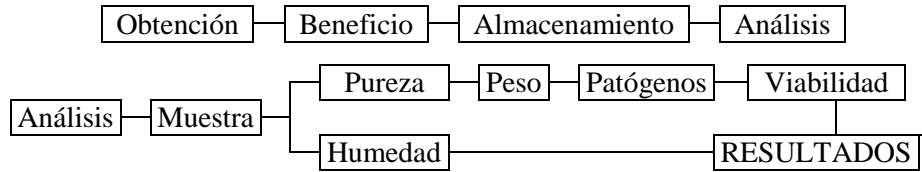


Normas Principales para las Pruebas Rutinarias de Semillas Forestales (Basadas en Normas Internacionales ISTA)

I.- Flujo de Semillas para Análisis Rutinarios



II.- Obtención

La obtención de las semillas puede ser de manera indirecta o directa, indirectamente por compra, intercambio o donación; la forma directa implica la recolección en campo, la cual puede hacerse directamente en la copa de los árboles o en el suelo, condicionada ésta por la dehiscencia del fruto y forma de dispersión de las semillas, así como, por el tipo de estudio que se desee realizar, en el caso de estudios genéticos es imprescindible la obtención directa de la copa. Para el caso de recolección en el suelo, se recomienda preparar patios debajo del árbol, los cuales deben realizarse tomando en consideración la dirección del viento. La recolección directa del árbol implica, en algunos casos, escalarlo para alcanzar los frutos.

III.- Beneficio

Es el proceso de extracción y limpieza de las semillas, su grado de dificultad está directamente relacionado con el tipo de fruto (seco-carnoso) y su dehiscencia. En el caso de los frutos secos indehiscentes implica en extracción netamente manual, ya que el beneficiador debe abrir el fruto con alguna herramienta para la extracción de las semillas. En el caso de frutos secos dehiscentes, se debe considerar una fase de secado para promover la apertura de los mismos, una vez abiertos, la extracción de las semillas se realiza por simple agitado o golpeado suave de los frutos. Los frutos carnosos son los más difíciles, en algunos casos se hace necesario el uso de máquinas especiales, como es el caso de la descerezadora de café para el beneficio de la semilla de melina.

IV.- Almacenamiento

Consiste en colocar las semillas en lugares adecuados para su conservación, en condiciones de almacenamiento en ambiente natural se deben colocar en lugar ventilados y donde la radiación solar no llegue directamente. En condiciones controladas de nevera o cuarto frío, se debe mantener una temperatura aproximada de 4 °C y una humedad relativa no mayor de 30%. El almacenamiento al vacío en condiciones controladas puede ser una alternativa para semillas recalcitrantes.

V.- Análisis

5.1.- Toma de Muestras

5.1.1.- Objetivos: Obtener una muestra de tamaño representativo de las variantes del Lote general.

5.1.2.- Procedimiento: La toma de muestra puede hacerse con sondas especiales o a mano. El primer método es adecuado para lotes grandes (sacos, tambores) y el segundo para lotes medianos a pequeños (botellas, latas). La sonda para cada muestra consiste en un tubo hueco dentro de una cubierta externa con su extremo basal puntiagudo.

Tanto el tubo interno como la cubierta poseen ranuras, teniendo movimientos giratorios, de manera tal que coincidan las ranuras y así permitir la entrada de semillas. La introducción de la sonda al lote de semillas se hace con las ranuras desfasadas, una vez dentro del lote se busca la coincidencia de las ranuras para la toma de la muestra, para la extracción se deben desfasar las ranuras para evitar la pérdida de semillas.



Sondas para la Toma de Muestras de Semillas

El tamaño de la sonda varía según el tipo de semilla y la capacidad del envase a muestrear. El tamaño de las sondas puede variar entre 50 centímetros y tres metros de longitud, siendo las más utilizadas, para contenedores

relativamente pequeños, sondas entre 50 centímetros y un metro, con seis a 20 ranuras distribuidas equidistantemente a lo largo de su longitud.

El muestreo puede realizarse a mano cuando se cuenta con lotes pequeños, sacando la totalidad de semillas del envase y amontonándola sobre una superficie lisa, luego con la mano extendida y los dedos un tanto cerrados, se obtiene, en diferentes direcciones, las porciones de semillas que son retenidas entre los mismos, la cantidad de porciones de semillas así obtenidas y mezcladas se conoce como muestra compuesta. El tamaño en sí de las muestras dependerá del tamaño de las semillas y de las pruebas a realizar.

5.2.- Prueba de Pureza

5.2.1.- Objetivo: Determinar la composición en peso de la muestra que caracterice al lote general, e identificar sus diferentes componentes.

5.2.2.- Procedimiento:

a. Se toma una muestra que equivalga en peso a por lo menos 2500 semillas y que variará de un mínimo de 0,5 g a un máximo de 1 kg. A fin de estimar el peso de la muestra, se pesan 100 semillas puras y con base en ello se infiere el peso de las 2500 semillas.

b. La muestra se divide en dos sub-muestras (A y B) A cada una se le hace lo siguiente:

b.1. Clasificar sus componentes en tres partes:

b.1.1. Semillas Puras: se refiere a la especie identificada en el contenedor, si no existe identificación, será la predominante en la muestra. Incluye semillas intactas, frutos enteros no extraíbles y pedazos de semillas o frutos no extraíbles de un tamaño igual o mayor a la mitad de su original.

b.1.2. Otras Semillas: incluye partes similares a la anterior pero de otras especies botánicas bien diferenciadas.

b.1.3. Materia Inerte: incluye cualquier porción diferente a lo contemplado en los casos anteriores, tales como arena, piedras, hojas, restos de corteza, flores, partes de frutos extraíbles, parte de frutos o semillas no extraíbles menores a la mitad de tamaño original.

b.2. Pesar cada componente, en gramos hasta una aproximación de un decimal. Si la sub- muestra es menor a un gramo, se aproximará al segundo decimal. La suma de los tres pesos constituyen el peso de la sub-muestra (Ps).

b.3. Con el peso de la semilla pura (Pp), se calcula el Coeficiente de Pureza (CWo) por medio de la fórmula: $CP_i\% = (Pp_i / Ps_i) \times 100$; Donde: i = Sub-muestra (A o B).

c. Se calcula la diferencia (d) entre los Coeficientes de Pureza de ambas sub-muestras (valor absoluto): $d = |CPA\% - CPB\%|$

d. Se calcula la tolerancia según: $T = 0,6 + 0,2 \times \frac{(p \times q)}{100}$

Donde: p = CP% Promedio = $(CPA\% + CPB\%) / 2$ y q = $100 - p$

e. Conclusión: si “d” resulta menor que “T”, entonces “p” es el Coeficiente de Pureza representativo del Lote, Caso contrario ($d > T$), se deberá repetir el procedimiento hasta lograr que $d < T$. Las semillas de otras especies y el material inerte se expresan en forma porcentual.

5.3.- Prueba de Organismos Patógenos

5.3.1.- Objetivo: Determinar el estado fitosanitario de la muestra, y por inferencia del lote general.

5.3.2.- Procedimiento: La muestra usada en la prueba de pureza puede utilizarse, en su totalidad, o en parte, para esta prueba. Si se usan porciones de la muestra, se deberá tomar un mínimo dos replicaciones, equivalente al peso de 400 semillas puras.

La muestra o sub-muestras pueden evaluarse de diferentes formas, dependiendo de: conocimientos del personal, equipo disponible y sensibilidad requerida de la prueba. Influyen también, el patógeno a investigar y la especie vegetal. En general, se reconocen tres métodos básicos:

a. Examen de las Semillas sin Incubación: es de uso común, aún cuando no da indicación muy cierta de viabilidad del patógeno, a menos que el organismo (p.e. insectos) se localice directamente. Puede hacerse: Por examen directo, con o sin lupa, buscando la presencia del cuerpo de los patógenos o de vestigios de ataques (decoloraciones, orificios, etc.); Por examen de semillas con inmersión en un líquido dado (agua u otro). Esto permite hacer más aparente cualquier vestigio de ataque y también permite la liberación de esporas (en el caso de hongos).

- b. Examen de semillas con incubación: se realiza *en* un medio apropiado (arena, agar, etc.), permite detectar al patógeno en proceso de desarrollo.
- c. Examen de Plantas: requiere la germinación de la semilla; se presta más para la detección de bacterias hongos o virus. El procedimiento puede hacerse observando directamente las plantas obtenidas de semillas del lote o inoculando plantas saludables, con material proveniente del lote.

Los resultados se expresan como porcentaje del número de semillas afectadas o usando una escala más o menos arbitraria que dé una idea general del estado sanitario del lote. Una de las escalas usadas es:

0: Lote Sano: sin vestigios de ataque.

1: Ataque en Potencia: Sin vestigios de ataque en semillas puras, pero presentes en otras semillas o componentes del lote.

2: Ataque Ligero: Hasta un 30% de semillas puras con vestigios de ataques.

3: Ataque Severo: 30% o más de las semillas puras con vestigio de ataques.

4: Ataque en Desarrollo: Presencia de patógenos vivos.

5.4.- Prueba de Peso

5.4.1.- Objetivo: Determinar el número de semillas puras por unidad de peso, usualmente en kilogramos, de la muestra, y por inferencia del lote general.

5.4.2.- Procedimiento: De la muestra usada en la prueba de Pureza, separar ocho sub-muestras de 100 semillas puras.

a. Pesar cada sub-muestra individualmente, en gramos con aproximación a uno o dos decimales. Si la muestra pesa menos de un gramo, se aproxima a dos decimales.

b. Calcular el coeficiente de variación (CV%) para los ocho pesos de las sub-muestras.

c. Si el CV% resulta menor o igual a 4%, se puede calcular la cantidad de semillas por kilogramo o un valor de peso representativo del lote, usando el peso medio de las ocho sub-muestras. Si el CV% es mayor de 4, deberán tomarse ocho sub-muestras adicionales y repetir el procedimiento con las 16 sub-muestras. El procedimiento se repetirá hasta lograr que el CV% sea igual o menor a 4. Si el peso de una de las sub-muestras difiere de la media en más de dos veces la desviación estándar, ésta será descartada y reemplazada por una nueva.

5.5.- Pruebas de Viabilidad

5.5.1.- Objetivo: Determinar en forma rápida la viabilidad de las semillas de una muestra, y por inferencia del Lote.

5.5.2.- Métodos Indirectos:

5.5.2.1.- Método Bioquímico: Existen diferentes métodos de variadas precisiones. Internacionalmente se recomienda la Prueba Bioquímica, que da evidencia de los procesos de reducción que tienen lugar en células vivas, mediante una sustancia indicadora.

Generalmente se utiliza una solución acuosa al 1% de Cloruro o Bromuro de Tetrazolio (10gr.de la sal en 1000 cc de agua destilada). En forma corriente se usa el 2-3-5 Trifenil Cloruro Tetrazolio. La prueba se hace con cuatro repeticiones de 100 semillas puras cada una, tomadas de la muestra usada en la prueba de pureza. La rapidez de la prueba depende de la disponibilidad de un Vitascopio. Si se dispone de este aparato, la prueba dura entre 30 y 60 minutos, siguiendo las instrucciones de manejo del mismo. Si no se dispone del equipo, se procede de la siguiente manera

a. Se cortan las semillas de manera tal de exponer el embrión al contacto directo con la solución.

b. Se colocan las semillas cortadas (una mitad de cada una) en la solución, en un ambiente de completa oscuridad a 30 °C, por un período de 18 a 24 horas.

c. Al final del período se decanta la solución, se lavan las semillas en agua destilada y se mantienen húmedas para su posterior evaluación.

Las semillas se consideran viables cuando el embrión o, parte de él, se tiñe de una coloración rosada (puede variar la coloración de pálida a intensa). Los resultados se expresan en porcentaje de semillas coloreadas con relación al total examinado. La representatividad de los valores se evalúa de la misma forma como se verá en la prueba de germinación.

5.5.2.2.- Prueba de Corte: Se corta la semilla transversalmente, exponiendo el embrión y se observa la firmeza, formación y coloración natural del mismo. Semillas sanas, presumiblemente viables, son de color blanco intenso a

rosado con embrión bien formado. Se admite aún como viable, coloraciones amarillo pálido. Coloraciones amarillo intenso a grisáceo en diferentes tonalidades, se adscriben a estado no viables, ya que indican degeneración avanzada o muerte total del embrión. Para la realización de esta prueba se toman cuatro sub-muestras de 25 semillas cada una, se separan semillas viables de no viables, y se calculan los porcentajes individuales y promedios respectivos. Generalmente no se le hace prueba de tolerancia.

5.5.2.3.- Prueba de flotación: De uso común en muchas leguminosas, y en general para semillas de tamaño mediano a medianamente grandes (0,5 a 1 cm). Consiste en introducir la muestra de semillas en agua u otra sustancia de densidad conocida, y observar su comportamiento inmediato. Se toman cuatro sub-muestras de 25 semillas cada una, se introducen en agua y se cuenta el número de semillas sumergidas, expresando el resultado en porcentaje.

5.5.2.4.- Prueba de Rayos X: Se toma un mínimo de dos placas para muestras de 50 a 100 semillas y se observa la conformación interna de las mismas. Con ello es posible determinar el estado de desarrollo del embrión y el vestigio de ataques de patógenos. Si el embrión tiene la mitad o menos de su tamaño normal (de acuerdo a un testigo), se considera la semilla como no viable. El resultado se expresa porcentualmente.

5.5.3. Método directo: (Prueba de Germinación)

5.5.3.1.- Objetivo: Determinar el valor productivo del lote de semillas, conociendo la proporción de plantas efectivas con relación al número de semillas sembradas en la muestra.

5.5.3.2.- Procedimiento: De la muestra usada en la prueba de pureza se separan 400 semillas, y se distribuyen en repeticiones (4 x 100, 8 x 50 ó 16 x 25), se siembran en un sustrato bajo condiciones de temperatura, humedad y luz adecuados. Como sustrato puede usarse papel absorbente, algodón, arena o tierra. Si se usan de los dos primeros, la prueba debe llevarse a cabo en mesas o cámaras germinadoras o ambiente de laboratorio; si se usan de los últimos, el ensayo se establece perfectamente bajo condiciones de vivero o invernadero. Los resultados se expresan en porcentaje de germinación acumulada en un tiempo determinado, el cual varía dependiendo del sitio de prueba, del propósito de la prueba y de las especies. Algunas coníferas germinan más rápido y uniforme que muchas latifoliadas.

$$CG\% = (\text{Semillas Germinadas} / \text{Semillas Sembradas}) \times 100$$

Para la validez de los datos, se calculan el porcentaje promedio y la diferencia entre los valores extremos. Con el valor promedio, se busca la tolerancia máxima permitida (Cuadro 1). Si la diferencia entre el porcentaje mayor y menor es inferior a la tolerancia, el porcentaje de germinación promedio es representativo del lote, caso contrario debe repetirse la prueba. Otra causa de no representatividad de la prueba es si durante la misma ocurre un severo ataque de patógenos (principalmente hongos), que pueda afectar la germinación normal, es frecuente en pruebas en sitios artificiales o controlados (cámaras o mesas germinadoras). Se considera una semilla de germinación normal cuando hay la presencia de una radícula vigorosa, usualmente reflejada en color y tamaño, y que es capaz de lograr un desarrollo normal al colocarse en buenas condiciones de suelo.

Plántulas con defectos radicales, sin cotiledones, con quiebres u otros daños en las estructuras esenciales, se consideran anormales y no se incluyen en el porcentaje de germinación. Es permisible el uso de tratamientos especiales (pre-germinativos), como parte de la prueba de germinación, si éstos constituyen actividades normales en los programas de producción de plantas en determinadas especies.

Para ciertas especies (ej. Eucaliptos), a menudo es bastante difícil la separación de las semillas puras de las impurezas. En este caso las pruebas de germinación se hacen con base en peso. Se toman cuatro muestras de 0,01 a 0,50 gr., dependiendo del tamaño de la semilla, y la germinación se reportará en plantas por gramos sembrados.

En el caso de frutos múltiples no extraíbles, o poli-embriónicos, que producen dos o más plántulas por estructura, se reportará el número de plántulas por 1000 estructuras, convirtiéndose luego a plantas por kilogramo. De expresarse en porcentaje, pudiese resultar valores superiores al 100%, lo que habría que aclarar en la presentación de los resultados.

Cuadro 1. Valores de Tolerancia para las pruebas de germinación

Germinación Promedio	Tolerancia	Germinación Promedio	Tolerancia
99 ó 02	05	87-88 ó 13-14	13
98 ó 03	06	84-86 ó 15-17	14
97 ó 04	07	81-83 ó 18-20	15
94 ó 05	08	78-80 ó 21-23	16
95 ó 06	09	73-77 ó 24-28	17
93-94 ó 07-08	10	67-72 ó 29-34	18
91-92 ó 09-10	11	56-66 ó 35-45	19
89-90 ó 11-12	12	51-55 ó 46-50	20

5.6.- Prueba de Humedad

5.6.1.- Objetivo: Determinar el contenido de humedad de las semillas en la muestra, y por inferencia del lote, para usarlo como factor de importancia en el almacenamiento y conservación de las mismas.

5.6.2.- Método de Estufa: Consiste en secar las muestras en una estufa considerándose dos variantes: baja temperatura constante (103 ± 2 °C) y alta temperatura constante (130-133 °C). Se toman dos sub-muestras de cinco gramos cada una, se pesan, se introducen en la estufa por un periodo de tiempo determinado, se sacan y se enfría en campana de desecación para evitar que absorban humedad ambiental, y se pesa de nuevo, el procedimiento se repite hasta que los tres últimos pesajes no varíen. Se determina la diferencia entre los últimos contenidos de humedad de las sub-muestras, la cual no debe ser mayor de 0,2; caso contrario repetir el proceso.

5.6.3.- Método Balanza de Humedad: Existen balanzas para diferentes tipos de muestra. Usando el tipo de 10 g, se pesan dos sub-muestras de ese valor, se ajusta la temperatura y se colocan las semillas por un tiempo predeterminado. Con intervalos de dos minutos, se lee el registro de pérdida de humedad hasta que el peso se estabilice, lo que indica el Contenido de Humedad. La diferencia entre las dos sub-muestras no debe exceder 0,2, de lo contrario se repite la prueba.

Diferentes especies reaccionan en forma variable a la intensidad de calor suministrada (vatios), por lo que se recomienda probar diferentes intensidades y tiempos de exposición previa a la obtención práctica de resultados.

VI.- Uso de la Información del Análisis de Semillas

6.1.- La prueba de viabilidad permite justificar la conservación o eliminación de lotes mantenidos bajo almacenamiento. Así mismo, permite explicar la baja germinación de algunos lotes por problemas de latencia u otros, si esa baja germinación se contrapone a una aparente buena viabilidad demostrada por la coloración.

6.2.- La prueba de pureza permite tener una idea del tipo de recolección y/o de la honestidad del proveedor. Lotes recolectados del suelo con poca planificación, generalmente poseen alto contenido de impurezas (otras semillas y material inerte). Proveedores inescrupulosos generalmente añaden también materia inerte a los lotes para aumentar los pesos o simplifican al máximo los procesos de extracción y limpieza.

6.3.- La prueba de organismos patógenos permite detectar focos de introducción de enfermedades de otras regiones, fuentes de pobre desarrollo de plantas obtenidas en un lote dado.

6.4.- Las pruebas de peso, germinación y pureza permiten estimar la cantidad de semillas para la producción de plantas para una cuota determinada de plantación, usando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N}{CP \times CG \times S/kg}$$

Donde:

- C = Cantidad de semillas a usar en kg.
- N = Número de plantas a establecer en campo
- CP = Coeficiente de pureza (tanto por uno)
- CG = Capacidad germinativa (tanto por uno)
- S/kg = Número de semillas por kilogramo.

Tomando en cuenta las pérdidas en vivero, transporte y plantación se le puede añadir un valor de seguridad (Vs):

$$Nt = N + (N \times 0, Vs) \text{ o } Nt = N \times 1, Vs;$$

Donde: Nt = Cantidad total de plantas a producir
Vs = Valor de seguridad (Pérdidas)

Ejemplo: Un Programa de Plantación Comercial con *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, desea conocer la cantidad de semilla necesaria para cubrir una Superficie de Plantación (SP) de 12500 ha, para lo cual cuenta con la siguiente información:

Distanciamiento de Plantación: 2,7 m x 3,0 m Capacidad Germinativa (CG): 87%
 Semillas por kilogramo (S/kg): 52000 Coeficiente de Pureza (CP): 93%
 Valor de Seguridad o Pérdidas (Vs): 18%

Solución:

a. Determinar cantidad de plantas necesarias:

Densidad de Plantación (**Dp**) = $10000 \text{ m}^2/\text{ha} / (\text{d1} \times \text{d2} (\text{m}^2/\text{planta})) = 1234,57: 1235 \text{ plantas / ha}$

Cantidad de Plantas (**N**) = $\text{SP} \times \text{Dp} = 12500 \text{ ha} \times 12135 \text{ plantas / ha} = 15.437.500 \text{ plantas}$

Cantidad Total de Plantas a Producir (**Nt**) = $N + (N \times 0,18) = 15.437.500 + 2.778.750 = \mathbf{18.216.250}$

o aplicando: $Nt = N \times 1,18 = 15.437.500 \times 1,18 = \mathbf{18.216.250}$

b. Determinar cantidad de semillas a utilizar:

Cantidad de Semillas (**C**) = $Nt / (CG \times CP \times S/\text{kg}) = 18.216.250 / (0,87 \times 0,93 \times 52.000) =$

$= 18.216.250 / 42.073,2 = 432,97 = \rightarrow \mathbf{433 \text{ Kg de semillas}}$

INSTITUCIONES QUE MANIPULAN SEMILLAS

Institución	Finalidad	Obtención	Investigac.	Comerc.	Cantidad	Distribución
Laboratorio de Semillas	Apoyo a programas de investigación y docencia	Directa e Indirecta	Máxima	Muy poca a nula	Pequeña a moderada	Limitada
Banco de Semillas	Comercialización con garantía de origen y calidad	Directa e Indirecta	Moderadamente alta	Moderada	Moderadamente alta	Amplia
Casas Comerciales	Comercialización con mínima garantía de origen y calidad	Mayormente Indirecta	Mínima	Muy alta	Muy alta	Muy amplia
Centro de Germoplasma	Actividades de Recursos Genéticos	Directa e Indirecta	Moderada a alta	Nula a casi nula	Pequeña a moderada	Muy amplia
Centro de Acopio	Apoya Programas de Plantación de una Institución o grupo reducido	Indirecta por compra	Muy poca a nula	Muy poca	Grande a muy grande	Localizada; dirigida a Programas Específicos

(Basadas en las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas y adaptadas al Laboratorio de Semillas Forestales del Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Forestal. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida). Fuente: ISTA. 1976. International Rules for Seed Testing. Rules 1976 Seed Sci. & Technol. 4:3-49