

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS PARA DETERMINAR LA  
GERMINACIÓN DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS

por

Rivana FROS HERNÁNDEZ  
Paola PETRULLO FABRE

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2017

Tesis aprobada por:

Director:

-----  
Ing. Agr (MSc.) Graciela Romero

-----  
Ing. Agr. Joaquín Garrido

-----  
Ing. Agr. (MSc.) Gabriela Jolochin

Fecha:

08 de diciembre de 2017

Autores:

-----  
Rivana Fros Hernández

-----  
Paola Petrullo Fabre

## AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y amigos por el apoyo brindado durante los años de estudio.

A nuestros tutores, Ing. Agr. (MSc.) Graciela Romero e Ing. Agr. Joaquín Garrido por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo.

A la Dirección General Forestal, particularmente al Vivero Dr. Alejandro Gallinal por brindarnos la posibilidad de utilizar el laboratorio para llevar a cabo la ejecución de dicha tesis, especialmente a la Sra. Iliana Calero por su colaboración.

## TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES .....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	2
2.1 LAS SEMILLAS .....	2
2.1.1 <u>Proceso de formación de una semilla</u> .....	2
2.1.2 <u>Componentes de la semilla</u> .....	2
2.2 LA DORMICIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS .....	4
2.2.1 <u>Tipos de dormición de semillas</u> .....	4
2.2.1.1 Dormición impuesta por las cubiertas seminales .....	4
2.2.1.2 Dormición embrionaria .....	5
2.2.1.3 Dormición primaria .....	5
2.2.1.4 Dormición secundaria .....	5
2.3 GERMINACIÓN .....	6
2.3.1. <u>Imbibición</u> .....	7
2.3.2. <u>Germinación</u> .....	8
2.3.3. <u>Crecimiento</u> .....	8
2.4 CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA .....	9
2.5 CONDICIONES PARA EL ALMACENAMIENTO .....	10
2.5.1 <u>Cambios en la semilla durante el almacenamiento</u> .....	11
2.5.2 <u>Tratamientos aplicables a las semillas para el almacenaje</u> .....	12
2.5.2.1 Secado .....	12
2.5.2.2 Congelado .....	12
2.6 MECANISMOS DE EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD.....	13
2.6.1 <u>Test de germinación</u> .....	13
2.6.2 <u>Test de tetrazolio</u> .....	17
2.7 TRATAMIENTOS PARA PROMOVER LA GERMINACIÓN .....	18

2.7.1	<u>Métodos para superar la dormancia fisiológica</u> .....	18
2.7.1.1	Almacenamiento en locales secos .....	18
2.7.1.2	Pre-enfriamiento.....	19
2.7.1.3	Pre-calentamiento .....	19
2.7.1.4	Nitrato de potasio - KNO <sub>3</sub> .....	19
2.7.1.5	Ácido giberélico - GA <sub>3</sub> .....	19
2.7.1.6	Germinación a baja temperatura .....	20
2.7.1.7	Luz .....	20
2.7.1.8	Sobres de polietileno cerrados.....	20
2.7.2	<u>Métodos para superar dormancia física</u> .....	20
2.7.2.1	Imbibición .....	20
2.7.2.2	Escarificación mecánica.....	21
2.7.2.3	Escarificación química.....	21
2.8	MÉTODOS PARA REMOVER LAS SUSTANCIAS INHIBIDORAS .....	21
2.8.1	<u>Lavado previo</u> .....	21
2.8.2	<u>Remoción de estructuras que envuelven las unidades de dispersión</u> .....	22
2.9	DESINFECCIÓN DE LA SEMILLA.....	22
2.10	DURACIÓN DEL TEST DE GERMINACIÓN .....	22
2.11	ASPECTOS GENERALES DE LAS ESPECIES .....	23
2.11.1	<u>Características de la especie <i>Handroanthus heptaphyllus</i></u> .....	23
2.11.2	<u>Características de la especie <i>Parapiptadenia rigida</i></u> .....	24
2.11.3	<u>Características de la especie <i>Peltophorum dubium</i></u> .....	26
2.11.4	<u>Características de la especie <i>Vachellia caven</i></u> .....	27
3.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	29
3.1	PROCEDENCIA DE LA SEMILLA .....	29
3.2	ESPECIES UTILIZADAS .....	29
3.3	MATERIALES .....	29
3.4	METODOLOGÍA .....	29
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	32
4.1	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	35
4.2	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	42
4.3	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN <i>Peltophorum dubium</i> .....	47
4.4	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN <i>Vachellia caven</i> .....	52
4.5	PRUEBA DE VIABILIDAD MEDIANTE EL USO DE TETRAZOLIO.....	56

5.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	59
6.	<u>RESUMEN</u> .....	61
7.	<u>SUMMARY</u> .....	62
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	63

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Primer conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	32
2. Primer conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	33
3. Segundo conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	33
4. Segundo conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	33
5. Tercer conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	33
6. Tercer conteo <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	34
7. Valores de los parámetros de germinación en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	34
8. Análisis estadístico en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	35
9. Primer conteo <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	40
10. Segundo conteo <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	40
11. Tercer conteo <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	40
12. Valores de los parámetros de germinación en <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	41
13. Análisis estadístico en <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	42
14. Primer conteo <i>Peltophorum dubium</i> .....	44
15. Segundo conteo <i>Peltophorum dubium</i> .....	44
16. Tercer conteo <i>Peltophorum dubium</i> .....	45
17. Valores de los parámetros de germinación en <i>Peltophorum dubium</i> .....	45
18. Análisis estadístico en <i>Peltophorum dubium</i> .....	46
19. Primer conteo <i>Vachellia caven</i> .....	51

20. Segundo conteo <i>Vachellia caven</i> .....	51
21. Tercer conteo <i>Vachellia caven</i> .....	51
22. Valores de los parámetros de germinación en <i>Vachellia caven</i> . .....	51
23. Análisis estadístico en <i>Vachellia caven</i> . .....	53
Ilustración No.	
1. Tipos de dormición en semillas.....	6
2. Esquema de las fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación. ....	7
3. Distribución de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> en Uruguay. ....	24
4. Distribución de <i>Parapiptadenia rigida</i> en Uruguay. ....	26
5. Distribución de <i>Peltophorum dubium</i> en Uruguay.....	27
6. Distribución de <i>Vachellia caven</i> en Uruguay.....	28
7. Porcentaje de germinación según tratamiento en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	35
8. Conteo inicial en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Testigo. ....	36
9. Conteo inicial en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	37
10. Conteo inicial en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Tratamiento con ácido sulfúrico.....	37
11. Conteo inicial en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	38
12. Conteo final en <i>Handroanthus heptaphylla</i> . Testigo. ....	38
13. Conteo final en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Tratamiento con giberelinas.....	39



14. Cuento final en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	39
15. Porcentaje de germinación según tratamiento en <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	41
16. Porcentaje de germinación según tratamiento en <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	42
17. Cuento inicial en <i>Parapiptadenia rigida</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	43
18. Cuento inicial en <i>Parapiptadenia rigida</i> . Tratamiento con ácido sulfúrico.....	43
19. Cuento inicial en <i>Parapiptadenia rigida</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	44
20. Porcentaje de germinación según tratamiento en <i>Peltophorum dubium</i> . ....	46
21. Cuento inicial en <i>Peltophorum dubium</i> . Testigo.....	47
22. Cuento inicial en <i>Peltophorum dubium</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	48
23. Cuento inicial en <i>Peltophorum dubium</i> . Tratamiento con ácido sulfúrico.....	48
24. Cuento inicial en <i>Peltophorum dubium</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	49
25. Cuento final en <i>Peltophorum dubium</i> . Testigo. ....	49
26. Cuento final en <i>Peltophorum dubium</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	50
27. Cuento final en <i>Peltophorum dubium</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	50
28. Porcentaje de germinación según tratamiento en <i>Vachellia caven</i> . ....	52

29. Conteo inicial en <i>Vachellia caven</i> . Testigo.....	53
30. Conteo inicial en <i>Vachellia caven</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	53
31. Conteo inicial en <i>Vachellia caven</i> . Tratamiento con ácido sulfúrico.....	54
32. Conteo inicial en <i>Vachellia caven</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	54
33. Conteo final de <i>Vachellia caven</i> . Testigo. ....	55
34. Conteo final en <i>Vachellia caven</i> . Tratamiento con giberelinas. ....	55
35. Conteo final en <i>Vachellia caven</i> . Tratamiento con agua caliente. ....	56
36. Test de tetrazolio en <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	57
37. Test de tetrazolio en <i>Parapiptadenia rigida</i> .....	57
38. Test de tetrazolio en <i>Peltophorum dubium</i> .....	58
39. Test de tetrazolio en <i>Vachellia caven</i> . ....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay el bosque nativo se encuentra protegido por la Ley Forestal No. 15.939, la que establece la prohibición de su corta (Art. X), a excepción de aquellos casos donde los productos obtenidos sean utilizados para el consumo interno del establecimiento. Esta excepción también se cumple en aquellos bosques que cuentan con registros y a los que cuentan con un Plan de Manejo aprobado por MGAP. DGF del país (Art. XX).

Los bosques que se desarrollan en el país presentan diferentes características en función de los ambientes en los que se encuentran, pudiéndose clasificar por ejemplo en monte de galería o ribereño, monte serrano, palmares, monte de parque, monte de quebrada, cornisa, etc.

A estas formaciones vegetales actualmente se les atribuye importancia como recurso fitogenético debido a su valor de reserva como material genético, económico y estratégico.

La existencia de un banco de germoplasma permite mantener las colecciones *ex situ* de especies nativas arbóreas y desarrollar conocimiento sobre viabilidad y longevidad de las semillas, realizando un control continuo de éstas y los parámetros de germinación, contribuyendo a la permanencia de las especies.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una línea base, para determinar los protocolos de germinación más adecuados para cuatro especies nativas seleccionadas en el Centro de Germoplasma de la División General Forestal. Dicha institución está ejecutando un proyecto en cooperación con el Ministerio de Agricultura de Alemania, llamado "Contribución en la elaboración de una estrategia de gestión sostenible del bosque nativo y su puesta en marcha en Uruguay". En el marco de este proyecto se seleccionaron un conjunto de especies de prioridad para iniciar el desarrollo de Protocolos de germinación. Las especies seleccionadas fueron *Handroanthus heptaphyllus* (lapacho rosado), *Parapiptadenia rigida* (angico), *Peltophorum dubium* (ibirapitá), todas incluidas en el listado de especies de prioridad, al que se agregó *Vachellia caven* (espinillo) para conocer el comportamiento respecto a la germinación-dormición y longevidad de la semilla; dado que se contaba con la cantidad de semillas necesarias para la ejecución de los ensayos correspondientes.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LAS SEMILLAS

Semilla: toda estructura vegetal usada con propósito de siembra o propagación de una especie, INASE (2009).

Aunque existen varias formas de clasificar a las semillas, una de las clasificaciones más conocidas refiere a su tolerancia a la desecación, diferenciándose en ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas son aquellas que en su maduración tienen un bajo contenido de humedad, entre un 50% y un 20%, por lo que admiten para su almacenamiento un secado que mantenga entre 5% y 8% de humedad, pudiendo perder su viabilidad con contenidos en agua inferiores al 5%. Consecuentemente, resisten bajas temperaturas, de hasta  $-20^{\circ}\text{C}$  (Serrada, 2000).

Las semillas recalcitrantes son aquellas que en su maduración tienen un alto contenido en humedad, entre un 90% y un 40%, por lo que admiten para su almacenamiento un secado que mantenga entre 25% y 80% de humedad, pudiendo perder su viabilidad con contenidos de agua inferiores al 20% o 30%. Consecuentemente, no resisten bajas temperaturas, por lo que soportan hasta  $-3^{\circ}\text{C}$  (Serrada, 2000).

#### 2.1.1 Proceso de formación de una semilla

En lo que refiere a semilla botánica, ésta se forma mediante una embriogénesis zigótica que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y la maduración del embrión. Éste podrá germinar cuando las condiciones endógenas y medioambientales sean las apropiadas. De la embriogénesis dependerá el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo de nuevos individuos. Además de ser el período en que se forma la semilla la embriogénesis también constituye la fase de preparación para la germinación (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

#### 2.1.2 Componentes de la semilla

Las partes esenciales de una semilla son el propio embrión, las cubiertas seminales y un tejido de almacenamiento. El embrión podría considerarse como “planta miniatura” formada por un corto eje embrionario unido a uno, dos o más cotiledones.

El eje embrionario está formado por dos partes íntimamente unidas entre sí, el epicótilo y el hipocótilo. Las cubiertas seminales son capas que rodean completamente a la semilla, la protegen de posibles agresiones del medio ambiente y regulan los intercambios que se producen entre el interior y el exterior de la semilla (es decir, absorción de agua y expulsión de material de desecho). El embrión al desarrollarse para dar lugar a la nueva planta, tiene que romper y atravesar estas cubiertas (De la Cuadra, 1992).

Las células del tejido de reserva almacenan sustancias nutritivas que serán necesarias para que el embrión pueda respirar, crecer y desarrollarse hasta que se desarrolle y crezca para poder generar los productos que le permitan mantenerse y continuar su ciclo de vida (De la Cuadra, 1992).

Según Azcón-Bieto y Talón (2008) el proceso embriogénico puede dividirse en tres etapas debido a su complejidad: período temprano (caracterizado por un crecimiento debido a la gran actividad mitótica), período medio (con predominio del crecimiento debido a la expansión celular) y período tardío (etapa que engloba la preparación de la semilla para la desecación y adquisición de la dormición primaria).

Durante la primera etapa del proceso embriogénico se produce una síntesis de citoquininas muy importante, probablemente relacionada con la mitosis tan intensa (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El período medio se caracteriza por un contenido elevado de auxinas, fito-hormona implicada en la expansión celular (es decir, se han encontrado auxinas de forma libre y conjugada). El ácido indolacético (AIA) se sintetiza en los tejidos de la propia semilla y simultáneamente, el contenido de giberelinas aumenta, las citoquininas tienden a desaparecer y no se detecta el ácido abscísico (ABA) todavía (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El período tardío presenta niveles elevados de ABA, con un descenso en el peso fresco de la semilla y con la máxima acumulación de sustancias de reserva (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El ABA es el responsable de que la semilla no pase en la planta madre directamente de la embriogénesis a la germinación y, por consiguiente, de que adquiera y mantenga la dormición primaria (evita la llamada “germinación precoz”). Además, es el responsable de la morfogénesis del embrión, participa en la tolerancia a la desecación, estimula la síntesis de proteínas y evita la síntesis de la alfa-amilasa (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

## 2.2 LA DORMICIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS

Conceptualmente, la dormición es el bloqueo que tiene lugar en una semilla viable que le impide completar la germinación en condiciones favorables (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Pese a la complejidad de la descripción de la dormición en la semilla, Baskin y Baskin (2004) han propuesto una descripción más sofisticada y experimentalmente probada: *“una semilla durmiente carece de la capacidad para germinar en un período de tiempo concreto, aunque se someta a una combinación de factores físicos medioambientales que en otras circunstancias favorecen su germinación”*.

Las semillas para germinar deben encontrarse en condiciones ambientales de temperatura, humedad y concentración de oxígeno adecuadas. No obstante, en muchas especies, aun dándose estas condiciones, la germinación no tiene lugar, lo que estaría motivado por un estado fisiológico de la semilla de dormición (Pérez y Pita, 1999).

### 2.2.1 Tipos de dormición de semillas

Aunque existen numerosas y complejas clasificaciones de dormición de semillas, Pérez y Pita (1999), lo simplifican al máximo, y establecen dos categorías fundamentales de dormición:

- dormición impuesta por las cubiertas seminales
- dormición embrionaria

En el primer caso, la dormición se manifiesta únicamente en la semilla intacta y el embrión aislado germina normalmente en las condiciones ambientales adecuadas. La eliminación total o parcial de las cubiertas seminales (conocido como escarificación) suele ser suficiente para que la semilla germine. En contraste, en el segundo caso, el embrión es durmiente en sí mismo, de manera que la eliminación de las cubiertas no basta para permitir la germinación (Pérez y Pita, 1999).

#### 2.2.1.1 Dormición impuesta por las cubiertas seminales

La dormición en muchas especies es impuesta por mecanismos físicos o fisiológicos que radican en las cubiertas seminales. Estos mecanismos son muy variados (pudiendo actuar conjuntamente en muchos casos); entre los principales se encuentran: la interferencia con la captación de agua; la interferencia con el intercambio gaseoso; la presencia de inhibidores de la germinación en las cubiertas seminales; la interferencia con la salida de

inhibidores de la germinación y las restricciones mecánicas (Pérez y Pita, 1999).

#### 2.2.1.2 Dormición embrionaria

La dormición embrionaria está presente en semillas en las que el control de la dormición reside en el propio embrión. Se pone de manifiesto cuando el embrión, aunque viable y maduro, no germina, incluso si se le separa del resto de la semilla y si se le incuba en condiciones óptimas para la germinación. En general, la dormición embrionaria se debe o bien a la inmadurez del propio embrión, o a que éste contenga sustancias inhibitoras de la germinación (Pérez y Pita, 1999).

La dormición se divide en primaria o secundaria según que la capacidad germinativa de una semilla esté bloqueada antes o después de su dispersión, respectivamente (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En general, las semillas son dispersadas una vez que están completamente formadas; si en este momento presentan dormición, a ésta se la denomina primaria. A partir de este estado la semilla puede evolucionar a no durmiente, o bien desarrollar un tipo diferente de dormición que recibe el nombre de secundaria. Como es lógico, también puede ocurrir que la dormición secundaria pueda ser desarrollada por semillas que no están durmientes en el momento de la dispersión (Figura 1, Pérez y Pita, 1999).

#### 2.2.1.3 Dormición primaria

La dormición primaria, también denominada dormición fisiológica no profunda (DFNP). Se ha demostrado que la dormición del embrión y de los tejidos circundantes (endospermo, pericarpo, cubierta seminal, entre otros) está implicada en ella, y que la interacción entre el grado de dormición de ambas partes de la semilla determina la intensidad de la DFNP. Así, la resistencia mecánica que opone el embrión y los tejidos envolventes cuando están durmientes parece ser una de las causas principales de la DFNP en las semillas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

#### 2.2.1.4 Dormición secundaria

La dormición secundaria está vinculada fundamentalmente a las condiciones medioambientales, y se induce una vez que la semilla que la adquiere ha sido diseminada y la dormición primaria ha disminuido (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En condiciones naturales, la dormición secundaria es inherente a muchas semillas integrantes del banco de semillas del suelo (conjunto de semillas de distintas especies que se encuentran en el suelo con diferentes grados de enterramiento y caracteres fisiológicos). Los cambios periódicos (anual o bianual) en la dormición secundaria pueden explicar la germinación estacional de las especies leñosas, entre otras. La dormición secundaria se induce cuando una semilla no durmiente no recibe la señal o las señales externas necesarias para germinar. Si estos parámetros alcanzan valores óptimos para una semilla tiene lugar el proceso germinativo. En términos fisiológicos, las semillas con dormición primaria y secundaria son diferentes, principalmente porque responden de forma distinta a un mismo factor estimulante de la germinación. La temperatura y, posiblemente, el potencial hídrico del suelo son los que más determinan el carácter cíclico anual de la dormición secundaria. Paralelamente, otros estimulantes de la germinación, como la luz y el nitrato, colaboran en la eliminación de la dormición secundaria (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

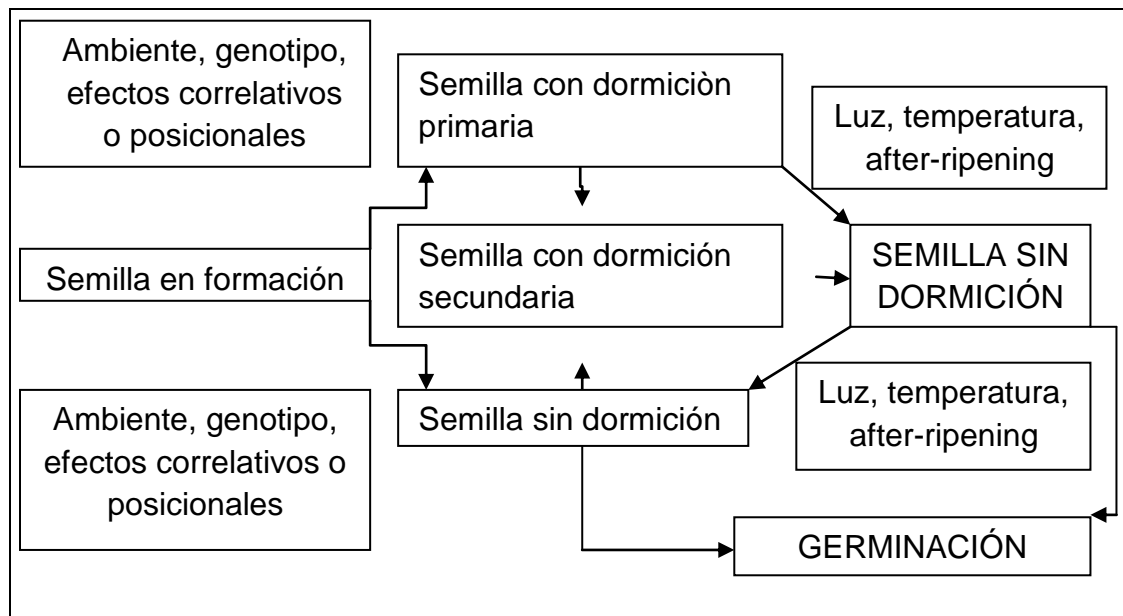


Figura 1. Tipos de dormición en semillas

Fuente: modificado de Pérez y Pita (1999)

### 2.3 GERMINACIÓN

La germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula



(protrusión). En condiciones de laboratorio la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula es el hecho que se utiliza para considerar que la germinación ha tenido lugar (criterio fisiológico). Sin embargo, en condiciones de campo no se considera que la germinación haya finalizado hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (criterio agronómico, Pérez y Pita, 1999).

La toma de agua por una semilla madura es trifásica: toma rápida inicial, fase de meseta y nuevo incremento en la absorción de agua, que se corresponde con el período de elongación del embrión o de la radícula. La duración de cada fase dependerá de las características de la semilla y de las condiciones externas bajo las que se produce la imbibición (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

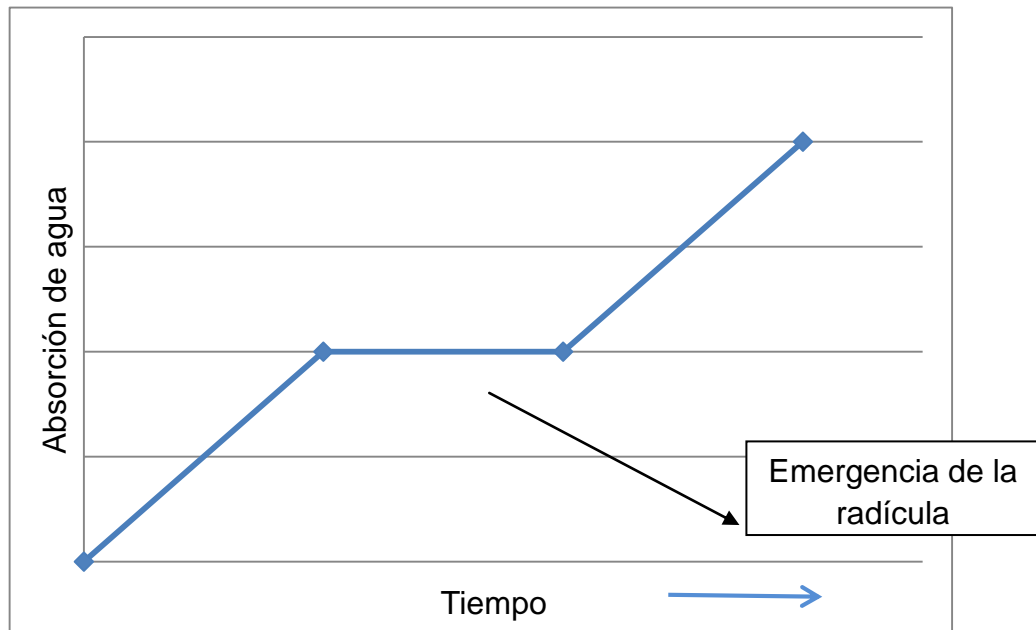


Figura 2. Esquema de las fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación

Fuente: modificado de Azcón-Bieto y Talón (2008)

### 2.3.1 Imbibición

La primera fase de la germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla desde el medio exterior (imbibición). La hidratación de los tejidos de la

semilla es un proceso físico con una duración variable según la especie considerada. Una vez que la semilla se ha hidratado, comienzan a activarse una serie de procesos metabólicos que son esenciales para que tengan lugar las siguientes etapas de la germinación. En esta fase de la germinación, si las condiciones del medio lo determinan, la semilla puede deshidratarse retornando a su estado inicial. Otros factores que pueden influir en esta etapa de la germinación son: la falta de suficiente agua (déficit hídrico), el exceso de agua, la velocidad de hidratación o la temperatura a la que tiene lugar la imbibición (Pérez y Pita, 1998).

### 2.3.2 Germinación

Una vez que la semilla se ha hidratado adecuadamente, se entra en una segunda etapa del proceso de germinación denominada fase de germinación, caracterizada entre otros hechos porque se produce una disminución en la absorción de agua por las semillas. Durante esta etapa tiene lugar una activación generalizada del metabolismo de la semilla, lo cual es esencial para que se desarrolle la última etapa del proceso de germinación, la fase de crecimiento (Pérez y Pita, 1998).

### 2.3.3 Crecimiento

En esta última fase de la germinación, paralelamente al incremento de la actividad metabólica, se produce el crecimiento y emergencia de la radícula a través de las cubiertas seminales. Las semillas que han alcanzado la fase de crecimiento no pueden volver a etapas anteriores y en el caso de que las condiciones del medio no permitan que esta fase pueda seguir adelante, la semilla morirá (Pérez y Pita, 1998).

Una vez que la radícula ha roto las cubiertas seminales, se inicia el desarrollo de la plántula, proceso complejo y variable según las especies, que implica un elevado gasto de energía que se obtiene mediante la movilización de las reservas nutritivas de la semilla (Pérez y Pita, 1998).

Las giberelinas desempeñan un papel muy importante en la germinación mediante la inducción de la síntesis de alfa-amilasa y su posterior secreción desde las capas aleuronales al endospermo. Este proceso está inhibido por el ABA. El ABA impide la creación del gradiente osmótico necesario para generar el potencial hídrico capaz de desencadenar la presión de turgencia que requiere el crecimiento por elongación. El impedimento en la toma de agua también inhibe los procesos de ablandamiento de la pared celular primaria (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

## 2.4 CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA

La conservación del germoplasma determina la preservación existente en una zona determinada y debe garantizar la máxima variabilidad posible, la continuidad de uso, el ahorro de tiempo, dinero y esfuerzo. Para ello es necesario contar con información útil como: distribución, peligro de extinción y variabilidad genética de las especies. La estrategia a seguir dependerá de la abarcan desde los bancos de semillas hasta las áreas de reserva (CIAT, 2007).

Los métodos de conservación pueden dividirse en conservación *in situ* y conservación *ex situ*. En el primero, el material es mantenido en su hábitat original. Como ejemplo de estos materiales se encuentran variedades criollas (land races) y comunidades salvajes. En el segundo, los recursos genéticos se conservan en colecciones, consistentes en líneas individuales, clones o poblaciones con un origen ecológico o genético común. Generalmente son mantenidos en cultivos de parcelas, o alternativamente en almacenes de semillas, polen o cultivos de tejidos (Frankel, 1970).

Los bancos de germoplasma son depósitos de genes representados por colecciones artificiales de una o más especies (Giacometti, 1984).

En el caso de colecciones conservadas en forma de semillas, generalmente se considera como un banco de genes sencillamente a la colección almacenada a largo o mediano plazo en cámaras de almacenamiento a temperatura constante entre 15 y -20°C de acuerdo al objetivo de conservación (Giacometti, 1984).

Tanto la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como la Junta Internacional de Recursos Genéticos de Plantas (IBPGR) han distinguido a las colecciones de los bancos de germoplasma en dos clases: las llamadas básicas, dedicadas al mantenimiento permanente de semillas, y las colecciones activas o de trabajo que se establecen para programas de mejoramiento genético e investigación relacionada (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Para mejorar la disponibilidad a las crecientes colecciones de germoplasma, debieron surgir las denominadas colecciones núcleo. Una colección núcleo representa la diversidad genética de una especie cultivada y sus emparentadas, con un mínimo de representatividad (Frankel y Brown, 1984), y si bien ésta no reemplaza una colección completa, la hace más accesible. Una accesión en una colección núcleo representa accesiones en la colección de reserva (que es el resto de la colección, Brown, 1989).

La semilla es la forma como la planta sobrevive el máximo tiempo con el mínimo de actividad fisiológica; hasta cierto punto, es la manera que tienen muchas especies de almacenarse a sí mismas. Por ello, la forma más fácil de almacenar recursos genéticos es conservando semillas (Querol, 1988).

## 2.5 CONDICIONES PARA EL ALMACENAMIENTO

Cuando se almacenan semillas en un banco, es necesario controlar ciertos parámetros a fin de maximizar la longevidad de las mismas. El almacenamiento de semillas ortodoxas es influenciado por factores tanto internos como externos (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Para un almacenamiento satisfactorio es esencial utilizar semillas sanas, bien maduras, con alta viabilidad inicial y bajo contenido de humedad (Biasutti Owen, 1956). Es probable que semillas de mala calidad pierdan más rápidamente su viabilidad que semillas de buena calidad, aún cuando estén en muy buenas condiciones de almacenamiento (Luse, 1978). Semillas sujetas a humedad y temperaturas extremas durante la maduración, cosecha y procesamiento pueden exhibir reducida viabilidad posteriormente (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Se ha comprobado en las últimas tres décadas, que el mantenimiento de la viabilidad de la semilla se puede extender considerablemente por medio de su almacenamiento a bajas temperaturas, con un bajo contenido de humedad en ella y bajas concentraciones de oxígeno (Luse, 1978). De acuerdo a ISTA (2015), el contenido de humedad de la semilla se refiere a la pérdida en peso cuando ésta es secada conforme a las reglas. Es expresado como un porcentaje en base fresca (porcentaje del peso fresco de la semilla) o en base seca (porcentaje del peso seco de la semilla). Usualmente en los bancos de germoplasma se utiliza base fresca para permitir comparaciones entre materiales. Comúnmente se define al contenido de humedad como la cantidad de agua en la semilla. La importancia en la determinación del contenido de humedad radica en que el mismo influye en el almacenamiento y también permite saber cuánto tiempo puede almacenarse esa semilla, realizando una predicción razonablemente certera (Hanson, 1985).

Según Harrington (1973), por cada punto porcentual de reducción del contenido de humedad de la semilla o por cada 5°C de disminución en la temperatura de conservación, se duplica la vida de una semilla. Estas consideraciones se aplican para contenido de humedad en la semilla entre 5 y 14% y para temperaturas ambientales entre 0 y 50°C.

Por debajo de 5% de humedad en la semilla, la velocidad de deterioro puede aumentar por la auto-oxidación de los lípidos, por encima de 14% el desarrollo de hongos destruye el poder germinativo de la semilla, asimismo todas las actividades biológicas dentro de determinados límites, son influenciados por la temperatura. La velocidad respiratoria de la semilla y de los hongos, aumenta con el aumento de la temperatura. También la actividad de los insectos es favorecida por el aumento de la temperatura (Popinigis, 1985).

El contenido de humedad puede ser determinado experimentalmente por técnicas de laboratorio, obteniéndose un resultado exacto; o puede predecirse en forma aproximada. Ha de destacarse que en la determinación, las muestras son destruidas. Es posible determinar la humedad de equilibrio a cierta temperatura y humedad relativa y confeccionar una tabla para realizar futuras predicciones (Hanson, 1985). ISTA (2015), establece una serie de métodos para determinar el contenido de humedad en semillas comerciales.

#### 2.5.1 Cambios en la semilla durante el almacenamiento

Hay una serie de causas y efectos de envejecimiento de la semilla durante el almacenamiento; Roos, citado por Querol (1988) establece tres tipos de cambios que ocurren durante el almacenamiento, cambios fisiológicos, bioquímicos esenciales y genéticos. Los cambios fisiológicos son básicamente inducción o pérdida de latencia, dependiendo de las especies, y un cambio en la temperatura máxima, mínima o ambas para la germinación óptima; los cambios bioquímicos son auto-oxidación de lípidos y el consecuente debilitamiento de las membranas, la reducción de la actividad enzimática y una reducción en la capacidad de reparación de las paredes celulares por falta de agua para la acción enzimática, esto último observado por Villers, citado por Querol (1988).

Los cambios genéticos son frecuentemente aberraciones y en ciertos casos mutaciones causadas por el almacenamiento, no influyen mayormente sobre la composición genética del material. Las mutaciones acumuladas son en última instancia, la causa de la muerte de las semillas. A pesar de estos cambios durante el almacenamiento, la capacidad de supervivencia de las semillas es notable, aún en condiciones bastante malas, Roos, citado por Querol (1988).

Si las condiciones de almacenaje son buenas, la viabilidad de las semillas es preservada por largos períodos, y el riesgo de obtener plantas inferiores provenientes de estas semillas es reducido (Biasittu Owen, 1956).

## 2.5.2 Tratamientos aplicables a las semillas para el almacenaje

### 2.5.2.1 Secado

En términos generales, el secado es la reducción del contenido de humedad de la semilla a los niveles recomendados para el almacenaje, utilizando técnicas que no afecten la viabilidad de la misma (Hanson, 1985).

La importancia del secado de la semilla radica en la posibilidad de almacenarlas en los bancos de germoplasma por largos períodos. A estos efectos se recomienda en general secar las semillas hasta un contenido de humedad de 3 a 7% para largos períodos de almacenamiento (Hanson, 1985).

Existen diversos métodos para secar semillas, algunos de los cuales son más adecuados para determinadas condiciones, sin afectar la viabilidad de las mismas (Hanson, 1985).

Dado que una alta temperatura de secado puede resultar en el deterioro de la semilla (Tao, citado por IBPGR, 1985), el uso de un deshumidificador o de sílica gel para el secado de la semilla a baja temperatura ha sido recomendado en bancos de germoplasma (Cromarty et al. 1985, Hanson, citado por el IBPGR 1985).

El secado con sílica gel es particularmente apropiado para bancos que tienen pequeñas colecciones de germoplasma (IBPGR, 1985). Este material es utilizado para reducir la humedad relativa de la atmósfera que rodea a las semillas (Hanson, 1985). Los días requeridos para bajar el contenido de humedad de las semillas con sílica gel, a 3 - 7% dependen de los siguientes factores: especie, tamaño y calidad de las semillas, contenido de humedad inicial y relación peso de sílica gel: semilla (Zhang y Tao 1988, Rovaretti et al., citados por Ardanaz y Borrajo 1994).

Utilizando distintas relaciones sílica gel/semilla el proceso de secado puede ser más rápido o más lento. Es importante establecer una relación adecuada, a los efectos que el secado se lleve a cabo en un tiempo óptimo, sin afectar la viabilidad de la semilla (Ardanaz y Borrajo, 1994).

### 2.5.2.2 Congelado

Cuando se almacenan semillas con temperaturas que no estén por debajo de -40°C, frecuentemente las células se mantienen en estado de súper enfriamiento, en el cual hay una continuación de la fase líquida, sin formación de hielo, debido a la falta de núcleos para la formación del mismo, a la existencia de moléculas en solución en alta concentración o al bajo contenido

de agua en la semilla (Olien, Burke et al., citados por Querol, 1988). Si se congelan semillas a tempranos estados de su imbibición, resultarán dañadas. Las plántulas producidas por tales semillas muestran varias anomalías morfológicas especialmente en las raíces y un pobre crecimiento.

## 2.6 MECANISMOS DE EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD

### 2.6.1 Test de germinación

Se utiliza el test de germinación con la finalidad de evaluar en qué grado es afectada la viabilidad. En él, se les da a las semillas las mejores condiciones ambientales de manera que expresen su máximo potencial germinativo.

Según Hanson (1985), dicho test es el más acertado a los efectos de evaluar la viabilidad de una semilla. Es un test estandarizado, fácil de realizar por cualquier laboratorio y con resultados fácilmente reproducibles (MAPA, 2009). La viabilidad es una medida de la cantidad de semillas vivas que pueden dar plantas capaces a su vez de producir descendencia, bajo condiciones apropiadas. Al inicio y durante el almacenamiento, las semillas deberán mantener una alta viabilidad. Es importante conocer la viabilidad para asegurar que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma darán plantas normales cuando se las siembre (Hanson, 1985).

Para que una plántula pueda continuar su desarrollo y transformarse en una planta normal debe presentar las siguientes estructuras esenciales: sistema radicular (raíz primaria y en cierto casos raíces seminales), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, mesocótilo), yemas terminales, cotiledones (uno o más) y coleóptilo (MAPA, 2009).

Según MAPA (2009), las plántulas normales son aquellas que muestran potencial para continuar su desarrollo y dar origen a plantas normales, cuando crecen bajo condiciones favorables. Para ser clasificadas como normales, las plántulas deben corresponderse a una de las siguientes categorías:

- plántulas intactas, plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas, proporcionales y sanas.
- plántulas con pequeños defectos, presentan pequeños defectos en sus estructuras esenciales, siempre y cuando muestren un desarrollo satisfactorio y equilibrado, cuando son comparadas con una plántula intacta en las mismas condiciones.
- plántulas con infección secundaria, son aquellas que están seriamente deterioradas debido a la presencia de hongos o bacterias, son clasificadas

como normales, si se verifica que la propia semilla no es la fuente de infección y se puede verificar que todas las estructuras esenciales están presentes.

Las plántulas anormales son aquellas que no muestran potencial para continuar su desarrollo y dar origen a plántulas normales, aún creciendo en condiciones favorables. Las siguientes plántulas son clasificadas como anormales:

- plántulas dañadas, con ausencia de alguna de las estructuras esenciales, impidiendo el desarrollo proporcional.
- plantas deformadas, son aquellas con desarrollo débil, disturbios fisiológicos o estructuras esenciales deformadas o desproporcionales.
- plántulas deterioradas, presentan alguna de sus estructuras esenciales muy infectadas o muy deterioradas, como resultado de una infección primaria (en la propia semilla), que comprometa su desarrollo normal.

ISTA (2015), establece como principios generales que el test de germinación debe ser hecho con semillas provenientes de la fracción de semilla pura de un test de pureza.

Las semillas, arregladas en repeticiones son analizadas bajo condiciones favorables de humedad, luz y temperatura, y de acuerdo al método prescrito para la especie (ISTA, 2015). Según Hanson (1985), si no existen condiciones estándares para determinada especie, se puede recurrir a la experiencia en lo que tiene que ver con las mejores condiciones para llevar a cabo el test.

Para los períodos indicados de conteo, las repeticiones son examinadas y se contabilizan plántulas y semillas. El resultado se expresa como porcentaje de germinación del promedio de las repeticiones. Éste indica la proporción, en número de semillas, que han producido plántulas clasificadas como normales bajo las condiciones del test y dentro del período especificado para la especie. También se contabiliza el porcentaje de semillas muertas y semillas duras (semillas que permanecen duras y sin germinar al final de un período de prueba dado, debido a que no han absorbido agua, a causa de una testa impermeable (ISTA, 2015).

Inspecciones al final del período pueden sugerir que el test pueda ser extendido. Esto es válido para semillas que recién hayan empezado a germinar al final del período o para semillas que se creían durmientes pero que germinan en el test (Ellis et al., 1985).



Como criterio general, se considera que una semilla ha germinado cuando ocurre la emergencia de las estructuras esenciales del embrión, las cuales se encuentran sanas y en perfecto estado de desarrollo (MAPA, 2009).

Referido a la temperatura, afecta tanto la proporción total de semillas que germinarán, como el tiempo requerido para que lo haga. Es importante destacar que existe una temperatura óptima para la germinación y que depende de cada especie. Esta temperatura óptima surge de la experimentación en cada banco de germoplasma. La temperatura del test influye la expresión de la dormancia de las semillas (IBPGR, 1985).

Al fin de evitar la pérdida de agua por evaporación, y por tanto aumentar el intervalo de riego de los germinadores, la humedad relativa en contacto con las semillas dentro del germinador debe ser elevada (MAPA, 2009).

Suficiente agua debe ser suministrada a las semillas para permitir que su contenido de humedad sea elevado a los efectos que la germinación ocurra. Posteriormente el agua es usada para el crecimiento de las plántulas. Un exceso de agua es problemático, se da una reducción de la concentración de oxígeno y puede ocurrir germinación anormal o fracaso en la germinación. Además, puede aumentar la competencia por oxígeno de los microorganismos (Ellis et al., 1985).

Un exceso de humedad al comienzo de la imbibición puede también resultar en un tipo de daño, llamado daño por imbibición. Consiste en una rápida toma de agua por parte de la semilla, resultando en la muerte de las células que rodean a los cotiledones, este daño está bien documentado en leguminosas (Ellis et al., 1985); ellas se caracterizan por poseer una cubierta llamada testa. Generalmente es una cobertura dura.

Su importancia fisiológica se debe a la presencia de una cutícula externa e interna, frecuentemente lipídica o serosa y una o más capas espesas. Estas características confieren a la testa un cierto grado de impermeabilidad al agua y/o a los gases, incluido el oxígeno. Puede entonces ejercer una influencia regulatoria sobre el metabolismo y crecimiento de los tejidos internos y órganos de la semilla. Debido a estas características, la testa puede ser un regulador efectivo en la toma de agua (Ellis et al., 1985). Si está dañada o no está presente, semillas sometidas a un alto contenido de agua en el medio de germinación tendrán mayores probabilidades de sufrir daño por imbibición.

El proceso germinativo requiere un abastecimiento de energía que es dado por reacciones oxidativas, en presencia o ausencia de oxígeno. La mayoría de las especies necesitan de aireación, o sea, presencia de oxígeno

para germinar. Un tenor de 20% de oxígeno en la atmósfera es suficiente, pudiendo haber disminución de la germinación de algunas especies si su tenor baja significativamente del nivel normal de la atmósfera (Popinigis, 1985).

Existen varios sustratos, para realizar el test de germinación siendo el más usado el papel. Las semillas pueden colocarse en la superficie o entre dos láminas de papel. Usualmente es blanco, poroso, para permitir que el agua penetre, fuerte, para mantener la estructura cuando está húmeda, libre de hongos y bacterias y no debe contener sustancias tóxicas que puedan perjudicar la germinación (Ellis et al., 1985).

Aquellas semillas que aún puestas en condiciones óptimas para germinar (luz, humedad y temperatura adecuada, dependiendo de la especie) no lo hacen, presentan un estado definido como dormancia. El que estas semillas no germinen no significa que el embrión no sea viable (Grela et al., 1992). Para el caso particular de las leguminosas, la dormancia ocurre por la dureza de sus cubiertas. Las leguminosas nativas presentan este problema en forma muy marcada, por lo que es imprescindible desarrollar técnicas apropiadas para superar la dormancia.

Dentro de las técnicas utilizadas para superar la dormancia se encuentra la escarificación física, el tratamiento con ácido sulfúrico, calor, tratamientos mecánicos y el uso de tiourea (Kretschner, 1978).

La escarificación física es recomendada para superar la dormancia. Consiste en una cuidadosa perforación de la cubierta, removiendo una porción de la misma con el uso de una lija de papel, debe realizarse con extremo cuidado para evitar daños en el embrión, para ello se perfora sobre la parte opuesta al embrión. El tratamiento con ácido sulfúrico concentrado es indicado para superar la dormancia de algunas unidades de dispersión, éstas son colocadas en el ácido hasta la escarificación de la cubierta de la semilla (MAPA, 2009).

La aplicación de calor puede ser un método efectivo en algunos casos. Cuando las semillas tienen una cubierta dura, se pueden colocar en agua o en un horno manteniendo la temperatura a 75 - 90°C durante 24 horas. La temperatura no debe llegar a 100°C. Alterar temperaturas frías y calientes también puede ayudar a obtener una buena germinación (MAPA, 2009).

En un ensayo realizado por Grela et al. (1992), que refiere al "levantamiento de la dormancia en semillas de leguminosa", trabajando con varias especies y aplicando varias técnicas, se encontró que, si bien en la mayoría de los casos ocurrió un aumento en la germinación, no se logró

completar el test en corto tiempo, ya que siempre quedaron semillas durmientes. En el único caso en que se logró completar el test fue con la escarificación física, lo que permite concluir que el principal, sino el único impedimento que presentan estas semillas para su germinación es la gran impermeabilidad de la cubierta seminal, que impide la imbibición de la semilla, condición necesaria para que ésta germine. Una vez levantado dicho impedimento las semillas responden en forma inmediata.

### 2.6.2 Test de tetrazolio

El objetivo del test de tetrazolio es determinar de forma rápida la viabilidad de las semillas, principalmente de especies que germinan lentamente en test normales, o que no germinan cuando son sometidas a los métodos normalmente usados, por estar en dormancia (MAPA, 2009).

Una semilla viable es aquella que está viva. Esto no significa que puesta en condiciones óptimas sea capaz de germinar. Las semillas viables que están durmientes pueden requerir tratamientos específicos complementarios antes de que puedan germinar (Grabe, 1976).

El test puede además ser usado para detectar daños mecánicos, causas de anomalías, de deterioro o de baja germinación, así como también el vigor de lotes de semillas (MAPA, 2009).

Cuando al finalizar un test de germinación se observan semillas durmientes o hinchadas, el test de tetrazolio puede ser aplicado a estas semillas en forma individual para determinar su viabilidad. En este caso, las mismas son removidas del sustrato y preparadas para el test. La técnica del tetrazolio a nivel bioquímico se caracteriza por la reducción de un indicador en el interior de las células vivas de la semilla. El indicador utilizado es una solución incolora y que difunde, preparada con la sal de 2, 3, 5 trifenil cloruro o bromuro de tetrazolio, la cual es absorbida por la semilla (MAPA, 2009).

El sistema enzimático, participante en el sistema de respiración que ocurre en todas las células vivas del embrión de las semillas es el responsable del proceso de descomposición y degradación de los carbohidratos y otros compuestos orgánicos almacenados en los tejidos vivos del mismo. Este sistema, del cual las enzimas deshidrogenasas forman parte, actúa en el proceso de respiración, en presencia de oxígeno, humedad, sustrato y temperaturas favorables. En este proceso ocurre, además de la producción de dióxido de carbono, agua y energía la formación de sustancias intermedias, las cuales son responsables de la transferencia de iones hidrógeno al tetrazolio quien actúa como receptor de los mismos. El tetrazolio es entonces reducido a

formazán, un producto insoluble y rojo. Como esta reacción se procesa en el interior de la célula y el pigmento formazán no es difusible hay una nítida separación de los tejidos coloreados que respiran, de aquellos muertos, los que mantienen su color natural (MAPA, 2009).

Como se mencionó, el objetivo del test es distinguir semillas viables y no viables. Así mismo, con una evaluación cuidadosa es posible separar las distintas categorías de semillas dentro de cada uno de estos dos grupos (MAPA, 2009).

Embriones viables se colorean completamente, si lo hacen parcialmente los patrones de coloración presentados indican si la semilla es viable. Semillas no viables son aquellas que no cumplen estos requisitos, presentan coloraciones poco características y sus estructuras esenciales están blandas (MAPA, 2009).

Semillas con desarrollo anormal del embrión o de otra estructura esencial deben ser consideradas como no viables. Son considerados como tejidos esenciales y todas las estructuras reconocidas como necesarias en el desarrollo normal de la plántula (MAPA, 2009).

Para una evaluación cuidadosa de las semillas, es necesario exponer el embrión con todas sus estructuras esenciales, siendo indispensable el uso de los microscopios estereoscópicos y lupa (MAPA, 2009).

## 2.7 TRATAMIENTOS PARA PROMOVER LA GERMINACIÓN

Por varias razones (dormancia fisiológica, dormancia física o sustancias inhibitoras), un número considerable de semillas duras o durmientes pueden permanecer sin germinar al final del test. Una germinación más completa puede ser obtenida realizando un nuevo test, utilizando un tratamiento o una combinación de tratamientos. Éstos también pueden ser realizados en un test inicial si existe la sospecha de dormancia. El período de tratamiento no está incluido en la duración del test de germinación (MAPA, 2009).

### 2.7.1 Métodos para superar la dormancia fisiológica

#### 2.7.1.1 Almacenamiento en locales secos

Para las especies en las cuales la dormancia es de corta duración, muchas veces para superarla es suficiente con almacenar la muestra en locales secos por un corto período (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.2 Pre-enfriamiento

Semillas de grandes culturas forrajeras, forestales, hortalizas, ornamentales, condimentos y medicinales son colocadas en sustrato humedecido, como test regular de germinación y llevadas a una temperatura entre 5 - 10°C. Luego de este período, las semillas son transferidas al germinador a la temperatura indicada para la especie en análisis, iniciándose entonces el test de germinación propiamente dicho. En algunos casos, puede ser necesario rehumedecer el sustrato y extender el período de pre-enfriamiento o repetirlo (MAPA, 2009).

Para las especies que requieren un largo período de pre- enfriamiento es donde el test de germinación no puede ser completado dentro de dos meses, son recomendados tests rápidos de viabilidad, como el test de tetrazolio (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.3 Pre-calentamiento

Algunas semillas pueden ser sometidas a métodos para superar la dormancia por pre-calentamiento (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.4 Nitrato de potasio - KNO<sub>3</sub>

Las semillas son colocadas a germinar en sustrato inicialmente humedecido con una solución de 0,2% de nitrato de potasio (2 kg de KNO<sub>3</sub> disueltos en 1000 ml de agua). El sustrato es previamente saturado con esa solución, pero el re humedecimiento, si es necesario, debe ser hecho con agua (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.5 Ácido giberélico - GA<sub>3</sub>

Este método es recomendado para cereales de clima templado. El sustrato de germinación es humedecido con una solución 0,05% de GA<sub>3</sub>, preparada por medio de la disolución de 500 mg de GA<sub>3</sub> en un litro de agua. Cuando la dormancia es menos intensa una solución de 0,02% puede ser suficiente, cuando ésta es más intensa puede ser usada una concentración de hasta 0,1%. Cuando es necesaria una concentración mayor a 0,08%, la disolución del GA<sub>3</sub> en una solución buffer de fosfato es recomendada. La solución buffer es preparada mediante la disolución de 1,7799 g de fosfato monoácido de sodio bihidratado (Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) y 1,3799 g de fosfato biácido de sodio monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) en un litro de agua destilada (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.6 Germinación a baja temperatura

La germinación de ciertas semillas que presentan dormancia puede ser estimulada si el test es conducido a una temperatura constante inferior a la recomendada, o a una temperatura alternada disminuyendo aún más la temperatura mínima especificada. En este caso, la germinación podrá ser más lenta y la duración del test puede ser extendida por algunos días más (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.7 Luz

Para semillas que exigen la presencia de luz y condiciones de temperaturas alternadas, los tests deben ser iluminados por lo menos durante 8 horas a cada ciclo de 24 horas, en el período de temperatura más alta. Para estas semillas la intensidad de la luz debe ser de 750 lux como mínimo, proveniente de luz blanca y fría (MAPA, 2009).

#### 2.7.1.8 Sobres de polietileno cerrados

Sobres de polietileno bien ajustados y cerrados pueden ser usados para envolver los sustratos conteniendo semillas, como un método para superar más fácilmente la dormancia, por ejemplo, para algunas especies de *Trifolium* (MAPA, 2009).

### 2.7.2 Métodos para superar dormancia física

Pueden aparecer semillas con dormancia y/o duras, en algunas especies, si ningún tratamiento fue hecho para promover la germinación.

Algunos tratamientos específicos pueden ser usados para obtener la germinación máxima. El tratamiento puede ser hecho antes del inicio del test de germinación o después, solo en las semillas que permanezcan duras al final del test (MAPA, 2009).

#### 2.7.2.1 Imbibición

Semillas con tegumento duro pueden germinar más rápidamente luego de la imbibición en agua, por un período de 24 - 48 horas. El test de germinación se inicia luego del período de imbibición (MAPA, 2009).

Tratamiento por inmersión en agua caliente o escaldado, consiste en sumergir la semilla en agua a temperatura entre 75 y 100°C, dejando enfriar durante 12 horas (MAPA, 2009).

Ensayos parciales previos determinan la temperatura más adecuada (MAPA, 2009).

Tratamiento por inmersión en agua fría o macerado, se sumergen las semillas en agua a temperatura ambiente entre 24 y 48 horas (MAPA, 2009).

#### 2.7.2.2 Escarificación mecánica

La escarificación mecánica se recomienda para superar la dureza (MAPA, 2009).

Cuidadosa perforación, remoción de un segmento de la semilla, uso de lima o lija de papel sobre el tegumento de la semilla puede ser suficiente para superar la condición de dormancia. Se debe tomar precaución al escarificar el tegumento de la semilla en la parte apropiada, para evitar daños en el embrión, por lo cual debe ser hecho en la parte opuesta al eje del embrión (MAPA, 2009).

#### 2.7.2.3 Escarificación química

Tratamiento con ácido, consiste en escarificar las cubiertas mediante ataque con ácido, normalmente sulfúrico, de concentración comercial, haciendo variar el tiempo de exposición entre 15 y 60 minutos y la temperatura entre 15 y 25°C. Requiere un manejo cuidadoso y ensayos parciales previos para encontrar la concentración, el tiempo y la temperatura adecuados a cada lote, pues un exceso de ataque puede destruir la semilla y un defecto hacer inútil el tratamiento. Posteriormente se lavan las semillas con agua abundante. Es un tratamiento habitual para leguminosas (MAPA, 2009).

### 2.8 MÉTODOS PARA REMOVER LAS SUSTANCIAS INHIBIDORAS

Pueden aparecer semillas con dormancia y/o duras, en algunas especies, si ningún tratamiento fue hecho para promover la germinación (MAPA, 2009).

Algunos tratamientos específicos pueden ser usados para obtener la germinación máxima. El tratamiento puede ser hecho antes del inicio del test de germinación o después, solo en las semillas que permanezcan duras al final del test (MAPA, 2009).

#### 2.8.1 Lavado previo

Cuando la germinación es afectada por la presencia de sustancias inhibitoras en el pericarpo de los frutos o en el tegumento de las semillas, ésta

puede ser removida mediante lavado con agua corriente antes del test. Luego de esto se debe secar las semillas a temperatura ambiente (MAPA, 2009).

#### 2.8.2 Remoción de estructuras que envuelven las unidades de dispersión

La germinación de ciertas especies es estimulada por la remoción de las estructuras externas que envuelven a las “unidades de dispersión” como las lemas o páleas en algunas *Poaceae* (MAPA, 2009).

### 2.9 DESINFECCIÓN DE LA SEMILLA

Solamente para muestras de *Arachis hypogaea* y *Beta vulgaris*, pueden ser utilizados tratamientos con fungicida antes de sembrar la semilla para el test de germinación, cuando se sabe que el lote de semillas no recibió este tratamiento. Cuando un pre tratamiento con fungicida es usado, el nombre del producto químico, el porcentaje de ingrediente(s) activo(s), dosis, deben ser informados en el boletín de análisis de semillas (MAPA, 2009). Boletín azul, para los resultados de los análisis relativos únicamente a muestras enviadas para su examen y boletín amarillo-anaranjado, únicamente para análisis de muestras tomadas por un funcionario del servicio oficial de ensayo de semillas, en lotes de productos precintados luego por el mismo (MAPAMA, 1941).

### 2.10 DURACIÓN DEL TEST DE GERMINACIÓN

La duración del test para cada especie es indicada según el número de días al momento del conteo final. En esta duración no está incluido el período de pre tratamiento, con la finalidad de superar la dormancia de las semillas. Al final del período del test, si algunas semillas apenas iniciaron la germinación, el test puede ser prolongado durante 7 días más o hasta la mitad del período indicado, para pruebas más demoradas. El test puede darse por culminado antes del tiempo indicado, cuando ya se obtuvo la germinación máxima (MAPA, 2009).

El número de días para el primer conteo es aproximado y un desvío de uno a tres días es permitido, desde que sea suficiente para la evaluación correcta de las plántulas. Para test en arena con duración no mayor a diez días, el primer conteo puede ser omitido. Cuando se trata de semillas cuyo período de germinación es largo o en el caso de muestras que contengan semillas infectadas, el analista podrá hacer conteos intermediarios. La finalidad de estos conteos es remover plántulas que están suficientemente desarrolladas y así facilitar los conteos subsiguientes, y evitar que éstas afecten el desenvolvimiento de otras plántulas. Posterior a las correspondientes



anotaciones se realizan conteos donde las plántulas son evaluadas, eliminando del sustrato las normales, las que presentan infecciones y las semillas muertas (MAPA, 2009).

Se conservan las semillas que aún no han germinado o las que están en estado inicial de germinación, las plántulas que no presentan desarrollo suficiente para ser evaluadas y las que presentan alguna anomalía. El número de conteos intermedios debe ser el mínimo para reducir el riesgo de daño a las estructuras de las plántulas que no estén bien desarrolladas, la pérdida de humedad del sustrato y la contaminación del test (MAPA, 2009).

## 2.11 ASPECTOS GENERALES DE LAS ESPECIES

*Handroanthus heptaphyllus* (lapacho rosado), *Parapiptadenia rigida* (angico), *Peltophorum dubium* (ibirapitá), *Vachellia caven* (espinillo).

### 2.11.1 Características de la especie *Handroanthus heptaphyllus*

Familia: BIGNONIACEAE

Lapacho, lapacho rosado o ipe son los nombres comunes con los que se reconoce esta especie (Brussa y Grela, 2007).

Originario de las zonas subtropicales de América del sur, donde habita bosques húmedos alrededor de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay, específicamente en los departamentos de Artigas y Salto (Brussa y Grela, 2007).

Se trata de una especie de hoja caduca que en su lugar de origen alcanza más de 30 metros de altura. La corteza es de color grisáceo, agrietada en los ejemplares añejos, duros y difíciles de desprender, forma sin embargo escamas rectangulares. Presenta hojas de forma palmada, con folíolos ovados de borde aserrado. Las flores son de forma tubular acampanada, y de un color rosa violáceo, dispuestas en panículos terminales. La floración ocurre a finales del invierno cuando el árbol está todavía sin hojas. Los frutos son cápsulas dehiscentes, cilíndricas, pubescentes y péndulas, formadas por valvas de color marrón; fructifica a fines de primavera (Jolochin y Speroni, 2007).

Además de su valor ornamental, su madera es muy utilizada por su gran dureza, se le atribuyen importantes propiedades medicinales (Brussa y Grela, 2007).



Figura 3. Distribución de *Handroanthus heptaphyllus* en Uruguay

### 2.11.2 Características de la especie *Parapiptadenia rigida*

Familia: FABACEAE

Subfamilia: Mimosoideae

El angico, también llamado curupay o paricá tiene una distribución regional característica de bosques tropicales y subtropicales de Paraguay, noreste de Argentina, centro y sur de Brasil y noroeste del Uruguay (Brussa y Grela, 2007).

Son árboles que pueden alcanzar gran tamaño, hasta 25 metros de altura y 80-90 cm de diámetro a la altura del pecho, su fuste es recto, de copa amplia y globosa y una corteza oscura y rugosa (Jolochin y Speroni, 2007).

Sus hojas son compuestas bipinnadas, 4 a 9 yugadas, alternas, con pecíolos glabros o pubérulos, con una glándula notoria alargada y sésil, folíolos pequeños, discolors, oblongos y lanceolados, asimétricos, de margen entero, con 3 a 4 nervaduras principales bien marcadas y láminas con la cara superior

verde oscura y la inferior más clara. Pecíolo con glándula elíptica o fusiforme notoria (Jolochin y Speroni, 2007).

El follaje es de textura fina, oscura y lustrosa, semi-persistente (Jolochin y Speroni, 2007).

Las flores se caracterizan por estar agrupadas en espigas axilares, poco vistosas. La corola consta de 5 pétalos de color amarillo verdoso, soldados en la base; están revestidos emergiendo al doble del largo de la corola (Jolochin y Speroni, 2007).

En cuanto a su fruto, éste es una legumbre comprimida lateralmente, de 10-16 cm de largo, de color castaño oscura, con semillas achatadas, redondeadas y rodeadas por un ala de color castaño rojizo (Jolochin y Speroni, 2007).

Con respecto a su fenología, la floración ocurre en enero, pasando relativamente inadvertida; fructifica en otoño (Jolochin y Speroni, 2007).

*Parapiptadenia rigida* se multiplica fácilmente por semillas. Su madera, dura y con gran durabilidad natural es muy utilizada en carpintería. Se utiliza además como árbol ornamental, así como para sombra por su rápido crecimiento y rusticidad (Brussa y Grela, 2007).

En Uruguay, es un árbol característico de los bosques de quebradas de Artigas y Rivera, con escasa presencia y grandes dimensiones. Ocupa generalmente las zonas más bajas y húmedas y forman el estrato superior del dosel. También crece en los bosques ribereños, en los mismos departamentos, en este ambiente puede encontrárselo además en los bosques del río Uruguay y afluentes (Brussa y Grela, 2007).



Figura 4. Distribución de *Parapiptadenia rigida* en Uruguay

### 2.11.3 Características de la especie *Peltophorum dubium*

Familia: FABACEAE

Subfamilia: Caesalpinoideae

Conocido como ibirapitá, árbol de Artigas o cañafístula (Brussa y Grela, 2007).

Se distingue por ser un árbol que puede alcanzar una altura de 20 metros, con follaje caduco y amplia copa. Es una especie de origen sudamericano, se distribuye en Argentina, Paraguay, Brasil y norte de Uruguay. Crece en bosques ribereños del río Uruguay en el norte del país, con énfasis en el departamento de Artigas (Jolochin y Speroni, 2007).

Posee hojas compuestas, bipinnadas, multiyugadas, alternas, de hasta 40 cm de largo, con pubescencia ferrugínea en pecíolos y ramillas, folíolo oblongo de borde entero y nervadura principal centrada (Jolochin y Speroni, 2007).

Sus flores son amarillas, agrupadas en grandes panojas terminales, piramidales, dispuestas en la parte superior de la copa; de enero a marzo ocurre su floración (Jolochin y Speroni, 2007).

Fruto legumbre coriácea, indehisciente, con una o dos semillas rodeadas por un ala membranácea, amarronada, durante otoño e invierno se produce el fructificación (Jolochin y Speroni, 2007).

Se destaca por ser una especie destinada a uso ornamental y forestal (Brussa y Grela, 2007).



Figura 5. Distribución de *Peltophorum dubium* en Uruguay

#### 2.11.4 Características de la especie *Vachellia caven*

Familia: FABACEAE

Subfamilia: Mimosoideae

*Vachellia caven* es una especie de origen sudamericano, conocida con el nombre común de espinillo. En Uruguay se encuentra en los departamentos del litoral, aunque tiene amplia distribución en todo el país. Distinguido para uso ornamental y forestal (Brussa y Grela, 2007).

Dentro de sus características distintivas se destaca por ser un árbol de hasta 7 metros de altura, espinoso, con hojas compuestas, bipinnadas, multiyugas, alternas, con estípulas geminadas espinosas, divergentes, blancas. Sus flores de 5-8 mm se encuentran agrupadas en cabezuelas y a su vez éstas en capítulos globosos, en braquiblastos sobre ramillas del año anterior, muy perfumadas. La floración ocurre a partir del mes de agosto.

En lo que respecta a su fruto éste es una legumbre indehiscente, cilíndrica, negruzca, de ápice pungente, de hasta 2 cm de ancho (Jolochin y Speroni, 2007).

Las semillas están inmersas en un tejido esponjoso, algo comprimidas, de color castaño oscuras y opacas. La fructificación se da a partir del mes de setiembre (Brussa y Grela, 2007).

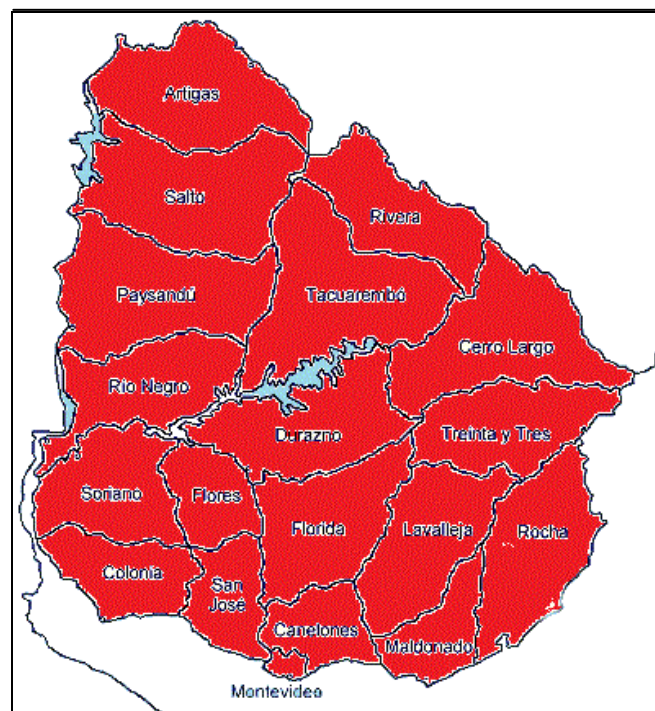


Figura 6. Distribución de *Vachellia caven* en Uruguay

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDENCIA DE LA SEMILLA

La semilla usada en los ensayos de germinación, fue suministrada por el Centro de Germoplasma del Vivero de Toledo “Dr. Alejandro Gallinal”, perteneciente al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

#### 3.2 ESPECIES UTILIZADAS

Las especies ensayadas fueron las siguientes:

- *Handroanthus heptaphyllus* (recolectada en Montevideo, 2016).
- *Parapiptadenia rigida* (recolectada en Canelones, 2016).
- *Peltophorum dubium* (recolectada en Montevideo, 2016).
- *Vachellia caven* (recolectada en Fray Bentos, 2016).

#### 3.3 MATERIALES

En el laboratorio se utilizó: ácido sulfúrico, agua destilada, hipoclorito de sodio, cloruro de tetrazolio, matraz, probeta, lupa, bisturí, varillas de vidrio, pipetas, vaso de bohemia, colador de malla metálica, pinzas, cronómetro, placas de petri, papel secante, equipo de protección personal (lentes, guantes, tapa boca), bicarbonato de sodio, estufa de germinación con alternancia de luz y temperatura, 8 horas a 20°C y 16 horas a 28°C.

La etapa de laboratorio fue realizada en el laboratorio del Centro de Germoplasma de la División General Forestal. Los tratamientos definidos fueron, utilización de ácido giberélico, agua caliente y escarificación con ácido sulfúrico además del testigo. No hubo discriminación de especies para los diferentes tratamientos, sometiendo a todas ellas a los mismos ensayos a modo de comparar los resultados obtenidos. Paralelamente se llevó a cabo en una muestra representativa, el test de viabilidad de las semillas mediante el uso de tetrazolio. Se estableció un número de 100 semillas por tratamiento con 4 repeticiones cada uno, trabajando así con un total de 400 semillas por especie en cada tratamiento.

#### 3.4 METODOLOGÍA

Esta actividad comienza con la desinfección previa de todas las semillas a utilizar, provenientes de la cámara del vivero, sumergiéndolas en

200ml de agua destilada con 10 gotas de hipoclorito durante 2 minutos. Posteriormente se dejaron secar y se procedió a realizar los tratamientos.

Las primeras semillas sembradas fueron las correspondientes a los testigos, las mismas se colocaron en placas de petri con papel secante humedecido con agua destilada en una cantidad de 50 semillas por placa, excepto las de *Handroanthus heptaphyllus* que fueron 25 por placa debido a su tamaño.

El primer tratamiento realizado fue el uso de ácido giberélico 80%, el cual ejerce un efecto promotor de la germinación; se utilizó una concentración de 500 mg/litro de agua destilada según recomendación del prospecto. Se sumergió el papel secante en dicha dilución para posteriormente colocarlo en las placas de petri sobre el cual se colocaron las semillas. Se repitió este tratamiento en todas las especies a estudiar y posteriormente se colocaron las placas en la germinadora, la cual se programó con 16hs de luz y 8hs de oscuridad con una alternancia de temperatura de 28°C y 20°C respectivamente.

El segundo tratamiento realizado fue el de inmersión en agua caliente, colocando las semillas en agua (previamente hervida) y dejando las mismas hasta que ésta se enfríe naturalmente. Posteriormente se prosiguió a humedecer el papel secante en agua destilada y sembrar las semillas sobre él, en las respectivas placas, las cuales también fueron introducidas en la germinadora.

Por último, se realizó el tratamiento con ácido sulfúrico (98%), donde se sumergieron las semillas en 200 ml de ácido, dejándolas allí un tiempo relativo según su reacción con el mismo y la disminución de la dureza de la testa, variando esto con la especie. Se realizó un enjuague con abundante agua, se las dejó secar y se procedió a la siembra, también sobre papel secante previamente humedecido en agua destilada.

Teniendo todas las placas en la germinadora con el etiquetado correspondiente se llevaron a cabo los posteriores conteos de germinación en un lapso de una semana cada uno. El primer conteo se realizó a los 7 días, el segundo a los 14 días y el tercero a los 21 días. Allí se registró el número de semillas germinadas por placa, por tratamiento y por especie.

El procedimiento empleado en el laboratorio se basó en el análisis de germinación de semillas, siguiendo los estándares International Seed Testing Association (ISTA), para comparar diferentes tratamientos pre-germinativos. El trabajo realizado tuvo como limitante la falta de información previa y específica para las especies ensayadas; por lo cual esta investigación servirá como una



línea de avance preliminar que deberá continuar y profundizarse a futuro, contemplando mayor número de especies y parámetros evaluados.

Los tratamientos pre-germinativos se realizaron con el fin de homogeneizar y acelerar la germinación. Esto puede cuantificarse en cierta forma a través de determinados parámetros como porcentaje de germinación, poder germinativo y días desde la siembra hasta la máxima emergencia.

Se puede promover la germinación de semillas con testa dura, siempre que no haya otro tipo de latencia, con cualquier método que rompa o modifique esa testa. Los tratamientos seleccionados incluirían estos efectos; el agua, modifica las cubiertas y remueve los inhibidores; el ácido sulfúrico elimina total o parcialmente la cubierta por corrosión; el corte de testa actuaría también eliminando el efecto de la impermeabilidad de la cubierta, permitiendo la entrada de agua y el ácido giberélico actúa estimulando la germinación.

El testigo se incluyó con el propósito de comparar el efecto de los tratamientos con la ausencia de los mismos.

Para realizar una comparación entre tratamientos se realizaron análisis estadísticos, tomando como referencia el método de Tukey, utilizado el análisis de varianza (ANAVA) para crear intervalos de confianza de 95%.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos y se discute brevemente el significado de los mismos para cada especie que fue evaluada en el laboratorio.

En los cuadros que se adjuntan, se registran los siguientes parámetros:

- porcentaje de germinación, es el número de semillas germinadas y/o emergidas, en todo el período, respecto al total de semillas sembradas. Se expresa en porcentaje y cuantifica los resultados obtenidos.
- poder germinativo, es el número de semillas germinadas y/o emergidas, considerando el período que va desde la siembra hasta la máxima emergencia. Se expresa en porcentaje respecto al total de semillas sembradas.
- días desde la siembra hasta la máxima emergencia, es una forma práctica de registrar el tiempo hasta la máxima emergencia.

Estos parámetros figuran en los cuadros de la siguiente manera:

- %Ger: porcentaje de germinación
- P. ger: poder germinativo
- dsme: días desde la siembra hasta la máxima emergencia
- T: testigo
- GAs: giberelinas
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico
- A.c.: agua caliente

Cuadro 1. Primer conteo *Handroanthus heptaphyllus*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
T	1	1	0	6	6	8	3	6	1
GAs	5	7	9	6	3	4	7	8	10
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	6	8	9	12	9	12	10	14	11

Cuadro 2. Primer conteo *Handroanthus heptaphyllus* (continuación)

	<b>P10</b>	<b>P11</b>	<b>P12</b>	<b>P13</b>	<b>P14</b>	<b>P15</b>	<b>P16</b>	<b>Total</b>
T	6	2	0	3	3	4	4	54
GAs	11	5	5	2	7	6	6	101
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	17	7	5	5	10	10	10	

Cuadro 3. Segundo conteo *Handroanthus heptaphyllus*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>
T	11	4	8	7	9	2	6	3	9
GAs	7	9	1	6	4	4	6	2	4
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	18	13	9	14	13	6	12	5	13

Cuadro 4. Segundo conteo *Handroanthus heptaphyllus* (continuación)

	<b>P10</b>	<b>P11</b>	<b>P12</b>	<b>P13</b>	<b>P14</b>	<b>P15</b>	<b>P16</b>	<b>Total</b>
T	6	2	3	2	8	4	6	86
GAs	2	3	2	3	6	4	0	81
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	5	5	5	14	8	6	

Cuadro 5. Tercer conteo *Handroanthus heptaphyllus*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>
T	0	6	0	0	1	0	3	5	1
GAs	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	6	0	0	1	0	3	5	1

Cuadro 6. Tercer conteo *Handroanthus heptapyhllus* (continuación)

	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	Total
T	2	1	1	0	0	0	1	21
GAs	1	1	0	0	0	1	0	3
H2SO4	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	3	2	1	0	0	1	1	

Cuadro 7. Valores de los parámetros de germinación en *Handroanthus heptapyhllus*

	C1 sem.	C1 (%)	C2 sem.	C2 (%)	C3 sem.	C3 (%)	Tot sem. (*)	% Ger.	P. ger.	dsme (días)
T	54	13,5	86	21,5	21	5,3	161	40,3	21,5	21
GAs	101	25,3	81	20,3	3	0,8	185	46,3	25,3	7
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---

(\*): Total de semillas. ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ )

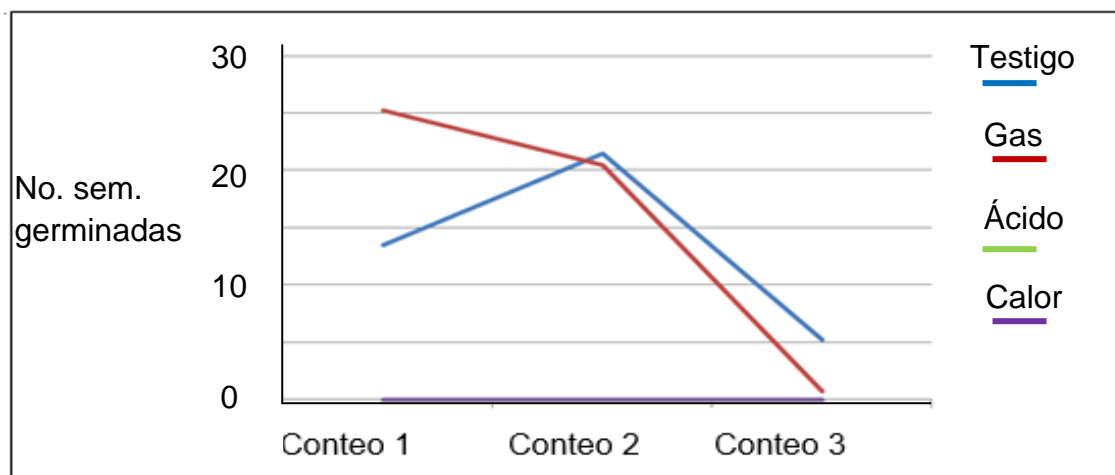


Figura 7. Porcentaje de germinación según tratamiento en *Handroanthus heptaphyllus*

Cuadro 8. Análisis estadístico en *Handroanthus heptaphyllus*

Tratamientos	Medias	Error experimental
Agua caliente	0,00 <sup>a</sup>	0,29
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,00 <sup>a</sup>	0,29
Testigo	3,44 <sup>b</sup>	0,29
GAs	3,48 <sup>b</sup>	0,29

\*Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ )

Para visualizar lo expuesto en los cuadros, se elaboraron gráficos para cada especie, en donde figura el número de semillas germinadas en los diferentes conteos.

#### 4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN *Handroanthus heptaphyllus*

Del cuadro anterior, a través del mencionado análisis, se desprende que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con agua caliente y ácido sulfúrico; tampoco lo hay al utilizar giberelinas en comparación al testigo. Las diferencias están dadas entre los dos primeros tratamientos con respecto a los últimos.

A pesar de haber obtenido una buena germinación lo único que presentó diferencias significativas fue el dsme, el uso de hormonas aceleró el proceso de geminación, pero no mejoró la misma.

Cabe destacar que la especie en estudio presentó un bajo porcentaje de germinación, independientemente de los tratamientos utilizados. Una de las causas posibles podría ser disponer únicamente de semilla recolectada en el año 2016 y en un conjunto de árboles en Montevideo, tal vez la baja germinación pudo deberse a un efecto año, siendo las condiciones climáticas las que generan las mayores variaciones en la germinación.

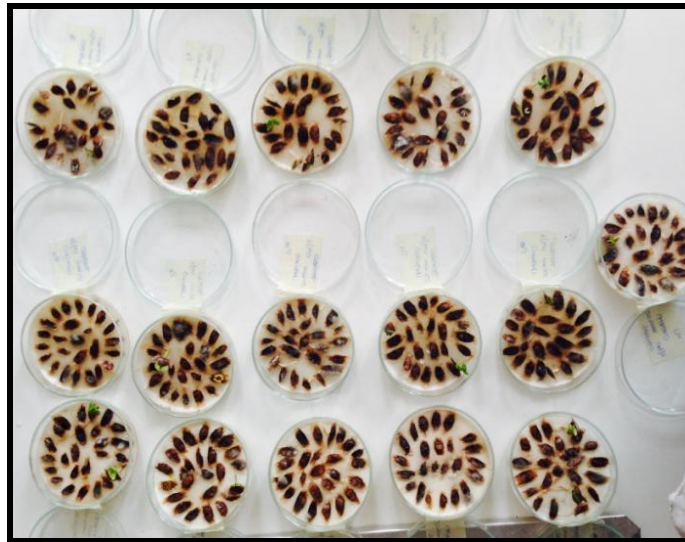


Figura 8. Conteo inicial en *Handroanthus heptaphyllus*. Testigo

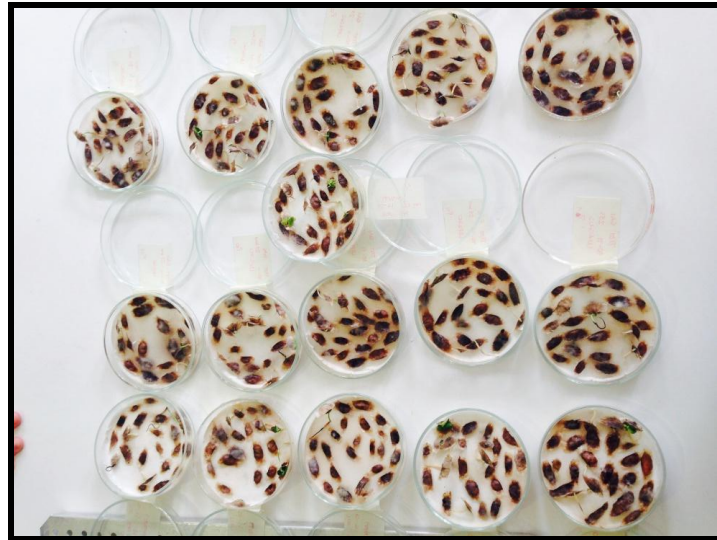


Figura 9. Conteo inicial en *Handroanthus heptaphyllus*. Tratamiento con giberelinas



Figura 10. Conteo inicial en *Handroanthus heptaphyllus*. Tratamiento con ácido sulfúrico

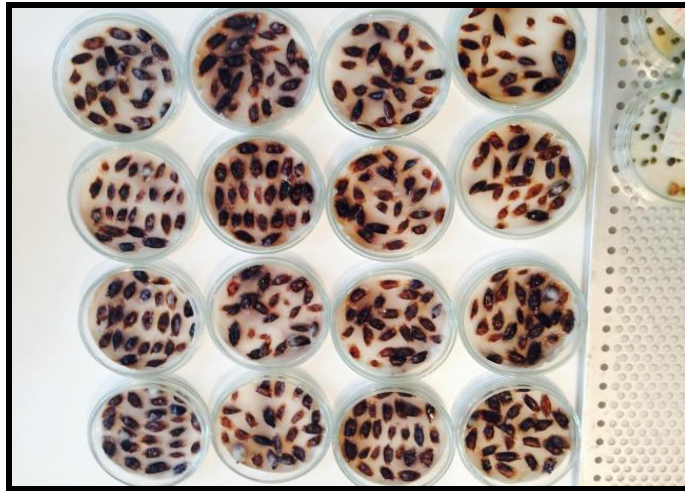


Figura 11. Conteo inicial en *Handroanthus heptaphyllus*. Tratamiento con agua caliente



Figura 12. Conteo final en *Handroanthus heptaphyllus*. Testigo





Figura 13. Conteo final en *Handroanthus heptaphyllus*. Tratamiento con giberelinas

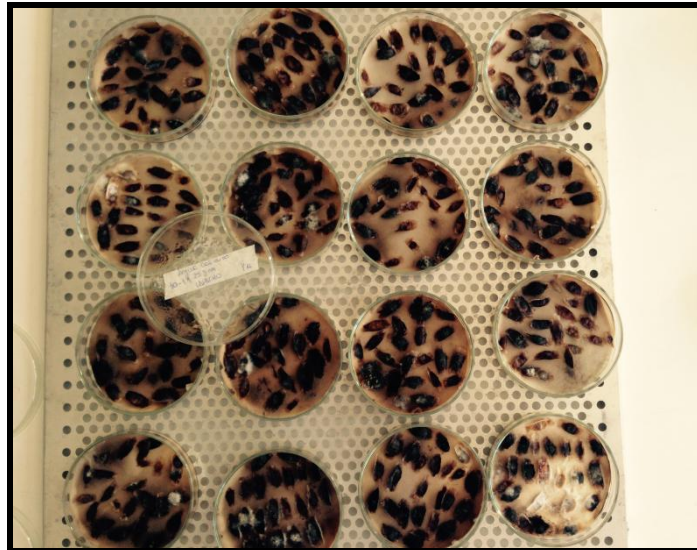


Figura 14. Conteo final en *Handroanthus heptaphyllus* .Tratamiento con agua caliente

Cuadro 9. Primer conteo *Parapiptadenia rigida*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>Total</b>
T	28	26	30	41	12	42	44	40	263
GAs	35	35	37	38	40	40	38	35	298
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	63	61	67	79	52	82	82	75	

Cuadro 10. Segundo conteo *Parapiptadenia rigida*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>Total</b>
T	0	0	0	0	6	1	1	0	8
GAs	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	8	3	1	10	2	3	4	31
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	8	3	1	16	3	4	4	

Cuadro 11. Tercer conteo *Parapiptadenia rigida*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>Total</b>
T	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAs	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 12. Valores de los parámetros de germinación en *Parapiptadenia rigida*

	<b>C1 sem.</b>	<b>C1 (%)</b>	<b>C2 sem.</b>	<b>C2 (%)</b>	<b>C3 sem.</b>	<b>C3 (%)</b>	<b>Total sem.</b>	<b>% Ger.</b>	<b>P. ger.</b>	<b>dsme (días)</b>
T	263	65,8	8	2	0	0	271	67,8	65,8	7
GAs	298	74,5	0	0	0	0	298	74,5	74,5	7
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	31	7,8	0	0	31	7,8	7,8	21
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---

(p-valor ≤ 0,0)

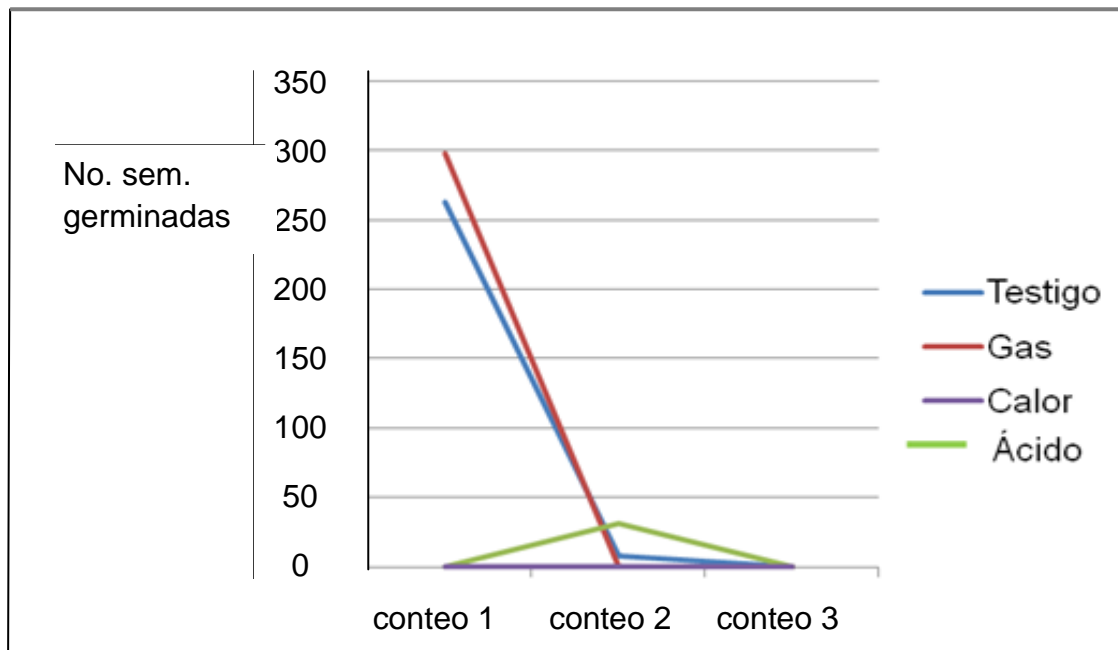


Figura 15. Porcentaje de germinación según tratamiento en *Parapiptadenia rigida*

Cuadro 13. Análisis estadístico en *Parapiptadenia rigida*

Tratamientos	Media	Error experimental
Agua caliente	0,00 <sup>a</sup>	1,99
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,29 <sup>a</sup>	1,99
Testigo	11,2 <sup>b</sup>	1,99
GAs	12,42 <sup>b</sup>	1,99

\*Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ )

#### 4.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN *Parapiptadenia rigida*

En el cuadro se observan diferencias significativas entre los tratamientos con agua caliente y ácido sulfúrico con respecto al testigo. Enfrentando los resultados del testigo con el tratamiento de giberelinas, en el cual se obtuvo el mayor valor promedio de germinación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; no siendo redituable el uso de las mismas.

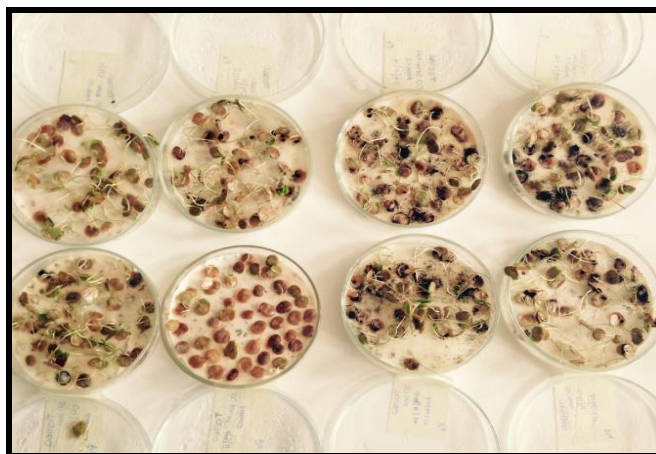


Figura 16. Porcentaje de germinación según tratamiento en *Parapiptadenia rigida*

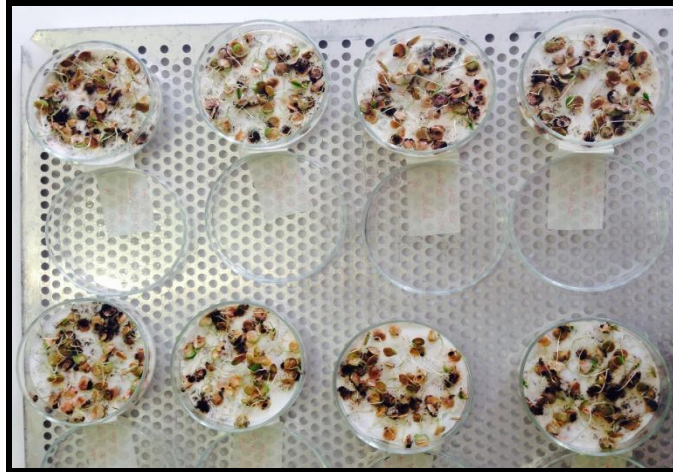


Figura 17. Conteo inicial en *Parapiptadenia rigida*. Tratamiento con giberelinas



Figura 18. Conteo inicial en *Parapiptadenia rigida*. Tratamiento con ácido sulfúrico

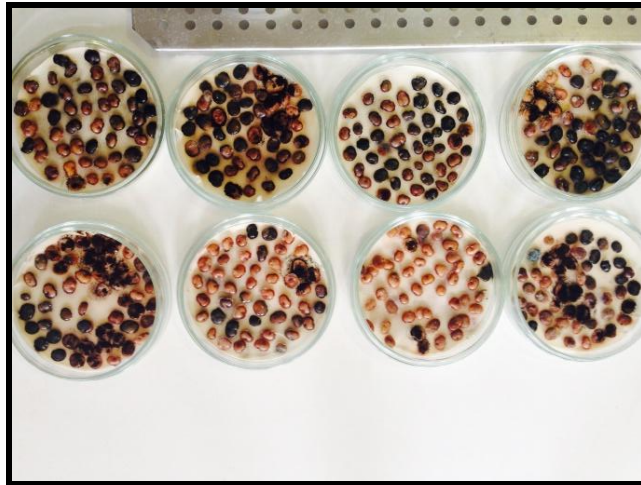


Figura 19. Conteo inicial en *Parapiptadenia rigida*. Tratamiento con agua caliente

Cuadro 14. Primer conteo *Peltophorum dubium*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Total
T	30	2	16	10	3	23	29	29	142
GAs	39	10	9	14	23	11	19	23	148
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11	26	32	33	20	21	27	27	197
A.c.	1	1	3	4	2	1	1	0	13
Total	81	39	60	61	48	56	76	79	

Cuadro 15. Segundo conteo *Peltophorum dubium*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Total
T	7	36	5	0	3	18	7	2	78
GAs	2	1	2	1	2	1	1	0	10
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	3	1	0	2	0	1	0	7
A.c.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	9	40	8	2	7	19	9	2	

Cuadro 16. Tercer conteo *Peltophorum dubium*

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>Total</b>
T	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAs	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 17. Valores de los parámetros de germinación en *Peltophorum dubium*

	<b>C1 sem.</b>	<b>C1 (%)</b>	<b>C2 sem.</b>	<b>C2 (%)</b>	<b>C3 sem.</b>	<b>C3 (%)</b>	<b>Tot. sem.</b>	<b>% Ger.</b>	<b>P. ger.</b>	<b>dsme (días)</b>
T	142	36	78	19,5	0	0	220	55	35	7
GAs	148	37	10	2,5	0	0	158	39	37	7
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	197	49	7	1,8	0	0	204	51	49	7
A.c.	13	3,3	1	0,3	0	0	14	3,5	3,3	7

(p-valor ≤ 0,05)

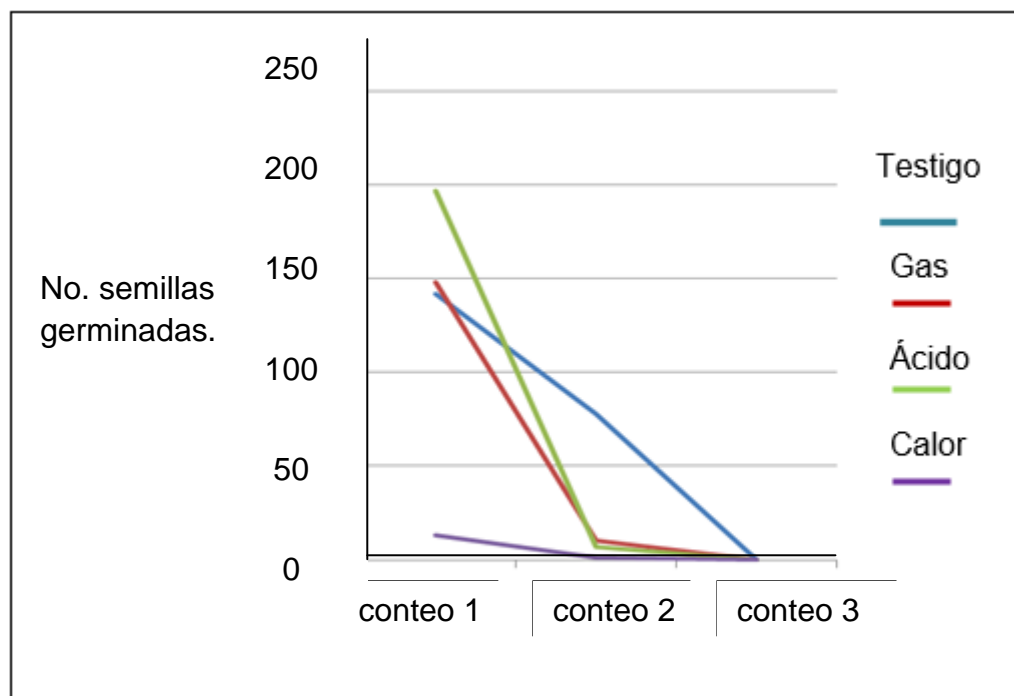


Figura 20. Porcentaje de germinación según tratamiento en *Peltophorum dubium*

Cuadro 18. Análisis estadístico en *Peltophorum dubium*

Tratamientos	Media	Error experimental
Agua caliente	0,58 <sup>a</sup>	1,53
GAs	6,58 <sup>b</sup>	1,53
Ac. sulfúrico	8,50 <sup>b</sup>	1,53
Testigo	9,17 <sup>b</sup>	1,53

\*Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ )



#### 4.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN *Peltophorum dubium*

A grandes rasgos se destaca el tratamiento con agua caliente, siendo el único que presenta diferencias significativas con respecto a los demás, en el cual el número de semillas germinadas es muy bajo.

Si bien no se observan diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con giberelinas y ácido sulfúrico, éste es el que presenta una media de germinación mayor al resto.

La escasa diferencia obtenida en los valores de germinación entre tratamientos lleva a que no sea necesario el uso de estas técnicas para aumentar el porcentaje de semillas emergidas.



Figura 21. Conteo inicial en *Peltophorum dubium*. Testigo



Figura 22. Conteo inicial en *Peltophorum dubium*. Tratamiento con giberelinas

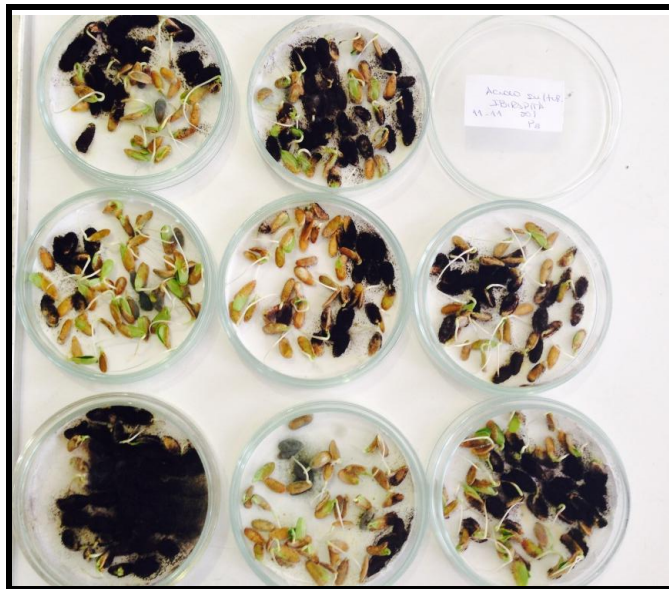


Figura 23. Conteo inicial en *Peltophorum dubium*. Tratamiento con ácido sulfúrico

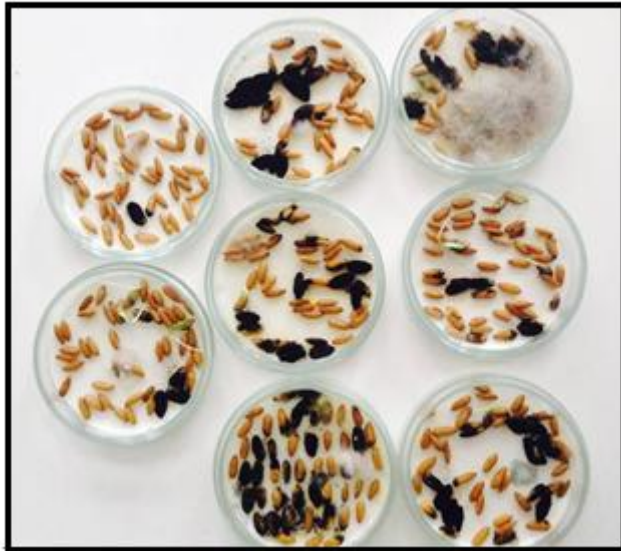


Figura 24. Conteo inicial en *Peltophorum dubium*. Tratamiento con agua caliente

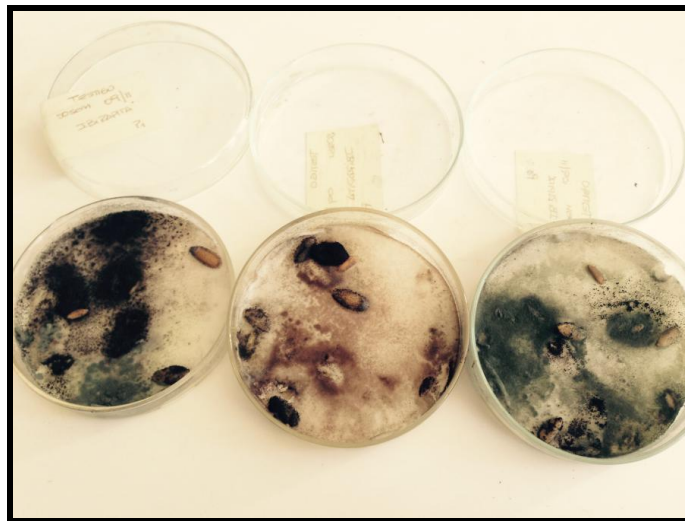


Figura 25. Conteo final en *Peltophorum dubium*. Testigo



Figura 26. Conteo final en *Peltophorum dubium*. Tratamiento con giberelinas

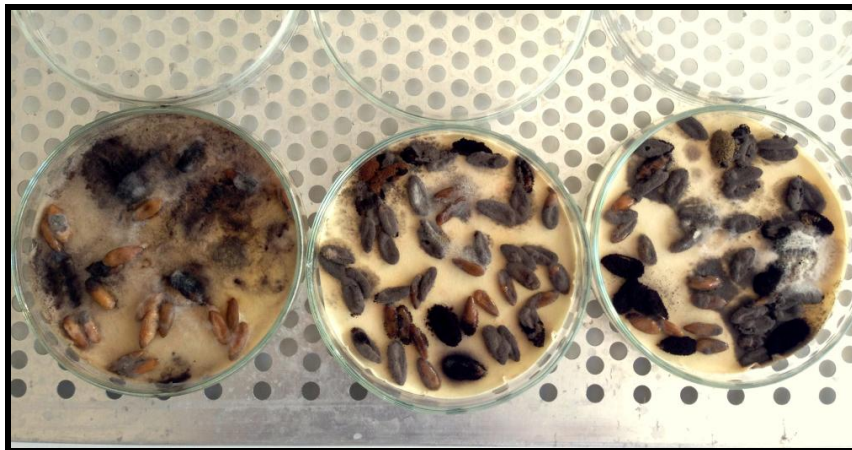


Figura 27. Conteo final en *Peltophorum dubium*. Tratamiento con agua caliente

Cuadro 19. Primer conteo *Vachellia cavendishii*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Total
T	4	4	7	7	5	1	7	7	42
GAs	1	7	7	6	1	4	2	3	31
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	31	6	11	26	11	15	35	3	138
A.c.	6	11	10	9	5	8	9	10	68
Total	42	27	35	49	22	28	53	23	

Cuadro 20. Segundo conteo *Vachellia cavendishii*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Total
T	0	0	0	1	0	0	0	1	2
GAs	0	0	1	0	0	0	1	0	2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	1	2	0	1	0	2	1	0	7
Total	1	2	1	2	0	2	2	1	

Cuadro 21. Tercer conteo *Vachellia cavendishii*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Total
T	0	0	0	1	0	1	1	0	3
GAs	3	0	0	0	0	0	1	0	4
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.c.	1	0	0	1	1	0	0	0	3
Total	4	0	0	2	1	1	2	0	

Cuadro 22. Valores de los parámetros de germinación en *Vachellia cavendishii*

	C1 sem.	C1 (%)	C2 sem.	C2 (%)	C3 sem.	C3 (%)	Total sem.	% Ger.	P. ger.	dsme (días)
T	42	10,5	2	0,5	3	0,8	47	11,8	10,5	7
GAs	31	7,8	2	0,5	4	1	37	9,3	7,8	7
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	138	34,5	0	0	0	0	138	34,5	34,5	7
A.c.	68	17	7	1,8	3	0,8	78	19,5	17	7

(p-valor ≤ 0,05)

Cuadro 23. Análisis estadístico en *Vachellia caven*

Tratamientos	Media	Error Experimental
GAs	1,54 <sup>a</sup>	0,91
Testigo	1,96 <sup>a</sup>	0,91
Agua caliente	3,25 <sup>ab</sup>	0,91
Ac. sulfúrico	5,75 <sup>b</sup>	0,91

\*Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas (p-valor ≤ 0,05)

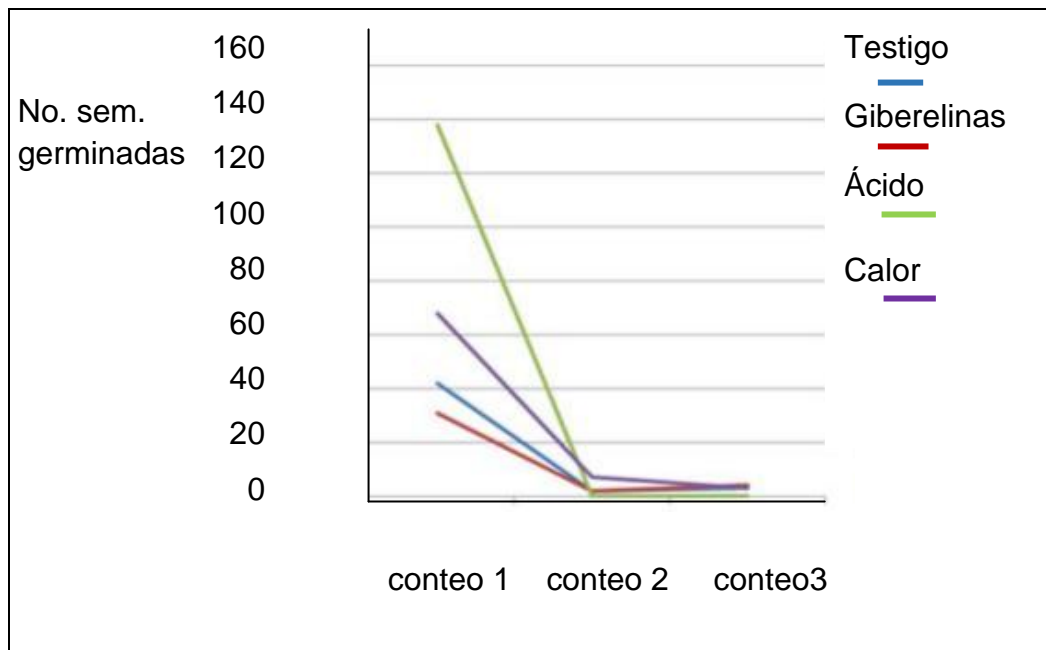


Figura 28. Porcentaje de germinación según tratamiento en *Vachellia caven*

#### 4.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN *Vachellia caven*

En esta situación se destaca el uso del ácido sulfúrico en el cual se obtuvo un valor de media que supera al resto de los tratamientos, la cual presenta una diferencia significativa con respecto al uso de giberelinas y al testigo, no así con el tratamiento de agua caliente.



Este es el único caso en el cual se justifica el uso del ácido sulfúrico con el fin de aumentar el porcentaje de germinación, respaldado por dichos resultados.

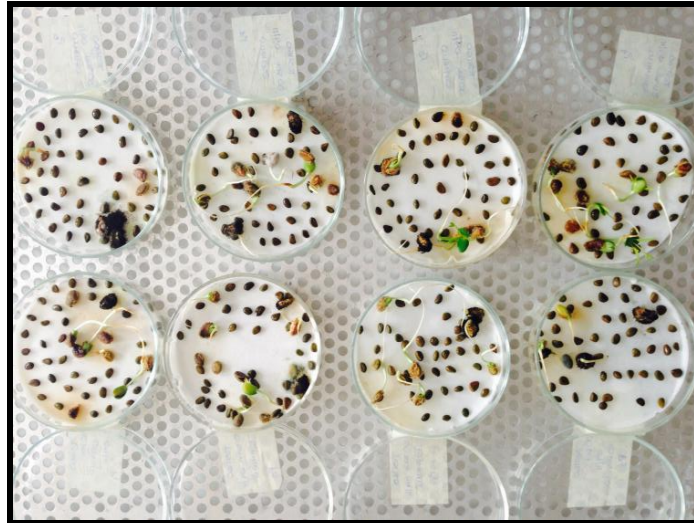


Figura 29. Conteo inicial en *Vachellia caven*. Testigo

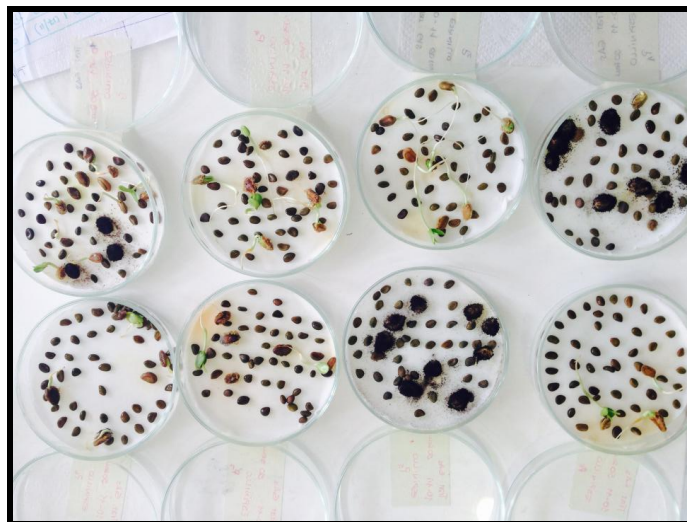


Figura 30. Conteo inicial en *Vachellia caven*. Tratamiento con giberelinas

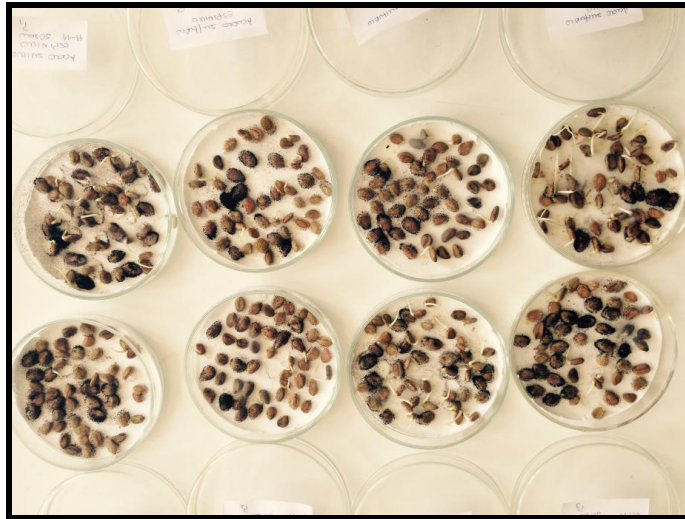


Figura 31. Conteo inicial en *Vachellia caven*. Tratamiento con ácido sulfúrico

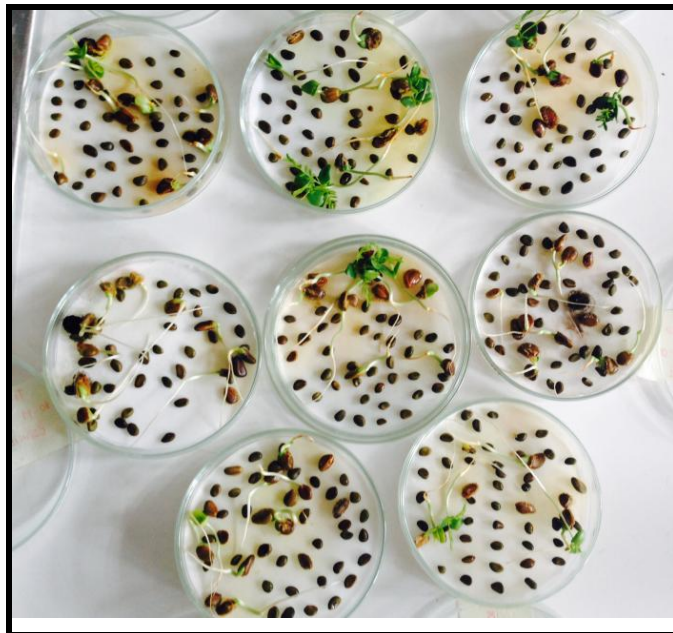


Figura 32. Conteo inicial en *Vachellia caven*. Tratamiento con agua caliente



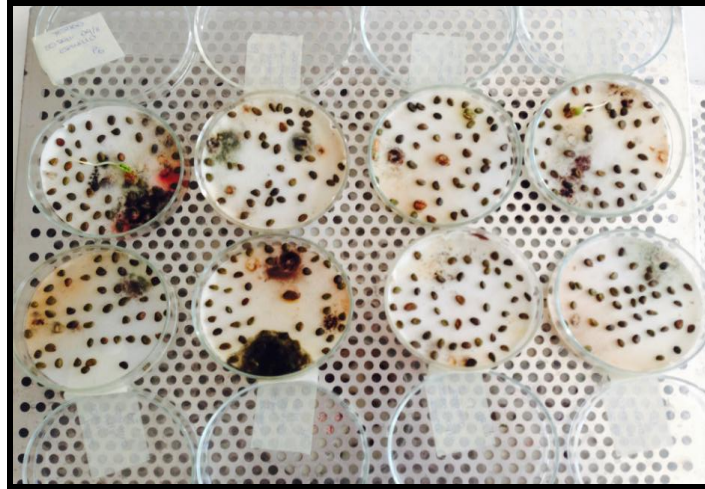


Figura 33. Conteo final de *Vachellia caven*. Testigo

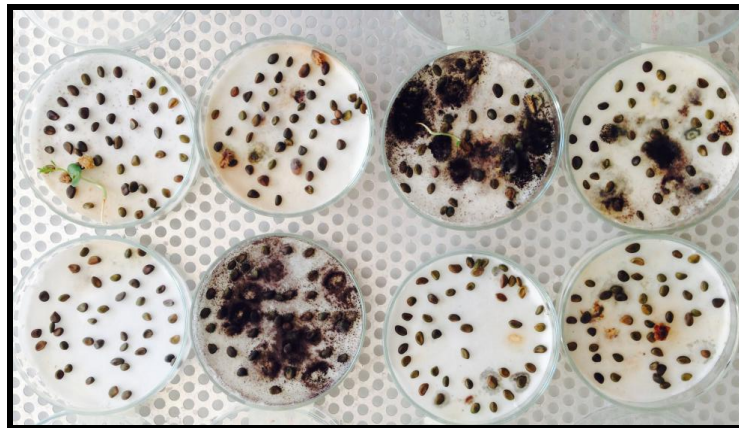


Figura 34. Conteo final en *Vachellia caven*. Tratamiento con giberelinas

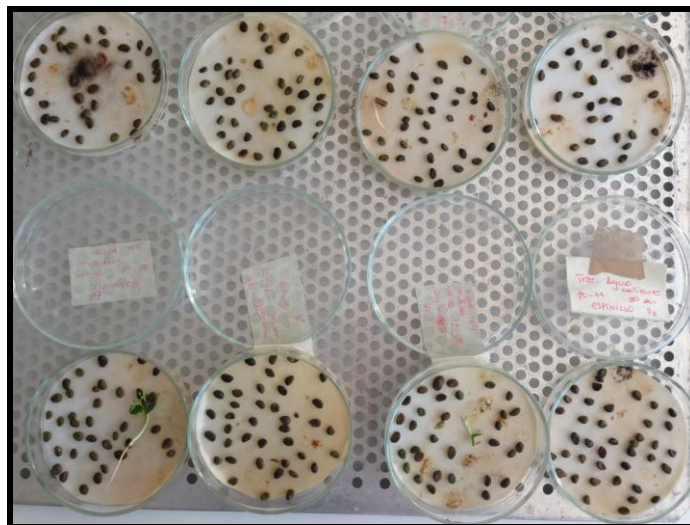


Figura 35. Conteo final en *Vachellia caven*. Tratamiento con agua caliente

#### 4.5 PRUEBA DE VIABILIDAD MEDIANTE EL USO DE TETRAZOLIO

Una semilla que es capaz de germinar y producir una plántula normal, es viable. Esto se puede detectar a través de la prueba con tetrazolio, en la cual se observa el grado de viabilidad de la semilla dependiendo de su actividad metabólica. En las semillas de *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium* y *Vachellia caven* se pudo observar una tinción total del embrión y otros tejidos de importancia, en estos casos las moléculas de tetrazolio reaccionaron con los átomos de hidrógeno en los tejidos de las semillas, determinando el color rojo característico del test.

En cambio, el resultado obtenido en *Handroanthus heptaphyllus* fue una coloración oscura, atípica en dicho test. Una de las causas posibles pudo deberse a daños mecánicos en la semilla y otra de ellas al uso de una concentración inadecuada de producto. La técnica debería repetirse para corroborar dichos resultados, no siendo posible a causa de la escasa disponibilidad de semilla del lote utilizado, ni a la utilización de otro lote de semilla para dicho test debido a que no es representativo.

En las imágenes que se presentan a continuación se aprecia las tinciones correspondientes a cada especie.



Figura 36. Test de tetrazolio en *Handroanthus heptaphyllus*



Figura 37. Test de tetrazolio en *Parapiptadenia rigida*





Figura 38. Test de tetrazolio en *Peltophorum dubium*



Figura 39. Test de tetrazolio en *Vachellia caven*

## 5. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del presente trabajo, se observó que más allá de los tratamientos y de la forma de aplicación de éstos, se debe tener en cuenta la calidad de la semilla, cuya carencia se manifiesta en fallas en la germinación y posteriores defectos en las plántulas. Sin esta precaución, cualquier investigación que se inicie estará condicionada en sus resultados.

Muchas semillas que demostraron ser viables, no alcanzaron luego a germinar a causa del ataque de patógenos. Esto indicaría una posible transmisión de los mismos a través de la semilla. Los patógenos encontrados pueden relacionarse a un almacenamiento inadecuado, encontrándose: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Fusarium sp.*; así como también a condiciones inadecuadas en la cosecha, limpieza y posterior secado de la semilla (fundamentalmente ésta última).

La causa más probable de la permanencia de patógenos podría ser el almacenamiento de la semilla con un porcentaje de humedad elevado, otra de ellas, el momento de cosecha, relacionado al estado de madurez de la semilla (si ésta se recoge verde o madura).

Cabe mencionar que en la semilla existen patógenos que están y permanecerán independientemente de haber hecho correctamente las prácticas anteriores, en este caso se debería realizar una cura con fungicida.

Otro punto a resaltar es el mayor control en la humedad de la semilla cuando se almacena y durante el proceso de secado, realizado mediante el uso de un analizador de humedad.

También debe destacarse que, si mediante los resultados del test de tetrazolio se obtuvo una buena tinción, no existiría un problema de viabilidad de la semilla sino de levantar las limitantes de germinación (o tal vez problemas en el embrión para desarrollarse).

Respecto a los tratamientos, se concluye que a pesar de que no existen marcas de referencia para determinar cuáles son los valores de germinación promedio para las especies utilizadas, se observó que aquellos que demostraron ser superiores pueden presentar contratiempos a la hora de aplicarlos, fundamentalmente en el caso del ácido sulfúrico en donde se deben tener en cuenta medidas preventivas para su utilización.

Cabe resaltar que tanto la germinación como la cantidad de semilla que producen esas plantas es muy cambiante año a año y dependen en gran medida de las condiciones climáticas en las que se desarrolle la misma; por lo que sería recomendable comparar lotes de diferentes años para observar diferencias, haciéndose más notorio en años con efectos de cambio climático como han sido estos últimos.

Por ello, en términos generales en este trabajo, no se puede recomendar el mejor tratamiento para cada especie, sino que se debería realizar un mayor número de repeticiones por tratamiento, contando para ello con un mayor número de semillas, tomando en cuenta diferentes años de colecta, diferentes individuos y zonas de dispersión natural.

Interesa destacar la escasez y en algunos casos la inexistencia de material bibliográfico en especies nativas, para la realización del presente trabajo.

Es de suma importancia continuar estudiando el comportamiento y evolución de las semillas que fueron sometidas a los diferentes tratamientos, así como también de las especies nativas en general.

## 6. RESUMEN

El presente trabajo consistió en la realización de un estudio preliminar para orientar posibles pautas para tratar la germinación en las siguientes especies nativas: *Handroanthus heptaphyllus*, *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium* y *Vachellia caven*, a través de ensayos de laboratorio, donde se realizaron diferentes tratamientos, pretendiendo definir alguno recomendable para acelerar y homogeneizar la germinación de las especies, comparando los resultados obtenidos con un testigo. Solamente en una especie se comprobó que es necesario realizar uno de los tratamientos ensayados, diferenciándose significativamente del resto; en cambio para las otras sería necesario ensayar con nuevos tratamientos. Los ensayos realizados se pueden evaluar agrupando los tratamientos en aquellos que provocan cambios fisiológicos, como las hormonas y aquellos que modifican las cubiertas seminales, efecto causado por el ácido sulfúrico y agua caliente. Las alternativas aplicadas fueron las siguientes: inmersión en ácido sulfúrico con 98% de concentración por tiempo variable según la especie; giberelinas, 500 mg/litro; inmersión en agua caliente y testigo.

Palabras clave: Germinación; Especies nativas; Ensayos de laboratorio; Tratamientos; Especies forestales.

## 7. SUMMARY

The present work considers the accomplishment of a preliminary study to orient possible guidelines to treat germination in the following native species: *Handroanthus heptaphyllus*, *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium* and *Vachellia caven*, through laboratory tests, where different treatments were performed, trying to define some recommendations to accelerate and homogenize the germination of the species, comparing the results obtained with a control. Only for one species was it verified that it is necessary to perform one of the treatments tested, differed significantly from the rest; but for the others it would be necessary to try with some other treatments based in specific character of each species. The tests can be evaluated by grouping the treatments into those that cause physiological changes, such as hormones and those that modify the seminal covers, effect caused by sulfuric acid and hot water. The alternatives applied were as follows: sulfuric acid immersion with 98% concentration for a variable time according to the species; gibberellins, 500 mg / liter; immersion in hot water and witness.

Keywords: Germination; Native species; Laboratory tests; Treatments; Forest specie



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ardanaz, C.; Borrajo, C. 1995. Secado de semillas forrajeras con sílica gel; ajuste metodológico. In: Congreso Latinoamericano de Botánica (6º., 1994, Mar del Plata). Sesiones técnicas. Mar del Plata, Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. p.irr.
2. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. (en línea). Madrid, Mc Graw-Hill Interamericana. 669 p. Consultado may. 2017. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf> .
3. Biasutti Owen, E. 1956. The storage of seeds for maintenance of viability. CAB Bulletin no. 43. 81 p.
4. Brussa, C.; Grela, I. 2007. Flora arbórea del Uruguay con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Montevideo, Mosca. 544 p.
5. De la Cuadra, C. 1992. Germinación, latencia y dormición de las semillas; dormición en las avenas locas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras no. 3/92. 24 p.
6. Ellis, R. 1984. Revised table of seed storage characteristics. Noticiario. 58: 16 – 18.
7. \_\_\_\_\_.; Hong, T.; Roberts, E. 1985. Handbook of seeds technology for genebanks. Roma, International Board for Plant Genetic Resources. 210 p.
8. Ford – Lloyd, B.; Jackson, M. 1986. Plant genetic resources; an introduction to their conservation and use. Baltimore, Arnold. 146 p.
9. Frankel, O.; Bennet, E. 1970. Genetic resources in plants; their exploration and conservation. Oxford, Blackwell. 554 p.
10. Giacometti, D. 1987. Conservación de recursos fitogenéticos. In: Simposio Recursos Fitogenéticos (1984, Valdivia). Anales. Santiago, Chile, Universidad de Chile. pp. 167-173.
11. Gil, M. J.; Lago, M. 1996. Optimización de métodos de conservación de semillas de especies nativas; *Bromus auleticus*, *Adesmia bicolor*,

*Desmodium incanum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay.  
Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 73 p.

12. Grabe, F. 1976. Manual do teste de tetrazolio en sementes. Brasília, D.F. s.e. 85 p.
13. Grela, I.; Rabaiotti, E.; Bayce, D. 1992. Levantamiento de la dormancia en semillas de leguminosas. In: Jornadas Técnicas (5as., 1992, Montevideo). Memorias. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 33-34.
14. Hanson, J. 1985. Procedures for handling seeds in genebanks. Roma, IBPGR. 115 p. (Practical Manuals for Genebanks no.1).
15. IBPGR (International Board for Plants Genetic Resources, IT) 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Compendium of specific germination information and test recommendations. Roma. 715 p.
16. INASE (Instituto Nacional de Semillas, UY). 2009. Manual de semillas del Uruguay. Canelones. s.p.
17. ISTA (International Seed Testing Association, UK). 2015. International rules for seeds testing; seed science and technology. Cambridge. 296 p.
18. Jolochin, G.; Speroni, G. 2007. Árboles y arbustos del Parque de la Facultad de Agronomía; nueva guía docente. Montevideo, Facultad de Agronomía. 320 p.
19. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, BR). 2009. Regras para análise de sementes. Brasília. 399 p.
20. MAPAMA (Ministerio de Agricultura Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, ES). 1941. Reglas internacionales de análisis de semillas. Madrid. 60 p.
21. Pacheco, E.; Rodríguez, L. 1993. Especies arbóreas nativas; ensayos de germinación y relevamiento de información. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 156 p.
22. Pérez, F.; Pita, J. 1998. Germinación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras no. 20/90. 20 p.

23. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1999. Dormición de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras no. 21/03. 20 p.
24. Popinigis, F. 1985. Fisiologia da semente. 2a. ed. Brasilia, D. F., s.e. 289 p.
25. Querol, D. 1988. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado; aproximación técnica y socioeconómica. Lima, Perú, Industrial Gráfica. 218 p.
26. Romero, G.; Gallo, L. 2007. Análisis de semillas forestales. Montevideo, Facultad de Agronomía. 27 p.
27. Serrada, R. 2000. Apuntes de repoblaciones forestales. (en línea). Madrid, FUCOVASA. 6 p. Consultado may. 2017. Disponible en <http://files.grlesalzines3.webnode.es/200000033-a3e63a4f4e/Reforestaci%C3%B3.pdf> .
28. SPF (Sociedad de Productores Forestales del Uruguay, UY). s.f. Bosques nativos. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado may. 2017. Disponible en <http://www.spf.com.uy/uruguay-forestal-bosques-nativos>.