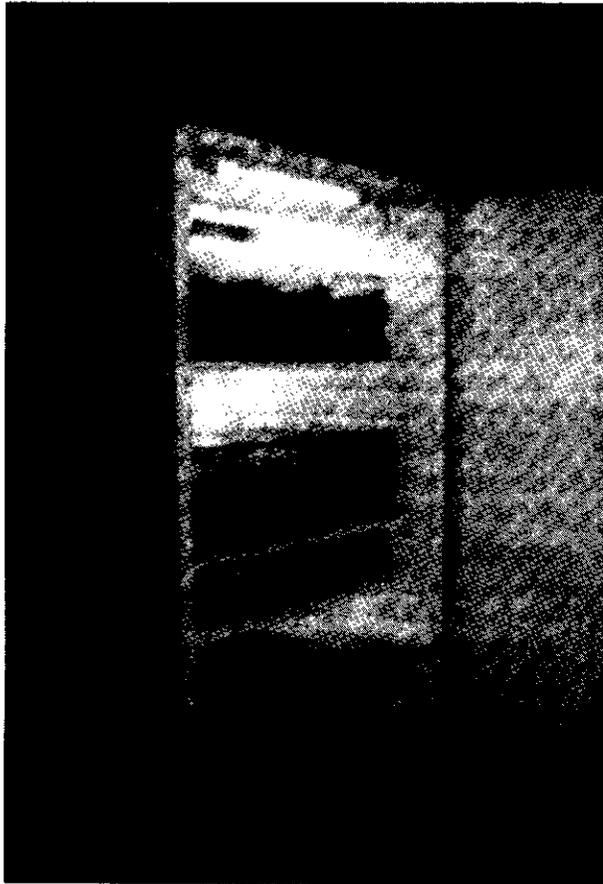


Figura 11. Cámara de germinación (refrigerador reconstruido) con cajas de germinación.

- **Cuartos de germinación o walk - in.** Estos germinadores funcionan como las cámaras de germinación pero son grandes, del tamaño de un cuarto y por tanto permite un mayor número de muestras para germinar.

Bajo algunas condiciones tropicales la temperatura promedio diaria no varía mucho durante el año. Si se van a probar grandes cantidades de semilla local, una solución práctica y barata es construir un cuarto de germinación bien aislado sin control de temperatura. Un número grande de anaqueles se construyen en el cuarto con tubos fluorescentes sobre cada estante. Si no se utilizan cajas de germinación cerradas, baldes de agua sobre el suelo mantendrán una alta humedad y reducirá la evaporación en las pruebas.

- **Cajas de germinación portátiles.** Un germinador simple consiste de un número de cajas plásticas apilables transparentes con tapas. La caja debe tener el tamaño suficiente para almacenar al menos una réplica, debe tolerar la esterilización ya sea a base de calor o por químicos, contar con una tapa bien ajustada para mantener aire con alta humedad, y transparente para satisfacer el requisito de iluminación. La caja puede tener un reservorio de agua y se puede utilizar cualquier sustrato. La caja se puede colocar tanto en un cuarto como en una cámara de germinación.

6.6 Control de hongos en pruebas de germinación

La mayor parte de la semilla forestal es portadora de un gran número de hongos y bacterias. Pero si la calidad de la semilla es alta, podrá resistir el ataque. Entre más baja sea la calidad de la semilla, mayor será el problema de hongos durante la prueba.

Se debe tener presente que las reglas del ISTA para las pruebas recomiendan evitar la aplicación de fungicidas durante las pruebas de germinación. En lugar de esto se debe asegurar que la propagación de los hongos sea minimizada, por ejemplo utilizando papel plisado, vermiculita o medio de arena con buena separación entre semillas, eliminación frecuente de semilla deteriorada, aireación apropiada y mantenimiento del sustrato con la humedad suficiente para permitir la germinación. Al menos una esterilización mensual del equipo del laboratorio y una desinfección mensual de las cámaras de germinación y mesas de laboratorio también ayudará (Willan 1988).

Pero, si por alguna razón es necesario un tratamiento contra los hongos, una solución fungicida en agua se puede agregar al medio al iniciar la prueba y durante la misma. Fungicidas en polvo también se pueden mezclar con el medio. Protectores de semillas o esterilización en hipoclorito (Na OCL) o una solución fuerte de etanol (seguida de un lavado completo en agua) son otras posibilidades. En todos los casos se debe recordar que tales tratamientos pueden herir la semilla y causar plántulas anormales o moribundas. Por lo tanto se deben establecer procedimientos apropiados en relación con concentraciones y duración de los tratamientos de semillas. Los riesgos a la salud de los técnicos que obligan a usar máscaras contra el polvo y guantes, es también un factor importante a considerar.

6.7 Pruebas de calidad de las semillas

En la prueba de germinación se determina la capacidad de germinación del lote de semillas bajo condiciones óptimas para la germinación.

Las semillas que muestran un buen desempeño en la prueba de germinación pueden sin embargo desarrollarse pobremente en un ambiente estresante, indicando que la calidad o el vigor de la semilla es baja. Existen diversas pruebas para determinar estas diferencias de calidad o vigor (Poulsen 1993). Estas pruebas cubren desde la exposición de las semillas a condiciones de envejecimiento (Ej: alta temperatura y humedad), temperaturas no óptimas para germinación, prueba de agotamiento (sin iluminación durante la germinación) prueba de Hiltner (se cubren las semillas con una capa de 3-4 cm de grava), conductividad de (eluates) (la semilla se remoja en agua con iones, azúcares, etc, se deja escurrir dentro del agua, esto se mide como un incremento en conductividad; a más baja calidad de la semilla, mayor escape o fuga) (ISTA 1987, Poulsen 1993) Muchas de estas pruebas simulan algunos factores de estrés a los cuales la semilla estará expuesta una vez sembrada en el campo o vivero. En comparación con la prueba de germinación bajo condiciones óptimas, las pruebas de calidad tienden a dar una estimación más realista del desempeño en el campo.

7. PRUEBAS INDIRECTAS DE VIABILIDAD

Una prueba de germinación dura de tres a cuatro semanas, y si se requiere un tratamiento para romper la latencia, la prueba puede tomar varias semanas más. En algunos casos se necesita una estimación rápida y una prueba indirecta de viabilidad puede ser realizada. El objetivo de estas pruebas es:

- Hacer un estimado rápido de la viabilidad de las muestras de semillas en general y las que muestran latencia en particular.
- Para muestras que al final de la prueba de germinación revelan un alto porcentaje de semillas con latencia, para determinar la viabilidad individual de las semillas con latencia o la viabilidad de una muestra de trabajo (ISTA 1993).

7.1 Prueba de corte

La prueba de viabilidad más simple y rápida es la inspección ocular de las semillas que se han abierto con un cuchillo o bisturí. Si el endospermo es de color normal y la textura con un embrión bien desarrollado, se espera que tenga buena probabilidad de germinar. La prueba siempre se debe realizar pues ofrece información valiosa y una primera impresión sobre la calidad, pero la prueba tiende a sobreestimar la viabilidad.

7.2 Prueba topográfica tetrazolium

El método de TZ indica áreas vivas y muertas del embrión y el endospermo mediante tinción o coloración. El producto químico 2,3,5 – trifenil tetrazolium cloride (o alternativamente bromide) reacciona al ion de hidrógeno para formar trifenil formazan rojo. Los iones de hidrógeno se producen solamente en áreas de la semilla donde las enzimas de hidrogenasa están activas, consecuentemente sólo estas áreas se ponen rojas. En algunos casos una gama de colores desde el rojo profundo hasta el rojo pálido, así como una gama de patrones de tinción se podrán encontrar y la interpretación correcta requiere experiencia. En términos generales el método de TZ sobrestima la viabilidad.

La semilla se imbebe para activar las enzimas (semillas de testa dura pueden requerir escarificación) y luego sumergirlas a 25 –30°C en una solución del químico por 6-24 horas dependiendo de la especie. La testa en la mayoría de los casos se debe quitar antes del remojo, y podría ser necesario un corte adicional en el embrión para permitir que la solución penetre (Gordon *et al* 1991, ISTA 1993). No se debe permitir que la luz llegue a la prueba puesto que la solución no es estable ante la iluminación. La semilla se lava completamente después de la tinción y se evalúa el patrón de la tinción.

7.3 Método de peróxido de hidrógeno

La principal ventaja de este método es su simplicidad. El procedimiento se muestra en la fig. 10. Al final de la prueba se cuentan las semillas con radículas mayores de 1mm.

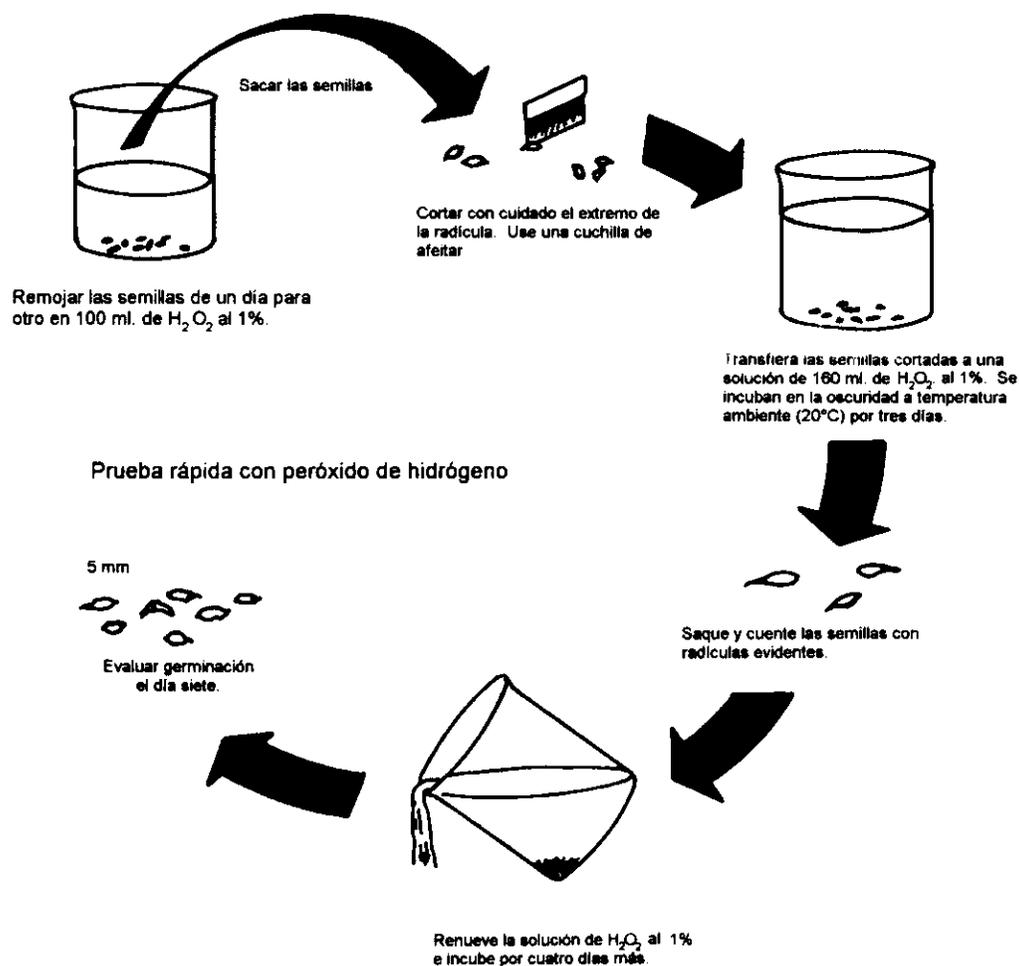


Figura 10. Procedimiento de la prueba de peróxido de hidrógeno (fuente: Leadem (1984))

La base bioquímica de la prueba de H_2O_2 es aún incierta pero se cree que el H_2O_2 amplía las fases tempranas de germinación incrementando el nivel de oxígeno en el ambiente y por tanto estimulando la respiración.

Una muestra de unas 300 semillas se sumerge de un día para otro en una solución al 1% de H_2O_2 , se abre un pequeño hueco en el extremo radicular de la testa de la semilla, se colocan 50 semillas en cada uno de los cuatro beakers con 150 ml de la solución al 1% de H_2O_2 , colocados a la oscuridad en temperaturas alternas 20/30°C. Se cuentan las semillas con mejor crecimiento (en grupos de longitud de la radícula de 0-5 mm y > 5mm) y la solución se enfria después de 3-4 días; la prueba concluye después de 7-8 días (Bonner 1974).

7.4 Prueba de separación del embrión

El objetivo de esta prueba es acelerar la germinación de ciertas clases de semillas que germinan lentamente o muestran latencia en una prueba de germinación. Para semillas con una latencia muy profunda impuesta por las envolturas del embrión, esta prueba ofrece un rápido estimado sobre su viabilidad.

La prueba se realiza en 400 semillas, permitiendo semillas adicionales para reemplazar embriones dañados durante el proceso de separación. Se imbebe la semilla (se escarifica si es necesario) seguido por la separación del embrión. Las condiciones de trabajo se deben mantener moderadamente asépticas mediante la limpieza de los instrumentos y el área de trabajo con solución de alcohol al 70 %. El fruto o la semilla también se debe lavar en una solución 5% de Na OCl por 15 minutos y luego lavar completamente en agua antes de la separación.

Los embriones se colocan en platos petri sobre papel filtro y se incuban a una constante de 20-25°C hasta por 14 días con al menos 8 horas de luz por día y evaluación en forma regular.

7.5 Prueba de rayos-x

El objetivo de la prueba de rayos-x es proveer un método rápido no destructivo entre semillas vacías y completas dañadas físicamente por insectos en sus características morfológicas evidentes en una radiografía de rayos-x. El método también se puede usar para estudiar el desarrollo y estructuras anormales internas.

El método se puede usar con o sin un agente contrastante por ejemplo Ba Cl o cloroformo. Cuando se usa un agente contrastante, la semilla imbebe el agente pero sólo en tejidos muertos permiten entrar al agente. Estas partes del tejido absorben la radiación de los rayos-x en forma más intensa y se presentan más claras en la película. La ventaja del método de contraste es una interpretación mejor, pero la semilla se destruye.

Los costos de una máquina de rayos-x, la película y el equipo de procesamiento son altos y esta inversión se debe hacer sólo si otros métodos de prueba de semillas son insuficientes o si el equipo se requiere para propósitos de investigación.

El personal que opera el equipo de rayos-x debe dominar las instrucciones y seguir las reglas de seguridad.

8. PRUEBA DE SANIDAD DE LA SEMILLA

El objetivo de esta prueba es determinar el estado de sanidad de un lote de semillas y por tanto lograr información que se pueda usar para comparar el valor de los diferentes lotes (ISTA 1993). La prueba de sanidad es importante por las siguientes razones:

1. El inoculo de la semilla puede dar origen a un desarrollo progresivo de enfermedad en el vivero o en el campo y reducir el valor comercial del cultivo.
2. Los lotes de semillas importadas pueden introducir enfermedades en nuevas regiones. Por tanto las pruebas son necesarias para cumplir con los requerimientos de cuarentena.
3. Las pruebas de sanidad de semillas pueden explicar la evaluación de las plántulas y las causas de su pobre germinación o crecimiento en el campo y por tanto una prueba adicional de germinación (ISTA 1993).

La sanidad de la semilla se refiere principalmente a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades, tales como hongos, bacterias, virus y animales plagas tales como gusanos e insectos.

Se requiere un amplio conocimiento de patología y entomología para determinar los organismos causantes de enfermedades en un lote de semillas. Pocos laboratorios especializados en pruebas de semillas forestales se interesan por realizar pruebas para detectar la presencia de enfermedades que se desarrollan en las semillas. Esta falta de pruebas de sanidad en semillas forestales se debe al escaso número de organismos conocidos como dañinos y por los cuales se han establecido medidas cuarentenarias. Protección o fumigación de las semillas en estaciones de cuarentena se ofrece usualmente como medida de precaución y no basada en pruebas sanitarias.

En las reglas del ISTA se dan instrucciones generales sobre pruebas sanitarias de las semillas y procedimientos para especies particulares y sus patógenos se encuentran en Jorgensen. (s.f).

9. REGISTRO, CALCULO Y USO DE LOS RESULTADOS

Para uso en el laboratorio de pruebas de semillas, así como documentación para cualquier otro propósito, un registro claro y preciso debe ser una norma para cualquier resultado. En anexos 2a y 2b se dan ejemplos de formatos. Laboratorios de prueba oficiales del ISTA pueden extender "certificados internacionales de análisis de semilla" a solicitud. Estos formatos especiales se obtienen a través del ISTA. Un ejemplo de éstos se encuentra en el apéndice 2c.

Cuando las semillas son para uso en vivero, se deben hacer cálculos sobre los resultados de laboratorio. En los siguientes ejemplos se presentan algunas ecuaciones estándares.

Semillas vivas por gramo:

$$\frac{1000}{1000 \text{ p.s.}} \times \frac{\% \text{ germinación}}{100} \times \frac{\% \text{ pureza}}{100} = \text{Semillas vivas por gramo}$$

Ejemplo:

Peso de 1000 semillas:	12 g
Germinación:	90%
Pureza:	95%

$$\frac{1000}{12\text{g}} \times \frac{90}{100} \times \frac{95}{100} = 71 \text{ Semillas vivas por gramo}$$

Densidad de siembra en la cama de semilla:

El número de metros cuadrados de una cama de semillas necesaria para un kg de semilla:

$$\frac{\text{Semillas vivas/kg}}{\text{plantas / m}_2} = \text{m}^2 \text{ cama de semilla}$$

El resultado de la prueba de germinación usado en el cálculo se basa en las condiciones óptimas de laboratorio. Por tanto se debe incluir una reducción en la ecuación. Este factor se conoce con frecuencia como "porcentaje de plantas" y se basa en la experiencia del vivero. Es realista esperar que solamente un 50-75% de las semillas vivas sembradas en una cama de semillas se convierta en plántulas.

Ejemplo:

Semillas vivas/kg:	71000
Plantas / m ² :	500
% plantas:	75

$$\frac{71000}{500} \times 0.75 = 107 \text{ m}^2 \text{ cama de semilla/kg de semilla}$$

Gramos de semilla necesarios para una plantación de 1 ha

No todas las plantas establecidas en la cama de siembra sobreviven en una plantación. Pueden ocurrir pérdidas durante la realización de incisiones, en la cama de trasplante, al plantarlas en la plantación, y lo usual es 10-25% por reemplazo en la plantación. En total la magnitud de pérdidas en vivero y en la plantación se pueden tomar en consideración incluyendo un factor no menor de 2 en la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{No. de plantas/ha}}{\text{semillas vivas/g}} \times 2.2 = \text{g de semilla/ha de plantación}$$

Ejemplo:

No. de plantas/ha:	1111 (=espaciamiento 3 x 3m)
Semillas vivas/g:	71
Factor de reducción:	2.2

$$\frac{1111}{71} \times 2.2 = 34 \text{ g de semilla/ha de plantación}$$

LITERATURA SELECCIONADA

- Barner, H.; Olesen, K. 1984. Seed Crop Evaluation. Danida Forest Seed Centre. Technical Note 19.
- Bonner, F.t. 1974. Seed testing. *In: Seeds of Woody Plants in the United States, Agriculture handbook No.450. USDA For. Serv., Washington D.C.*
- Czabator, F.J. 1962. Germination value: An Index Combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science* 8: 386-396.
- Gordon, A.G., Gosling, P.; Wang, B.S.P. 1991. Tree and shrub seed handbook. ISTA, Switzerland.
- Grabe, D.F. 1989. Measurement of Seed Moisture. *In: Stanwood, P.C. & McDonald, M.B. (eds) Seed Moisture. Madison, Wisconsin, USA. CSSA Special Publication No. 14:69-92.*
- ISTA. 1987. ISTA Handbook of Vigour Test Methods. 2 nd ed. ISTA, Switzerland.
- ISTA. 1993. International Rules for Seed Testing Rules 1993. *Seed Science & Technology*, 21, Supplement.
- Jorgensen, J. (ed.). Continuously updated. Handbook on seed health testing, sect. 2. Working sheets. Each dealing with one pathogen on one host. ISTA, Switzerland.
- Krishnapillay, B. & Marzalina, M. 1993. A statistical approach to determine sample size for moisture content determination in recalcitrant forest tree seeds. *FAO, Forest Genetic Resources Information* 21:22-28.
- Leadem, C.L. 1984. Quick Tests for Tree Seed Viability. British Columbia, Ministry of Forests and Lands, Research Branch. Report no.18.
- Poulsen, K.M. 1993. Calidad de la semilla. CATIE. Danida Forest Seed Centre, Lecture Note C-14. 1999.
- Scholer, E.; Lauridsen, E.B. 1988. Moisture content – calibration of moisture meters. Danida Forest Seed Centre, Technical Note 37.
- Stanwood, P.C.; McDonald, M.B. (eds.) 1989. Seed Moisture. CSSA Special Publication Number 14.
- Stubsgaard, F. 1990. Humedad de semillas y principios de secado. Danida Forest Seed Centre, Lecture Note C-5. CATIE. Serie Técnica. Manual Técnico No.24: 1-37, 1997.
- Stubsgaard, F.; Baadsgaard, J. 1989. Planeación de recolección de semillas. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-3. CATIE. Material de Enseñanza No.38: 1-26, 1997
- Thomson, J.R. 1979. An introduction to seed technology. The Edinburgh School of Agriculture.
- Turnbull J.W. 1975. Forest Tree Seed Testing. Div. Of Forest Research, CSIRO, Canberra, Australia. *In: FAO/DANIDA Training Course on Forest Seed Collection and Handling, Thailand.*
- Willan, R.L. 1985. A Guide to Forest Seed Handling. FAO. Forestry Paper 20/2.
- Willan, R.L. 1990. Seed Pretreatment. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-10.

ANEXOS

Anexo 1

Rangos máximos tolerados entre cuatro réplicas de 100 semillas en una prueba de germinación (prueba de doble vía a un nivel de significancia de 2.5%).

Esta tabla indica el nivel máximo (Ej: diferencia entre máximo y mínimo) en porcentaje de germinación tolerable entre réplicas, permitiendo variación de muestreo al azar sólo a una probabilidad de 0.025. Para encontrar el nivel máximo tolerado en cualquier caso calcule el porcentaje promedio, al número entero más cercano, de las cuatro réplicas: si fuera necesario, forme réplicas de 100 semillas combinando las sub-réplicas de 50 o 25 semillas que estuvieran más próximas en el germinador. Localice el promedio en la columna 1 o 2 de la tabla y lea el nivel máximo tolerado opuesto en la columna 3.

Las tolerancias son extraídas de la tabla G1, columna D. (Miles 1963).

Germinación (%promedio)			Nivel máximo		
			Germinación (% promedio)		
1	2	3	1	2	3
99	2	5	87 a 88	13 a 14	13
98	3	6	84 a 86	15 a 17	14
97	4	7	81 a 83	18 a 20	15
96	5	8	78 a 80	21 a 23	16
95	6	9	73 a 77	24 a 28	17
93 a 94	7 a 8	10	67 a 72	29 a 34	18
91 a 92	9 a 10	11	56 a 66	35 a 45	19
89 a 90	11 a 12	12	51 a 55	46 a 50	20

Fuente: ISTA (Reglas internacionales para prueba de semillas) Reglas 1993.

Anexo 2a

Centro de Semillas Forestales de Danida	Datos sobre Calidad de la Semilla
---	-----------------------------------

Especie:	No. de Acceso:	/
	* Germinación:	%
Fecha de inicio del tratamiento:	* Peso 1000 semillas:	gr
Pre-enfriamiento: °C Días	* Pureza:	%
Pre-tratamiento:	* Humedad:	%
Fecha de inicio de siembra:	* Insectos (rayos X):	%
Medio:	Gérmenes por gramo:	
Temperatura: / °C	* TZ rojo puro:	%
Luz/oscuridad: / horas	* Corte, fresco:	%
Días de germinación: días	* Rayos X, fresco:	%
Comentarios		
Fecha:	* Resultados copiados del reverso	
Firma:	Prueba No.	/

DFSC Agosto 1999

Fuente: Estación de Investigación Forestal, Alice Holt, UK
HOJA DE PRUEBA COMBINADA DE SEMILLAS

Prueba No. _____ Especie _____ Recibido de _____
 Identif. No. _____ Origen _____
 Muestra No. _____ Can No. _____ Representando _____ kg. Fecha _____

Fecha							Eliminación de moho	Anormal	Muerta	Vacía	Fresca	No de semillas	Teñida Fresca
Días	0	7	14	21	28	35							
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													
Total													
%													

Comentarios:	Prueba Método	Pre-tratamiento	Germinación	Contenido de humedad	
	Temp. °C			A	%
	Temp. °C	B	%		
	Tiempo	C	%		
				Ave.	%

Variación de germinación

Tolerancia

PUREZA	Fecha:	TETRAZOLIUM/CORTE				Fecha:									
		Peso g	A %	Peso g	B %	No semillas	Réplicas	CLASIFICACIÓN							
Composición de la muestra							A	A sp	B	B sp	C	D	E	A+B	Peso de la semilla
Semilla pura						1								 x 50/100 semilla
Semilla de otros cultivos						2									1.
Materia inerte						3									2.
Peso total de la muestra						4									3.
Peso original de la muestra						%									4.
															5.
															6.
															7.
															8.

Semilla pura %
 Semilla de otros cultivos:
 Materia inerte:

Peso de 1000 semillas puras.....g
 Peso de 1000 semillas sin clasificar.....g
 No. de semillas puras por kg.....g
 No. de semillas germinables por kg.....g

Comentarios:

INFORME (Cantidades subrayadas en rojo)
 FINAL/INTERINO Fecha:.....
 EN DOS METODOS
 Sin enfriamiento.....+.....=% Latencia.....%
 Enfriamiento.....+.....=% Vacías.....%
 Promedio.....+.....=%
 Firma.....
 Entrada en el libro mayor.....



ISTA
ORANGE INTERNATIONAL SEED LOT CERTIFICATE
BULLETIN INTERNATIONAL ORANGE DE LOT DE SEMENCES
INTERNATIONALER ORANGE-BERICHT ÜBER EINE SAATGUTPARTIE

Stamp of Station
 Cachet de la Station
 Stempel der Station

(See back - Voir au verso - Rückseite beachten)

Anexo 2c

STATED BY APPLICANT - INFORMATIONS DU REQUÉRANT - ANGABEN DES ANTRAGSTELLERS

Without responsibility of the station - Sans responsabilité de la station - Ohne Verantwortung der Saatgutprüfstelle

Name of applicant
 Nom du requérant
 Name des Antragstellers

Species, cultivar, category, weight of lot etc.
 Espèce, cultivar, catégorie, poids du lot, etc.
 Art, Sorte, Kategorie, Gewicht der Partie usw.

OFFICIAL INFORMATION - INFORMATIONS OFFICIELLES - AMTLICHE ANGABEN

Issuing station
 Station qui délivre le bulletin
 Ausstellende Saatgutprüfstelle
 Sampling and sealing agency
 Organisme d'échantillonnage et de plombage
 Probenahme- und Plombierungsstelle
 Official marks of lot
 Marques officielles du lot
 Amtliche Kennzeichnung der Partie
 Official seal of lot
 Plomb officiel du lot
 Amtliche Versiegelung der Partie

Status of Certificate
 Nature du Bulletin
 Status des Berichts

Number of containers Nombre de contenants Anzahl der Behälter	Date of sampling Échantillonnage effectué le Datum der Probenziehung	Date sample received Échantillon reçu le Eingangsdatum der Probe	Date test concluded Analyse terminée le Datum des Prüfungsausschlusses	Test number No de l'analyse Untersuchungs-Nr.
---	--	--	--	---

ANALYSIS RESULTS - RESULTATS DE L'ANALYSE - UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

SPECIES - ESPÈCE - ART (Latin name - Nom latin - Lat. Name):

PURITY - PURETÉ - REINIGKEIT			GERMINATION - KEIMFÄHIGKEIT						MOISTURE CONTENT (wet basis) TENEUR EN EAU (poids humide) FEUCH- TIGKEITS- GEGHALT (Frischeinwaage) %
% Weight - % en poids - % Gewicht			Number of days	% Number - % en nombre - % Anzahl					
Pure seeds	Inert matter	Other seeds		Normal seedlings	Hard seeds	Fresh seeds	Abnormal seedlings	Dead seeds	
Semences pures	Matières inertes Unschäd- l. Verunrei- nigungen	Semences d'autres plantes	Nombre de jours	Germes normaux	Graines dures	Graines fraîches	Germes anormaux	Semences mortes	
Reine Samen		Andere Samen	Anzahl Tage	Normale Keimlinge	Harte Samen	Frische Samen	Anomale Keimlinge	Tote Samen	

Kind of inert matter - Nature des matières inertes - Art der unschädlich. Verunreinigungen

Other seeds - Semences d'autres plantes - Andere Samen / Species Latin names - Espèces Nom latins - Arten Lat. Namen

OTHER / AUTRES DÉTERMINATIONS - WEITERE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

(See also additional observations on back - Voir aussi observations complémentaires au verso - Siehe zusätzliche Bemerkungen auf Rückseite)

Place and country - Localité et pays - Ort und Staat	Date - Datum	Signature - Unterschrift
--	--------------	--------------------------

See declaration on back - Voir déclaration au verso - Siehe Erklärung auf der Rückseite



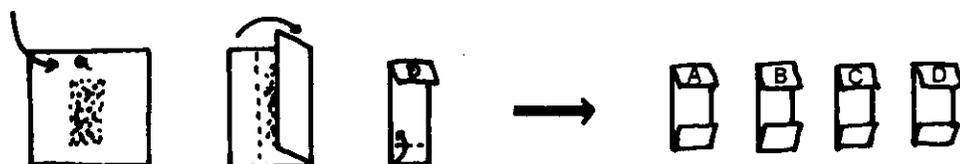
Reg. No.
Reg.-Nr.

ISTA

Germinación en paquetes de papel enrollado

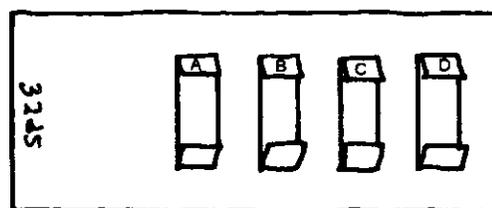
100 semillas + agua

doble como se muestra



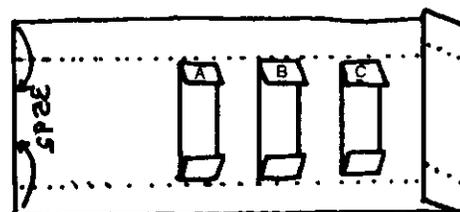
Papel secante de 24 x 24 cm

Ponga cuatro réplicas en un pedazo de papel secante.

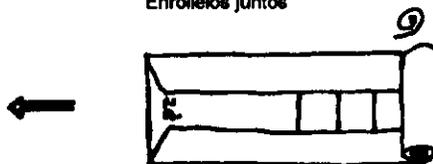
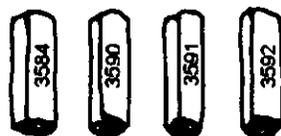


Papel secante de 35 x 70 cm.

Agregue agua otra vez y doble según este ejemplo



Enrollos juntos



Ponga los rollos en una bolsa plástica dentro de una cámara de germinación.

o en un tanque Copenhagen bajo un pliego de plástico

