
METODOS DE ANALISIS DE SEMILLAS

I. INTRODUCCION

A fin de minimizar los riesgos que implica utilizar semillas que no tienen una adecuada capacidad para producir buenas cosechas, es de fundamental importancia realizar un control de calidad y dentro de este se ven involucrados los diferentes métodos útiles y confiables para determinar las principales características de una semilla de alta calidad, es decir cuando es pura, tiene germinación, alto vigor, está libre de enfermedades y tiene buena confirmación.

Esta práctica es utilizada en forma cada vez más frecuente, ya que en general y por diversas razones, en todo los cultivos en que se requieren semillas se producen problemas que afectan tanto a productos de semillas como a técnicas y agricultores.

Este aspecto adquiere mayor relevancia aún, al considerar que la comercialización de semilla en el país y en el exterior es cada vez más exigente en la calidad demandada.

Es importante destacar que un oportuno control de calidad de la semilla repercutirá directamente en la producción y es de conocimiento que el valor de un análisis de semilla tiene una incidencia bajísima en los costos directos comparando con los futuros resultados que se obtendrán.

En el presente trabajo se muestran principales técnicas de análisis de semillas como útil herramienta en el control de calidad para la toma de decisiones inmediatas, a mediano y a largo plazo.

II. OBJETIVO

- Dar a conocer la importancia de aplicar los métodos de análisis para determinar semillas de calidad.
- Presentar las diferentes técnicas específicas utilizadas en los laboratorios de análisis de semillas, a fin de determinar los diversos atributos de estas, como la calidad genética, fisiología, física y sanitaria.
- Presentar ensayos de investigación, donde se han empleado estas técnicas a fin de respaldar su importancia.

III. ASPECTOS IMPORTANTES EN LA GERMINACIÓN

PROCESO DE GERMINACION

Es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente en un plántula.

En el proceso de la germinación puede dividirse arbitrariamente en varios eventos: (1) Embibición - el proceso físico de absorción de agua. (2) -Activación - la puesta en marcha de la maquinaria de síntesis y degradación. (3) División y elongación celular (4) Ruptura de la cubierta seminal por el embrión. (5) Establecimiento de la plántula como ente autónomo. Los efectos de esta charla nos limitaremos a considerar las relaciones del proceso de germinación con los factores ambientales que controlan la misma.

REQUISITOS PARA QUE OCURRA LA GERMINACIÓN

Asumiendo que no existen mecanismos de latencia que impidan germinación, se requiere de la concurrencia de varios factores para que el embrión contenido en la semilla reinicie su desarrollo.

A. Absorción de agua

Embibición: Es un caso especial de un fenómeno físico denominado difusión, y como tal, se da si existe una gradiente de difusión. Se caracteriza por un aumento de volumen de la sustancia o cuerpo que embibe y está íntimamente relacionada con las propiedades de materiales coloidales.

Las partículas coloidales en la semilla forman una red miscelar, medianamente rígida, en la que cargas eléctricas de signos opuestos están orientadas en una manera definida. Cuando el agua penetra en la semilla, una fracción ocupa los espacios libres y otra se une químicamente a las sustancias de que están compuestas las semillas.

El volumen de las semillas aumenta con la embibición, pero el volumen final del sistema (semilla + agua) es menor que la suma de los volúmenes individuales iniciales de semillas y agua; esta contracción del sistema es prueba de la ocupación de los espacios libres dentro de la semilla y de la absorción de agua en la matriz coloidal.

La tasa de embibición se ve afectada por varios factores que pueden determinar la respuesta a germinación de las semillas.

1. Permeabilidad de la cubierta seminal

El caso más evidente es el de semillas cuyas cubiertas son totalmente impermeables al agua, ej. semillas duras de leguminosas, de algodón, etc. Sin embargo, también se dan ejemplos en que la penetración de agua es restringida y no impedida.

2. Concentración del agua

En general, la embibición es más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que cuando el agua contiene solutos. El principio que opera es el de presión de difusión del agua. De aquí que las semillas absorben agua más lentamente en suelos secos o salinos, no solo porque hay menos agua, sino que también es causa de una menor presión de difusión del agua.

3. Temperatura

El calor es una forma de energía. Cuando se calienta el agua que está en contacto con la semilla, parte de la energía suministrada se invierte en aumentar la difusión de agua, por lo tanto, aumenta la tasa de absorción de agua, dentro de ciertos límites. Se ha encontrado experimentalmente que un aumento de 10°C en la temperatura duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de embibición.

4. Presión hidrostática

Conforme el agua penetra en las semillas, ésta provoca un aumento de volumen y presión en las membranas celulares. Igualmente, las membranas celulares oponen resistencia de igual magnitud, la que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión hacia afuera y por lo tanto disminuyendo la tasa de absorción de la semilla.

5. Área de la semilla en contacto con agua

Considerando otros factores constantes, la tasa de absorción de agua es proporcional a la magnitud del área de las semillas en contacto con el agua. En algunas clases de semilla ciertas regiones son más permeables que otras. Ejemplo: el hilo en las semillas de leguminosas.

6. Fuerzas intermoleculares

Son en general fuerzas de naturaleza eléctrica. Cualquier aumento en estas fuerzas disminuye la presión de difusión del agua y por tanto la tasa de absorción de las semillas. El efecto de estas fuerzas es más evidente en el suelo. Suelos de bajo contenido de agua sujetan tenazmente la humedad mediante fuerzas intermoleculares.

7. Diferencias entre especies

Algunas especies absorben agua más rápidamente que otras. Ejemplo: semilla de algodón absorbe agua más lentamente que la semilla de frijol.

8. Absorción diferencial por órganos de la semilla

Las semillas están compuestas de diversos órganos. Estos se pueden agrupar, arbitrariamente en las siguientes categorías:

- a) Cubierta seminal (testa, pericarpo, etc.)
- b) Tejidos nutritivos de reserva (cotiledones, endosperma, perisperma, etc.)
- c) Eje embrionario (compuesto de radícula, plúmula y estructuras asociadas).

Estos componentes absorben agua a diferentes velocidades y magnitudes. Se ha hallado que en semillas de algodón, maíz y frijol la máxima hidratación ocurre en las primeras 24 horas de embibición, y que: (a) la cubierta seminal funciona como órgano de transporte de agua, con su

curva característica de absorción; (b) el endosperma y los cotiledones absorben agua lentamente; actúan como reservorios de agua y no como estructuras activas de absorción; (c) el eje embrionario absorbe agua rápida y continuamente.

Contenido de humedad mínimo para que ocurra germinación.

Cada especie necesita absorber un cierto mínimo de humedad para que ocurra germinación.

Se ha encontrado que las semillas con alto contenido de proteína necesitan un contenido de humedad mayor que semillas con niveles bajos de proteína; esto se puede observar en los siguientes ejemplos (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de humedad necesario para que ocurra la germinación de algunas semillas de especies cultivadas.

Cultivo	Contenido de humedad
Maíz (<i>Zea mays</i>)	30.5%
Soya (<i>Glycine max</i>)	50.0%
Remolacha (<i>Beta ssp.</i>)	31.0%
Algodón (<i>Gossypium spp.</i>)	50-55.0%
Higuerilla (<i>Ricinus comunis</i>)	32-36.0%
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	32-35.0%
Avena (<i>Avena sativa</i>)	32-36.0%
Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)	50-55.0%

Adaptado de Burck, B. and J. C. Delouche. 1959. Water absorption by seeds. Proc. AOSA 49:142

Conviene aclarar que la relación suelo-semilla en lo que a absorción de agua se refiere es un tanto más complicada. La evidencia experimental enseña que el hecho de que la semilla necesite un contenido de humedad alto para germinar no implica que su germinación se retarde por esa condición. Por regla general, la velocidad de emergencia se reduce conforme la humedad del suelo se acerca al punto de marchitez; en algunas especies también se reduce el porcentaje de emergencia en condiciones de escasa humedad del suelo.

El exceso de agua puede ser tan pernicioso para la semilla como la carencia. Si el nivel de agua llega a excluir o restringir la penetración de oxígeno a la semilla, la germinación se retarda o no ocurre, en un gran número de especies. En otras no se han observado daños. Ejemplo, la germinación de semilla de arroz se puede acelerar por inmersión; por el contrario, la inmersión de semilla de frijol por períodos relativamente cortos puede causar daños reversos.

Factores misceláneos que afectan la absorción de agua.

Entre los más importantes se cuentan:

1. **Madurez.** Semilla de maíz cosechada en estado de "leche" absorbe agua más rápidamente que semillas en estados avanzados de madurez.
2. **Composición Química de la semilla.** Semillas con alto contenido de proteína absorben más volumen de agua y más rápidamente que semillas almidonosas. Semillas con altos contenidos de aceite, pero de bajo contenido de proteína se comportan parecido a semillas almidonosas.
3. **Edad.** Conforme avanzan en edad, las semillas tienden a absorber agua más rápidamente. Este fenómeno se considera asociado a la pérdida de integridad de las membranas celulares.

B. Efecto de la temperatura

El proceso de germinación, como todos los procesos fisiológicos está afectado por la temperatura. Para cada clase de semillas existe una temperatura mínima y una máxima en la que ocurre la germinación. Además, dentro del rango temperatura mínima-máxima, existe un punto en el que se obtiene máxima germinación y ésta ocurre más rápidamente; este punto corresponde

a la temperatura óptima. Estas temperaturas se conocen como las temperaturas cardinales de germinación.

Rango de temperaturas de germinación

1. Temperatura mínima. Por debajo de esta temperatura los procesos de germinación no se pueden detectar visualmente, dentro de un período razonable de tiempo.

Bajas temperaturas pero por encima del punto de congelación no son letales a las semillas.

2. Temperatura máxima. Es la temperatura por encima de la cual los mecanismos de germinación no operan y por lo tanto no se da crecimiento del embrión. En contraste con la temperatura mínima, la máxima es fácil de determinar ya que temperaturas superiores a la máxima causan daños irreversibles a las semillas (excepción a esta regla son las semillas que entran en latencia a altas temperaturas).

3. Temperatura óptima. Esta se puede definir como la temperatura a la cual se da el porcentaje máximo de germinación en un mínimo de tiempo.

Si representamos el rango de temperaturas en que ocurre germinación como línea.

Mínima óptima máxima

se pueden hacer varias observaciones:

a. En el rango temperatura mínima-óptima los porcentajes de germinación no son sustancialmente diferentes (siempre que el factor tiempo no sea limitante), pero la germinación ocurre más rápidamente conforme nos desplazamos hacia la temperatura óptima.

b. Considerando el segmento temperatura óptima-máxima, los porcentajes de germinación tienden a disminuir conforme nos desplazamos hacia la temperatura máxima; en algunas especies puede ocurrir que a temperaturas superiores a la óptima las semillas que sí germinan lo hagan más rápidamente que a la temperatura óptima. Sin embargo, la velocidad de germinación también disminuye en las cercanías de la máxima.

Temperaturas cardinales de algunas semillas

Cultivo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Arroz	10-12	30-37	40-42
Maíz	8-10	32-35	40-44
Trigo	3-5	15-31	30-43
Tomate	20	20-35	35-40
Soya	8	32	40

Condición fisiológica de la semilla

A menudo el efecto de la temperatura sobre la germinación está íntimamente relacionada con la condición fisiológica de la semilla. Semilla recién cosechada presenta requerimientos muy específicos de temperatura para poder germinar. Por ejemplo, semilla de arroz recién colectada germina mejor a 32°C que a 25°C. Este fenómeno está relacionado con latencia. Conforme se pierde la latencia, el óptimo de temperatura puede variar hacia temperaturas más altas o más bajas y el rango de temperaturas dentro de las que ocurre germinación se amplía. Con el deterioro, las semillas tienden a necesitar temperaturas específicas para que ocurra germinación.

Temperaturas alternas

Aquellos de ustedes que están familiarizados con las pruebas de germinación, saben que semillas de muchas especies se prueban alternando bajas y altas temperaturas, como por ejemplo 20-30°C 6 25-30°C, etc. Se acostumbra mantener la temperatura más baja durante 16 horas y la alta durante 8 horas.

Esta alternación de temperaturas pretende duplicar las fluctuaciones diurnas de temperatura que se dan en la naturaleza.

Interacciones

Los efectos de la temperatura sobre la germinación tienen características muy especiales cuando se trata de semillas latentes. La germinación de algunas semillas mejora notablemente bajo condiciones de baja temperatura (recordemos el método de romper latencia denominado estratificación); otras semillas responden favorablemente a tratamientos con temperaturas altas (Ejemplo: arroz).

Algunas semillas que necesitan luz para germinar ofrecen respuestas interesantes a la temperatura. Por ejemplo, la semilla de lechuga germina en la oscuridad a temperaturas menores de 20°C, pero necesitan de luz para germinar a temperaturas por arriba de 20°C.

Las giberelinas, hormonas vegetales de mucha importancia en los procesos de germinación, extiende el rango de temperaturas en la que puede ocurrir la germinación de algunas especies; la semilla de llantén (*Plantago* spp.) germina bajo luz u oscuridad a 20°C. A temperaturas superiores a 20°C necesita de luz para germinar, pero a 30°C se embibe la germinación casi totalmente, aún bajo condiciones de luz. Si la semilla se trata con una disolución de ácido giberálico (200-500 ppm) se restablece la capacidad germinativa a 30°C, con o sin la presencia de luz.

C. Presencia de oxígeno

Este es, quizás, el requisito de germinación más olvidado por los analistas de semillas. Generalmente se da por un hecho que la atmósfera suple todas las necesidades para la germinación de las semillas. Sin embargo, no se debe olvidar que entre el oxígeno y el agua se establece un proceso de competencia. Esta relación competitiva se origina de la baja solubilidad del oxígeno en agua y de las diferencias tan notables que existen entre los coeficientes de difusión del oxígeno en el agua y en el aire. La actividad respiratoria de la semilla puede controlarse por velocidad con que el oxígeno llega a los mitocondrios de las células fisiológicamente activas de las semillas. El efecto combinado de solubilidad y difusibilidad reduce la tasa de difusión de oxígeno de 0.205 ml/cm² x seg. a 6.7 x 10⁻⁷ ml/cm² x seg. De lo anterior es fácil deducir que el exceso de humedad en el sustrato de germinación (o en el suelo) reduce notablemente la disponibilidad de oxígeno a las semillas en germinación.

Las necesidades de oxígeno cambian con las diferentes fases de germinación. Se ha encontrado que la semilla de lechuga es indiferente a la presencia o ausencia de oxígeno durante la embibición, pero requiere de oxígeno durante la emergencia de la radícula. Hallazgos similares se han hecho en semilla de maíz, en la que la emergencia de la radícula puede ocurrir dentro de un rango muy amplio de concentraciones de oxígeno. Sin embargo a concentraciones de oxígeno menores que la del aire el desarrollo y crecimiento de la radícula se reduce drásticamente.

D. Luz

La exposición a la luz estimula la germinación de semillas de muchas especies silvestres y agrícolas. En la gran mayoría de los casos se estimula la germinación mediante exposición a luz roja (660 nm = 6600 Å) y se inhibe con luz de 730 nm de longitud de onda. En esta reacción a condiciones luminícas está involucrado el fitocromo. Ya habíamos mencionado que en la respuesta a la luz influye también la temperatura de germinación. Aunque está fuera del límite de esta charla discutir más profundamente las relaciones entre luz y germinación, vale la pena mencionar algunas observaciones que pueden revestir carácter práctico. Algunas semillas que normalmente no requieren de luz para germinar, ejemplo, tomate y pepino, pueden tornarse fotosensibles si se exponen a luz de 730 nm. Una vez que la germinación haya sido inhibida por exposición a esa calidad de luz, el efecto inhibitorio puede revertirse mediante exposición a luz de 660 nm.

En un gran número de especies la necesidad por luz puede ser reemplazada por tratamientos con ácido giberélico.

LATENCIA

Hasta el momento hemos descrito las condiciones ambientales necesarias para que ocurra la germinación de las semillas. A menudo sucede que algunas semillas rodeadas de lo que podría llamarse un ambiente óptimo para germinación, temperatura y agua favorables, buena disponibilidad de oxígeno, no logran germinar. Este fenómeno se denomina latencia. Debe distinguirse este término del que se utiliza para describir semillas que no germinan por carencia de condiciones ambientales adecuadas; estas semillas se denominan quiescentes.

TIPOS DE LATENCIA

1. Inmadurez del embrión

Este tipo de latencia comprende casos que van desde semillas con embriones totalmente indiferenciados hasta otras con embriones diferenciados pero que continúan su desarrollo después de que la semilla se desprende de la planta madre. De modo que en algunos casos es difícil determinar si el desarrollo posterior del embrión corresponde a etapas finales de maduración de la semilla o a la fase inicial de germinación. Por ejemplo, las semillas del fresno (*Fraxinus spp.*) están morfológicamente maduras al desprenderse de la planta original, y sin embargo continúa su desarrollo hasta aumentar al doble su tamaño antes de que sea capaz de embibir agua.

2. Impermeabilidad de la cubierta seminal

En la jerga de los analistas, las semillas con cubierta seminal impermeable al agua se denominan "semillas duras". Este tipo de latencia es muy común en la familia Leguminosae, pero se da también en Malvaceae, Chenopodiaceae, Liliaceae y Solanaceae.

La testa actúa como barrera al agua; la simple ruptura de cubierta permite la penetración del agua y la germinación ocurre sin contratiempos. Esto se puede lograr manualmente o por medio mecánicos o químicos.

3. Resistencia mecánica al desarrollo del embrión.

El origen de este tipo de latencia, impuesta por resistencia mecánica de la cubierta seminal al crecimiento del embrión, hoy día se considera casi obsoleto. En algunas especies de Rosaceae se ha encontrado que aunque es cierto que se requiere de grandes presiones para romper el duro endocarpo que envuelve a la semilla, también contribuye a imponer el estado de latencia la presencia de algunos inhibidores endógenos.

4. Baja permeabilidad a gases de la cubierta seminal.

La germinación de muchas especies de Gramíneae se favorece dañando la cubierta seminal mediante tratamiento con ácido o escarificación mecánica. Este tipo de latencia es frecuente en arroz y en semilla de muchas gramíneas forrajeras.

5. Latencia del embrión

a) Necesidad de luz.

Ya hemos mencionado que las semillas algunas especies necesitan luz para germinar. Entre estas se cuentan las semillas de tabaco y lechuga. Estas semillas sólo responden al estímulo lumínico cuando están embebidas de agua, y la respuesta está afectada por la presencia de la cubierta seminal y de la temperatura de germinación. Se ha encontrado que si los embriones se remueven de la semilla, sin causarles daño pueden germinar en la oscuridad.

b) Necesidad de enfriamiento

Las semillas de algunas especies requieren de tratamientos a bajas temperaturas (5-10°C) para poder germinar. En algunas especies la necesidad de tratamientos a baja temperatura se puede sustituir con tratamientos con ácido giberélico.

Este tipo de latencia está asociado con la presencia de inhibidores de germinación y/o con niveles endógenos insuficientes para promover germinación de ácido giberélico. El inhibidor de germinación más poderoso que se conoce es el ácido abscísico, pero existen otros como la cumarina, el ácido cafeico, el ácido ferálico, etc.. La inhibición establecida por el ácido abscísico solo puede revertirse con la aplicación de citoquininas tales como la Kinetina y la zeatina. El bloqueo establecido por los otros inhibidores se puede neutralizar con la aplicación de ácido giberélico. La aplicación de auxinas como ácido indolacético son inefectivas para neutralizar el efecto de los inhibidores de germinación.

Los tipos de latencia mencionados no son mutuamente excluyentes; algunas especies presentan dos o más tipos de latencia. Afortunadamente estos casos no se dan en las especies de valor agrícola.

6. Latencia secundaria

Algunos tipos de semillas no latentes, si se colocan en un ambiente de germinación desfavorable, pueden entrar en una fase de latencia o inducida. Por ejemplo, algunas variedades de lechuga que requieren luz para germinar, entran en estado de latencia y se convierten en fotosensibles si se les coloca a embibir agua a 35°C. Esta latencia inducida puede revertirse mediante aplicación de ácido giberélico.

IV. CARACTERISTICAS DEL MUESTREO DE SEMILLAS

El muestreo de semillas es de fundamental importancia. Se denomina lote a una cantidad específica de semillas, identificables físicamente.

Es necesario que la muestra enviada al laboratorio sea representativa del lote completo.

La toma correcta de muestras se basa en la extracción de muestras elementales, cuyo número dependerá del tamaño y peso del lote (Cuadro). Las muestras elementales deberán ser mezcladas para conformar una muestra global, de un peso mínimo, la que deberá ser enviada al laboratorio bien identificada.

El tamaño de la muestra obtenida deberá ser de por lo menos 1.000gr. para poroto, soja, maíz y otras especies con semillas de tamaño similar; de 500gr. en el caso de trigo, avena y otras semillas de tamaño similar y entre 150 a 250gr. para semillas más chicas.

Lastomas se deben realizar en los niveles superior, medio e inferior de la estiba, vagón, contenedor, etc.

Cuadro
Frecuencia de muestreo

LOTES	TAMAÑO DEL LOTE	No. DE TOMAS
GRANEL	hasta 500 kg	1 c/300 kg (5 ó más)
	de 501 a 3.000 kg	2 c/500 kg (10 ó más)
	de 3.001 a 2.000 kg	3 c/700 kg (40 ó más)
	de 20.001 a más	
BOLSAS	hasta 5	1 de cada bolsa
	de 6 a 30	5 (1 de cada 3 bolsas)
	de 31 a 400	10 (1 de cada 10 bolsas)
	de 401 a más	80 (1 de cada 7 bolsas)

V. ANALISIS DE LAS PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE CALIDAD DE SEMILLA

El análisis de semilla brinda información y establece un estándar para determinar el nivel de calidad.

Un lote de alta calidad esta en función de las siguientes características que son medidas en los laboratorios de diferentes compañías:

1. Germinación (viabilidad)
2. Pureza
3. Vigor
4. Sanidad

V.1 Análisis de la viabilidad

*** Prueba estándar de germinación**

En una prueba de germinación estándar, las semillas se colocan en condiciones ideales de luz y temperatura para inducir la germinación. Las condiciones requeridas para llenar los requisitos legales se especifican en las normas para ensaye de semillas, las cuales pueden incluir tipos de prueba, condiciones ambientales y duración de las pruebas.

En los laboratorios para ensaye de semillas se emplean varias técnicas para germinar las semillas. Las semillas pequeñas se colocan en chatolas de germinación (que no sean de acero galvanizado, que contiene sales de zinc tóxicas). También resultan útiles las cajas de plástico, las cajas de cartón encerado o las de Petri cubiertas. El papel absorbente se corta en dos partes pequeñas (secantes) y las semillas pequeñas se colocan encima o entre dos capas. Otros medios para la germinación son el algodón absorbente, toallas de papel, papel filtro (cinco capas), y para semillas grandes, arena, vermiculita, perlita o tierra (16mm). Los recipientes se colocan en condiciones especiales en las cuales controlan temperatura, humedad y luz. Para evitar el desarrollo de microorganismos, todo el material y equipo debe conservarse escrupulosamente limpio, esterilizado cuando sea posible y con la cantidad de agua cuidadosamente regulada. No se debe formar una película de agua al alrededor de las semillas, ni el medio de germinación debe estar tan húmedo que aparezca una película de agua cuando se aprieta con un dedo. Para evitar el secado, la humedad en el germinador debe ser de 90% o más. Los recipientes con arena deben conservarse muy bien cerrados. No se debe agregar agua durante la prueba.

Para pruebas de granos de cereales es común usar el sistemas de toallas enrolladas. Se doblan sobre las semillas varias capas de toallas de papel mojadas (de unos 2.8 x 3.6 xm), luego se enrollan en cilindros y se coloca verticalmente en una germinadora.

Una prueba de germinación de ordinario dura de una a cuatro semanas, pero en semillas de árboles, de baja germinación y con letargo, puede durar hasta unos tres meses. En la primera semana se puede hacer una “primera cuenta” y las semillas germinadas se descartan para hacer después una cuenta formal. Al final de la prueba las semillas se dividen en (a) plántulas normales, (b) semillas duras, (c) semillas en letargo y (d) plántulas anormales más semillas muertas o en putrefacción. Generalmente, una plántula normal debe tener una raíz y un tallo bien desarrollados, aunque el criterio de “plántulas normales” varía con la especie de semilla. Las “plántulas anormales” pueden ser causadas por la edad de la semilla o por malas condiciones de almacenamiento; daños por insectos, enfermedades o mecánicos, sobredosis de fungicidas, daño por heladas, deficiencia de minerales y (manganeso y boro en chícharo y frijol) o materiales tóxicos presentes a veces en las charolas metálicas de germinación, en el substrato o en el agua de las cañerías. Cualquier semilla que no germine se debe examinar para determinar la posible razón de ello. Las “semillas duras” no habían absorbido agua. Las semillas en letargo son aquellas macizas, hinchadas y libres de mohos, pero que muestran un brotamiento irregular o nulo.

*** Prueba con embriones separados**

La prueba con embriones separados se aplica para determinar la viabilidad de semillas de árboles y arbustos leñosos cuyos embriones necesitan largos periodos de postmaduración antes de que pueda efectuarse la verdadera germinación. En esta prueba se separa al embrión de las semillas y se hace germinar solo.

Las semillas se remojan con algunos de los métodos siguientes durante uno o cuatro días, hasta que están hinchados por completo: (a) en agua que corra lentamente, (b) en agua en reposo a menos de 15°C; o (c) en agua en reposo a 20°C haciendo cuando menos dos cambios de agua al día.

En la preparación de las semillas para la separación de los embriones resulta satisfactorio almacenarlas durante tres días a dos semanas en turba húmeda y a temperatura fría. La separación del embrión debe hacerse con todo cuidado para evitar dañarlo. Cuando existan cubiertas duras, como el endocarpo de las semillas de los frutales de hueso, deben quitarse primero.

Las cubiertas humedecidas de las semillas se cortan con una hoja de afeitar o una navaja afilados, en condiciones de limpieza, pero no estériles, de preferencia debajo de un vidrio. El embrión se separa con todo cuidado. Si hay presente un endospermo grande, se pueden cortar las cubiertas de las semillas y cubrir las semillas con agua. Después de alrededor de media hora, flotarán los embriones o se pueden separar con facilidad.

Los procedimientos para poner a germinar a los embriones separados son similares a los que se utilizan para semillas intactas, utilizando cajas de Petri con un substrato húmedo, como papel secante o papel filtro. Los embriones se colocan sobre el papel filtro de manera que no se toquen. Los recipientes se colocan en luz, a temperatura de 18 a 22°C. Con temperaturas superiores, se puedan desarrollar mohos que interfieren con la prueba. El tiempo necesario para la prueba varía de tres días a tres semanas.

Los embriones no viables se tornan suaves, de color pardo y se pudren en un plazo de dos a diez días. Los embriones viables permanecen macizos y muestran alguna indicación de viabilidad, dependiendo de la especie. Los tipos de respuesta que se presentan incluyen la apertura de los cotiledones, desarrollo de la clorofila y el crecimiento de la radícula y de la plúmula. La rapidez y el grado de desarrollo dan cierta indicación del vigor de las semillas.

*** Prueba de viabilidad utilizando tetrazolio**

Objeto

El objeto de esta práctica es hacer una estimación rápida de la capacidad germinativa de un lote de semilla.

Materiales y Métodos

1) Soluciones

Prepare una solución de tetrazolio al 1% p/v, disolviendo 5 g de la sal en 500 ml de agua destilada. El pH de la solución debe estar comprendido entre 6 y 8, para lograr una tensión óptima. Si el pH final de la solución es 4 o menos, entonces agregue a la solución de tetrazolio 1.816 g de KH_2PO_4 y 3.563 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Envase la solución restante en una botella ámbar y en un sitio oscuro y fresco.

2) Preparación de las semillas para el ensayo

La interpretación de los resultados se facilita cuando la semilla se ablanda en agua antes de seccionarla o punzarla (para facilitar la penetración del reactivo).

El ablandamiento se puede lograr colocando las semillas sobre toallas húmedas de papel (12-16 horas) o colocándolas en un beaker con agua durante 3-4 horas a 30°C.

3) Preparación de la semilla para tinción

a. Aplicable a semillas de arroz, avena, sorgo y maíz.

Haga un corte a lo largo del eje longitudinal de la semilla con una navaja afilada. Es conveniente que remueva las semillas del papel toalla una a una para evitar que sequen y endurezcan. Una vez que haya hecho el corte a 100 semillas, distribúyala en sendos platos petri y cúbralos con la solución de tetrazolio al 0.1%. Coloque las muestras en una cámara de incubación a 45°C durante dos horas.

b. Aplicable a semilla de soya y frijol.

La semilla de estos cultivos, previamente ablandada en agua puede ser colocada en platos petri y cubrirse con la solución de tetrazolio. La remoción de la cubierta seminal, aunque disminuye el tiempo requerido para la tinción, no es requisito indispensable. Distribuya la muestra de 100 semillas en sendos platos petri. Cubra con la solución de tetrazolio al 1% y colóquelas en una cámara de incubación a 45°C durante dos horas.

c. Aplicable a café.

La semilla de este cultivo debe ablandarse en agua por un período no menor de 72 horas.

Remueva el pericarpio y distribuya las 100 semillas en sendos platos petri y cúbralos con la solución de TZ al 1%. Coloque los platos petri en una cámara incubadora a 45 °C por espacio de 16 horas.

Interpretación de los resultados

La interpretación inteligente de los resultados obtenidos depende de (1-) conocimiento de las estructuras de la semilla, (2-) conocimiento de los mecanismos de la prueba y sus limitaciones, (3-) combinación de las características de la tinción obtenida con otros rasgos visibles de aspectos de calidad, (4-) experiencia en efectuar ensayos comparativos de germinación.

Debe tenerse en consideración que el tejido embrionario sano absorbe el TZ lentamente y por lo tanto el color desarrollado es rojo pálido. Tejidos embrionarios afectados por envejecimiento, congelación o daño mecánico tiende a teñirse de rojo intenso. La presencia de tejido firme y sin tinción es reflejo de la no penetración de la solución de TZ y no necesariamente tejido muerto. Cambios bruscos de color entre tejidos firmes, tejidos normalmente y tejidos flácidos no teñidos indican que éste último es tejido muerto. Debe también, además del color y sus tonos, ponerse atención a otros factores. Turgor de los tejidos, presencia de fracturas, cavidades hechas por insectos debe anotarse.

El analista debe estar familiarizado con la localización de áreas meristemáticas en los embriones. En gramíneas, estas zonas incluye los extremos de la radícula. En gramíneas, estas zonas incluye los extremos de la radícula, las raicillas seminales y la base de la plúmula. Si el área muerta incluye el mosocotilo y la raíz seminal, el embrión es incapaz de desarrollarse.

En leguminosas y otras semillas de dicotiledóneas los tejidos meristemáticos se localizan en la plúmula y la radícula.

Expresión numérica de resultados

Calcule el porcentaje de semilla viable de cada repetición. Conviene y calcule el resultado promedio de cada muestra. Compare sus resultados con los obtenidos mediante la prueba standard de germinación.

V.2 Análisis de pureza

Pureza física, el objetivo del análisis de pureza es determinar:

- a. La composición en peso de la muestra que se analiza y por consiguiente la composición del lote de semillas y
- b. La identidad de las distintas especies de semillas contaminantes y de las partículas de materia inerte constituyentes de la muestra.

Definición de los Componentes de la Muestra

Se consideran tres componentes: semillas puras, otras semillas y materia inerte.

Semilla Pura

La semilla pura comprenderá las indicadas por el expedidor o encontradas como predominantes en el análisis, incluyendo todas las variedades botánicas de dicha especie. Se considera pura, las semillas normales o intactas, las maduras, las de tamaño inferior al normal, arrugadas, enfermas o germinadas, siempre que puedan ser identificadas como pertenecientes a la especie analizada.

También se considera semilla pura, los fragmentos de semillas resultantes de roturas, cuyo tamaño sea superior a la mitad de su tamaño inicial. No obstante, las semillas de leguminosas con el tegumento o testa totalmente desprendido se consideran materia muerta.

Otras Semillas

En otras semillas se incluirán las semillas y pseudosemillas de cualquier especie distinta a la de la semilla pura. La separación de las semillas de otros cultivos en el análisis de pureza, deberá hacerse cuando se tiene la absoluta certeza de su identificación; en el caso contrario, se dejará en la fracción de semilla pura.

Materia Inerte

En materia inerte se incluirán materiales tales como: piedras, partículas de suelo, granos de arena, tallos, pedazos de hoja, raíces, glumas, glumelas y otros fragmentos de plantas o de semillas de plantas silvestres o cultivadas que estén dentro de las siguientes condiciones:

- a. Semillas de especies o variedades consideradas como de otras plantas, quebradas o dañadas, cuyos fragmentos sean iguales o inferiores a la mitad del tamaño original de la semilla.
- b. Semillas que se encuentren enteramente desprovistas de su testa o tegumentos.
- c. Aquellas semillas que han ido transformadas por los hongos en esclerocios, masas esporíferas de caries o agallas de nemátodos.

Materiales

- Muestra de semilla remitida
- Homogeneizador
- Balanzas
- Lupas
- Pinzas
- Tarjetas de Registros

Metodología

La muestra representativa del lote de semilla enviada al laboratorio para ser sometida al análisis es denominada “muestra remitida o de laboratorio”. Esta muestra debe homogeneizarse, y después se le reduce al peso mínimo para constituir la “muestra de trabajo”.

La muestra de trabajo (o la submuestra) después de pesada, se clasificará en sus componentes: semilla pura, semillas de otros cultivos y materia inerte.

En general, la separación se basará en un examen de cada partícula de la muestra, determinando a qué componentes pertenece, aunque en algunos casos son obligatorios procedimientos especiales.

La separación de la semilla pura se puede efectuar visual o mecánicamente, según sean las características de las semillas, de forma que no se modifique su capacidad de germinar.

Después de la separación de los tres componentes, se realiza la identificación de las semillas encontradas de otros cultivos.

Los laboratorios deben poseer muestrarios de semillas debidamente catalogadas en familias y, dentro de éstas, por orden alfabético en géneros y especies.

En seguida se procede el pesaje de la materia inerte y las semillas de otros cultivos, anotándose los resultados en la tarjeta de trabajo en laboratorio. El peso de la fracción pura, se puede determinar por diferencia de peso, esto es, peso inicial menos el peso de la materia inerte y semillas de otros cultivos, o por el pesaje directo.

El número adecuado de cifras decimales de las pesadas para calcular los porcentajes con una cifra decimal, es el que se indica a continuación:

PESO DE LA MUESTRA DE TRABAJO EN GRAMOS

NUMERO DE
DECIMALES

- Menos de 1 4
- 1 a 9,999 3
- 10 a 99,999 2
- 100 a 999,999 1
- 1000 ó más 0

Cálculo y Expresión de los Resultados

El porcentaje en peso de cada constituyente se calculará con una cifra decimal.

Los porcentajes se basarán en la suma de los pesos de los componentes, no en el peso inicial de la muestra de trabajo; no obstante, la suma de los pesos de los componentes deberá compararse con el peso inicial como comprobación de una posible pérdida de material o cualquier otro error. Para el cálculo de los porcentajes se utilizan las siguientes formulas:

$$\% \text{ de semillas puras: } X = \frac{Pp \times 100}{Pt}$$

Donde:

Pp = es el peso de las semillas puras

Pt = es el peso total de la muestra

$$\% \text{ de semillas de otros cultivos } Y = \frac{Poc \times 100}{Pt}$$

Donde:

Poc = es el peso de las semillas de otros cultivos

Pt = es el peso total de la muestra

$$\% \text{ de materia inerte } Z = \frac{Pmi \times 100}{Pt}$$

Donde:

Pmi = es el peso de la materia inerte

Pt = es el peso total de la muestra

El resultado de todos los componentes, debe sumar 100%. Los componentes menores de 0.00% se indicarán con “trazas”.

Los porcentajes de semilla pura, otras semillas y materia inerte, se anotarán en los espacios correspondientes de la tarjeta de trabajo en laboratorio.

Si el resultado de un componente fuera nulo, se expresará como 0.0 en el espacio que le corresponda.

V.3 Análisis de vigor

La viabilidad de la semilla es uno de los principales atributos a considerarse en cualquier evaluación de calidad.

Isely (1957) define el vigor como la “suma total de todos los atributos de la semilla que favorecen el establecimiento rápido y uniforme de plántulas en el campo”.

Clases de pruebas de vigor

Prueba Directas

Se expone a las semillas, bajo condiciones controladas en el laboratorio, a los factores adversos (stress) que se espera reduzcan la emergencia en el campo.

Como ejemplo la prueba del frío (Cold Test), las pruebas directas, son difíciles de estandarizar entre laboratorios y tienden a dar resultados más variables que las pruebas de germinación.

Pruebas Indirectas

Son aquellas en las que se evalúa o mide una determinada característica de la semilla, que posteriormente se correlaciona con su performance en el campo.

La prueba de la conductividad eléctrica es otra prueba indirecta, que se emplea comúnmente para arveja (*Pisum sativum*). En ella se mide el contenido de electrolitos lixiviados en agua deionizada en la cual se han remojado las semillas por 24 horas a 20°C.

Otra de las pruebas es la del envejecimiento acelerado, en la cual se somete a la semilla a condiciones de alta temperatura y humedad relativa por un tiempo que varía según la especie. Estas condiciones inducen un aumento en el ritmo de deterioro fisiológico de la semilla, y por lo general existe una buena correlación entre el porcentaje de semillas que sobreviven al tratamiento y el porcentaje de emergencia en el campo.

Por último, la inmersión de semillas en una solución de cloruro de Tetrazolio, revela la presencia de tejidos muertos, cuya extensión y localización se relaciona con el valor como material para siembra de la semilla.

Prueba del Frío

El fundamento teórico de esta prueba es que la condición fría y húmeda del suelo retarda la actividad tanto de la semilla como de los microorganismos del suelo. Sin embargo, como las semillas están en desventajas relativamente mayor, serán más susceptibles al ataque de microorganismos causantes de pudrición. Las semillas vigorosas producirán plántulas capaces de resistir el ataque de estos microorganismos en mayor grado que las semillas débiles.

Procedimiento

La prueba se realiza sembrando las semillas en suelo no esterilizado traídos del campo donde se piensa sembrar, el cual se coloca sea en tapers de plástico o como una capa delgada sobre papel toalla humedecido. Luego de la siembra, se agrega agua hasta llevar al suelo hasta el 70% de capacidad de campo según la AOSA o al 40% según la ISTA. Inmediatamente se coloca el taper, bandeja o el papel toalla enrollado con suelo en un ambiente a 10°C, 95% de humedad relativa y bajo obscuridad por 7 días, transcurrido los cuales se traslada el recipiente a un ambiente a 25°C para la germinación y emergencia de plántulas, donde permanecen de 4 a 6 días.

Para determinar el contenido de humedad del suelo la ISTA recomienda secar 25 gramos de suelo a 105°C durante 3 horas y para determinar la capacidad máxima de retención de agua o capacidad de campo (C.C), es decir, el peso máximo de agua que el suelo puede retener en contra de la gravedad, la ISTA recomienda usar el método de Wiessman.Nehring.

Para calcular la cantidad de agua a agregar para elevar el contenido de humedad al 40% de capacidad se usa la fórmula:

$$W = B \frac{(100-F)}{100} \times C.C. \times P = B \times F$$

donde:

W = cantidad de agua (cm³) que debe agregarse para llevar el contenido de humedad al 40% de capacidad de campo

B = peso del suelo húmedo (gr)

F = porcentaje de humedad del suelo húmedo en base húmeda

CC = capacidad de campo como porcentaje del suelo seco

P = porcentaje requerido de capacidad en campo (Ej, 40%)

Registros

Transcurrido el período de exposición a 25°C, se clasifican las plántulas en los siguientes grupos:

- Grupo 1. Plántulas fuertes sin daño
- Grupo 2. Plántulas fuertes pero con ligero retardo en su desarrollo o con daños leves tales como: presencia de raíces primaria o secundarias cortas, ápices de hojas, rasgados, coleóptilo dañado pero sin daño a las hojas, mesocotilo ligeramente retorcido.

- Grupo 3. A. plántula pequeñas o levemente retorcidas; presencia de pocas raíces laterales. B. plántula fuerte pero de desarrollo desproporcionado.
- Grupo 4. Plántula anormales, según las reglas de la ISTA.
- Grupo 5. Semillas muertas.

Los grupos 1 y 2 se consideran como semillas vigorosas.

V.4 METODOLOGIA GENERAL PARA PRUEBAS DE SANIDAD DE SEMILLAS

Sanidad de semillas concierne principalmente la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades o pestes, pero incluye además deficiencias nutricionales de las plantas y otras condiciones como senectud de las mismas. Las pruebas de sanidad de semillas son importantes por tres razones:

- 1) El inóculo presente en las semillas puede aumentar progresivamente el desarrollo de la enfermedad y reducir el valor comercial del cultivo.
- 2) A través de lotes de semillas, los organismos causantes de enfermedades pueden ser introducidos a nuevas áreas. Para efecto de cuarentena este aspecto requiere investigación y certificación en lo que se relaciona con el movimiento internacional de semillas.
- 3) Pruebas de sanidad de semillas nos dan una idea acerca de las causas de anomalías en las plántulas y puede suplementar las pruebas de germinación.

La mayoría de los Laboratorios para pruebas de calidad de semillas realizan pruebas de sanidad únicamente cuando se solicita específicamente. La muestra de semillas debe ser representativa del lote a fin de que los resultados sean válidos para todo el lote. Las pruebas deben ser repetidas y el número de repeticiones varía con el laboratorio; sin embargo, se recomienda no usar menos de 400 semillas en cada prueba. En general la variación entre repeticiones en pruebas de sanidad es mayor que en pruebas de germinación. La muestra puede ser examinada para identificación de más de un patógeno en una sola observación. La microflora de un lote de semillas cambia considerablemente durante el almacenamiento; las condiciones de almacenamiento de muestras a probar en fechas futuras deberá ser seco y frío.

Los diferentes métodos para la prueba de sanidad varían en sensibilidad; por lo tanto es necesario suficiente conocimiento del método que se emplea a fin de evaluar los resultados.

I. DEFINICIONES

Incubación: proceso mediante el cual se provee a las semillas de un ambiente adecuado para el desarrollo de síntomas o estructuras de los patógenos.

Período de incubación: tiempo transcurrido desde el momento en que se colocan las semillas en agar, secante, etc. hasta el momento en que se recolectan los datos relativos a la sanidad de las semillas.

Pretratamiento: Cualquier tratamiento físico o químico que se da a la semilla y que preceda a la incubación, el cual se hace únicamente para facilitar la prueba.

Prueba preliminar: prueba que rinde información provisional sobre las condiciones que se investigan pero que resulta inadecuada como fuente de información conclusiva.

Prueba de sanidad: investigación a través de métodos específicos diseñados para revelar la presencia de microorganismos o de condiciones que favorecen el desarrollo de enfermedades en semillas.

Tratamiento de semillas: cualquier proceso físico o químico al cual se someten las semillas.

II. METODOLOGIA

Inspección de la semilla seca

Una muestra o submuestra puede ser inspeccionada para detectar la presencia de estructuras como esclerocios, quistes de nemátodos y cambios de color debidos a patógenos. Microorganismos también pueden estar presentes en la materia inerte, como la paja que acompaña la semilla. Debe darse especial atención a las semillas que presentan agujeros de

insectos como gorgojos y otros; algunas semillas pueden contener insectos vivos. Algunas pestes comunes tales como gorgojos, ácaros, polillas, etc. pueden ocasionalmente encontrarse en semillas de cereales, leguminosas y otras semillas.

La semilla puede examinarse mediante un microscopio de bajo aumento cuando se trata de identificar hongos por sus cuerpos frutíferos como acérvulos y picnidios en la semilla seca.

Examen después de suavizar o sumergir la semilla

La semilla puede ser sumergida en agua u otro fluido a fin de lograr que los cuerpos frutíferos se tornen más visibles o para lograr (condiciones en las cuales las esporas sean liberadas tales como exudados de picnidios, masas de esporas de las glumas de gramíneas. En algunos casos es necesario sumergir la semilla a fin de detectar condiciones tales como "corazón hueco" en *Pisum* spp.

Examen de material removido de las semillas por lavado

Esporas de hongos, nematodos, etc. que acompañan las semillas adheridos a las mismas pueden ser removidos agitando 100 semillas o más, en agua con un agente mojante (detergente), o en alcohol. El fluido se puede entonces filtrar, centrifugar o evaporar a un volumen reducido para luego examinar la presencia de microorganismos. En los organismos que se encuentran en las semillas y que pueden ser detectados mediante la aplicación de este método, se recomienda su empleo únicamente como prueba preliminar, la cual deberá seguirse con una investigación completa.

Examen posterior a la incubación

La muestra puede ser examinada para detectar la presencia de organismos causantes de enfermedades, plagas y desórdenes fisiológicos después de un período de incubación.

La prueba llamada de papel secante resulta muy efectiva para ese propósito. Las semillas, sin pretratamiento alguno, son colocadas ordenadamente a fin de que las plántulas no entren en contacto. La temperatura y la humedad deberán estandarizarse de acuerdo a los requisitos del patógeno y de la semilla que actúa como huésped, aunque las condiciones frecuentemente son similares a las empleadas para los estudios de germinación.

Debido a que la esporulación de muchos hongos es estimulada por la luz en especial si esta es intermitente y contiene radiación en la región del espectro cercana a ultravioleta (UV). Se recomienda para la mayoría de las semillas períodos de luz de 12 horas seguidos de 12 horas de oscuridad. En algunos casos el desarrollo de algunos hongos requiere condiciones especiales, por ejemplo: *Helminthosporium victoriae* en avena requiere temperaturas altas (28°C); *Septoria nodorum* en algunas variedades de trigo causa protuberancias en el coleóptilo de las plántulas, en especial cuando la humedad es escasa y solamente permite la germinación. Además, en el caso de ataque de *Fusarium* en trigo que resulta más fácilmente detectable si las semillas se incuban en completa oscuridad. Aunque la presencia de ciertos organismos sin la necesidad de lentes o sea a simple vista, un microscopio estereoscópico es a menudo necesario a fin de lograr una identificación más precisa y un microscopio de investigación a fin de identificar las esporas.

También las semillas pueden colocarse sobre agar, generalmente después de un pretratamiento, a fin de que se desarrollen las colonias características de cada organismo; en estos casos los organismos son identificados microscópicamente, sin embargo a fin de ser precisos es recomendable la observación microscópica.

Los daños ocasionados por insectos pueden a menudo apreciarse mejor separando los cotiledones o cortando las semillas. Para lograr lo anterior con mayor facilidad las semillas pueden sumergirse en agua para suavizarlas o cortarlas al final del período de incubación.

Otro método para el examen de semillas es plantándolas en arena o polvo de ladrillo seguidas de un período de incubación de 10 a 14 días, sin que las semillas hayan recibido pretratamiento alguno); la humedad entonces será alta, lo que permite a los patógenos atacar a las plántulas en desarrollo.

El método de incubación puede utilizarse para detectar los siguientes grupos de organismos o condiciones:

- 1) Hongos o bacterias patogénicas presentes en las semillas, alojadas en la misma o que atacan las plántulas.
- 2) Insectos en las semillas incluyendo estados larvales o evidencia de la presencia anterior de insectos.
- 3) Desórdenes fisiológicos como la muerte o manchas en el centro de los cotiledones o la presencia de plúmulas necróticas.

Semillas que han recibido algún tratamiento pueden ser probadas siguiendo los procedimientos descritos, algunas veces únicamente con pequeñas variantes.

La presencia de organismos saprofitos, aunque no siempre, es una indicación de que la semilla no es de buena calidad ya que ha estado expuesta a condiciones desfavorables durante la cosecha, beneficio o almacenamiento; o también que ha estado almacenada durante un largo tiempo. Las especies de *Mucor* y *Rhizopus* crecen rápidamente e invaden el sustrato de papel y pueden llegar a provocar la descomposición de plántulas originalmente sanas.

Examen de las plántulas en crecimiento.

Una forma conveniente de detectar la presencia de hongos, bacterias y virus en la semilla es plantándola y observando las plántulas a fin de detectar en las mismas, síntomas de alguna enfermedad. Las semillas de los lotes sospechosos pueden sembrarse, o también inóculo obtenido de las semillas atacadas usado para inducir la infección en plantas sanas. Las plantas pueden colocarse en el invernadero o directamente en el campo, pero recordando siempre, en especial en el último caso, que deben ser protegidas a fin de impedir la infección fortuita por patógenos.

VI. BIBLIOGRAFIA

- BASRA, A.S. 1995. Seed Quality: basic mechanisms and agricultural implications. Food Products Press, New York.
- BESNIER Romero, 1990. Semillas, biología y tecnología, Ediciones Mundi-Prensa. España.
- BAN, Base de Datos. Agris (1995-1996): e-mail: biblio@lamolina.edu.pe.
- BIBLIOTECA DE LA AGRICULTURA. 1997. Impresión: Emege, Industrias Gráfica, Impreso en España.
- CARRILLO MEDINA F. Certificación de Semillas (Revista). Programa de Pasto y Ganadería. U.N.S.C.H.-Ayacucho, 1987
- EEAOC- Avance agroindustrial, marzo 1998 (30-31)
- FUNDEAGRO, 1990. Control de calidad y certificación de semilla. Fundación para el desarrollo del agro. Proyecto de transferencia de tecnología agropecuaria. Lima-Perú.
- H.T. HARTMANN, D.E. KESTER, F.T. DAVIES, Jr. And R.L. GENERE, 1997. Plant Propagation Principles and Practices.
- PINEDO PANDURO, M.H., Evaluación preliminar de la germinación. Tesis 1990.
- R.H. Ellios, T.D. HONG. Handbook of seed technology for genebanks, Rome, 1985. Pag. 231
- SEED ABSTRACTS, International Seed Testing Association, 1997.