

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

PREDICCIÓN DEL POTENCIAL DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE  
CEBADA MEDIANTE LAS METODOLOGÍAS: CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA  
INDIVIDUAL, ENVEJECIMIENTO ACELERADO Y TETRAZOLIO

por

Inés ESPASANDÍN BARTESAGHI

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2010

Tesis aprobada por:

Director:

---

Ing. Agr. (M.Sc.) Carlos Rossi

---

Ing. Agr. Silvana González

---

Ing. Agr. (M.Sc.) Rafael Vidal

---

Ing. Agr. (Ph.D.) Lucía Gutiérrez

Fecha: 29 de noviembre de 2010

Autor:

---

Inés Espasandín Bartesaghi

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, amistades, compañeros y profesores que me siguieron y ayudaron en esta carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 LA PRODUCCIÓN DE CEBADA Y MALTA EN URUGUAY.....	3
2.2 USO DE LA CEBADA CERVECERA.....	4
2.3 LA SEMILLA.....	4
2.3.1 <u>Dormición</u> .....	5
2.3.2 <u>Sensibilidad al agua</u> .....	6
2.4 GERMINACIÓN Y SU ANÁLISIS EN LABORATORIO.....	7
2.5 VIGOR.....	9
2.5.1 <u>Pruebas de vigor</u> .....	11
2.5.1.1 Test de envejecimiento acelerado.....	12
2.5.1.2 Test de conductividad eléctrica.....	13
2.5.1.3 Prueba topográfica de tetrazolio.....	17
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	19
3.1 UBICACIÓN.....	19
3.2 DESCRIPCIÓN Y CALIBRACIÓN DEL CONDUCTÍMETRO.....	19
3.2.1 <u>Analizador automático de semillas, SAD-9000-S</u> .....	19
3.2.2 <u>Calibración</u> .....	19
3.2.2.1 Determinación del periodo de lixiviación.....	20
3.2.2.2 Determinación de valores de corte para poder germinativo en cebada cervecera.....	20
3.3 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE ALMACENAMIENTO MEDIANTE TRES MÉTODOS DE VIGOR.....	22
3.3.1 <u>Envejecimiento acelerado</u> .....	23
3.3.2 <u>Prueba topográfica por tetrazolio</u> .....	24
3.3.3 <u>Test de vigor mediante conductividad eléctrica</u> .....	25
3.3.4 <u>Análisis de datos</u> .....	26
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	27
4.1 PODER GERMINATIVO INICIAL DE LOS LOTES.....	27
4.2 EVALUACIÓN POR MÉTODOS DE VIGOR.....	28
4.2.1 <u>Prueba topográfica por tetrazolio</u> .....	28

4.2.2 <u>Envejecimiento acelerado</u> .....	29
4.2.3 <u>Conductividad eléctrica individual</u> .....	31
4.2.3.1 Determinación del periodo de lixiviación.....	31
4.2.3.2 Determinación de los valores de corte para poder germinativo.....	33
4.3 CAPACIDAD DE PREDECIR LA EVOLUCIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE VIGOR...	34
4.3.1. <u>Tetrazolio</u> .....	36
4.3.2. <u>Tetrazolio máximo vigor (Tmaxvigor)</u> .....	36
4.3.3. <u>Conductividad eléctrica</u> .....	37
4.3.4. <u>Envejecimiento acelerado evaluado en rollo</u> .....	38
4.3.5. <u>Envejecimiento acelerado evaluado en placas de Petri</u> .....	38
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	41
6. <u>RESUMEN</u> .....	42
7. <u>SUMMARY</u> .....	43
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	44
9. <u>ANEXOS</u> .....	48

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Características de las muestras utilizadas para determinar el valor de corte de conductividad para poder germinativo (%PGerm).....	21
2. Características de las muestras de semillas utilizadas.....	22
3. Porcentaje de germinación inicial de los lotes evaluados.....	27
4. Porcentaje de vigor del análisis topográfico por Tetrazolio.....	28
5. Porcentaje de vigor obtenido en el Envejecimiento Acelerado evaluado en rollo y en placas de Petri (P Petri).....	30
6. Valores de conductividad eléctrica promedio (CE) de dos repeticiones y sus desvíos estándar medidos cada 2 horas para el lote con 70% de germinación.....	31
7. Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) promedio para cada lote.....	33
8. Resultados de la germinación inicial y posteriores al envejecimiento y estrés (PG final) en rollo y placa de Petri.....	35
9. Ajuste del método Tetrazolio a las diferentes evaluaciones de germinación final.....	36
10. Ajuste del método Tmaxvigor a las diferentes evaluaciones de germinación final.....	37
11. Ajuste del método conductividad eléctrica a las diferentes evaluaciones de germinación final.....	37
12. Ajuste del método envejecimiento acelerado en rollo a las diferentes evaluaciones de germinación final.....	38
13. Ajuste del método envejecimiento acelerado en placa de Petri a las diferentes evaluaciones de germinación final.....	39

Foto No.

1. Distribución de las semillas en placas de Petri.....	24
---	----

Gráfico No.

1. Producción de la Cebada cervecera en Uruguay desde el año 2000.....	3
2. Tetrazolio en función de la germinación inicial evaluada en rollo.....	29
3. Conductividad eléctrica promedio de dos repeticiones y su desvío estándar en función del tiempo para un lote con 98% de germinación.....	32
4. Porcentaje de germinación en función del valor de corte.....	34
5. Porcentaje de germinación final en rollo en función de los métodos de vigor	39

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de Cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.) en Uruguay se destina casi en su totalidad al proceso de malteo, a través del cual se obtiene la malta para la posterior elaboración de cerveza, Abeledo (2006). Por esta razón la industria exige cierta calidad en el grano, siendo el rechazo destinado a la producción de raciones animales.

En comparación con otros cultivos cerealeros sembrados en Uruguay (trigo, maíz, sorgo y arroz), en la zafra 2007/2008 la cebada se posicionó en el tercer lugar en cuanto al área sembrada y producción, luego del trigo y el arroz. En esa zafra, se sembraron 138.200 hectáreas obteniéndose una producción de 310.200 toneladas con destino al malteo. En la zafra 2008/2009, aunque el área se redujo un 6% la producción aumentó casi el 26%, (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2009). La industria en Uruguay tiene una capacidad instalada para maltrear 290.000 toneladas anuales. El grupo AmBev (MUSA y Cympay) posee el 80% de esta capacidad y MOSA el 20%, el grano que excede esta capacidad se destina a la exportación al cual se denomina “cebada cruda”.

La rápida capacidad de iniciar la germinación de las semillas de cebada es clave para comenzar el malteo ya que el resultado de este proceso, la malta, es la semilla germinada. En el proceso de malteo, la semilla es sometida a periodos de remojo y aireado. Esta semilla, en contacto con el agua puede no germinar como consecuencia de la dormancia que presenta al cosecharse y que se puede extender por un periodo de 30 a 90 días (post-maduración) para alcanzar su máximo poder y vigor germinativo, Arias (1991).

Por otro lado, la velocidad con que se da el proceso germinativo es un índice de vigor de las semillas. Pero a los efectos de la industria solo importa que el almidón contenido en el endosperma se convierta en moléculas más simples, en el menor tiempo. Esto ocurre como resultado de la actividad hormonal y enzimática de la semilla que se inicia cuando ésta se somete a condiciones adecuadas de humedad y temperatura para comenzar la germinación, siempre que ésta no se encuentre en estado de dormición.

El vigor es influenciado por factores bióticos y abióticos durante el desarrollo del cultivo de la planta madre y por las condiciones de almacenamiento del grano o semilla. Si estas condiciones no son ideales (elevada temperatura y humedad relativa) es esperable que se expresen diferencias entre lotes de alto y bajo vigor.



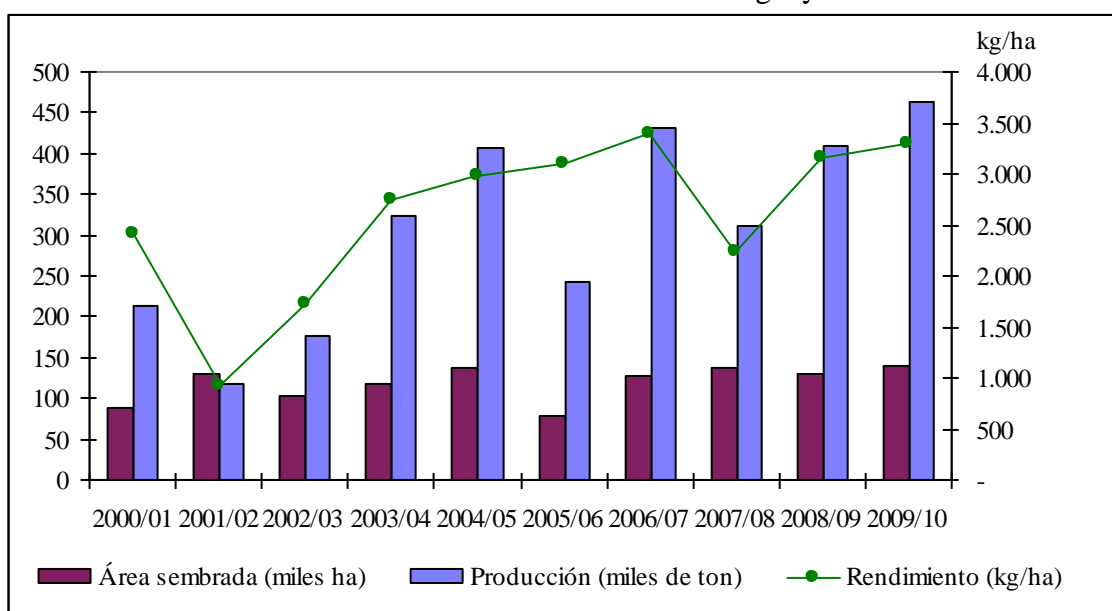
Este trabajo pretende evaluar y comparar tres métodos de vigor descritos por la International Seed Testing Association (ISTA): envejecimiento acelerado, conductividad eléctrica individual y prueba topográfica por tetrazolio, a fin de poder diferenciar lotes en base a su vigor y de este modo predecir la evolución de la capacidad germinativa de los lotes durante el almacenamiento. De esta manera se contribuirá en la definición del método más adecuado a utilizar por parte de los laboratorios de análisis de las industrias malteras de Uruguay a la hora de definir el orden de malteo de los lotes.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LA PRODUCCIÓN DE CEBADA Y MALTA EN URUGUAY

En el período 2000 al 2007 se ha dado una evolución ascendente del volumen de las exportaciones de cebada cervecera malteada, registrándose un incremento al 2007 de un 49%. El mismo comportamiento se obtuvo en términos económicos significando un aumento del 98%, URUGUAY. MGAP. DIEA (2008).

Gráfico 1. Producción de la Cebada cervecera en Uruguay desde el año 2000.



Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2008, 2010)

Aunque Uruguay no es un país importante como productor de cereales en América, en la actualidad es el principal exportador de malta de cebada de América del Sur. El cultivo de cebada, que ocupa el tercer lugar entre los granos cultivados en Uruguay, se destina en casi su totalidad a la producción de malta para la fabricación de cerveza. Entre el 90-95% de la malta de cebada producida en Uruguay se exporta, principalmente a Brasil, Abeledo (2006).

Los valores de los parámetros que definen la calidad de la cebada malteada dependen de factores genéticos de la cebada utilizada, del manejo agrícola empleado para su

cultivo, de factores ambientales y de las condiciones del malteado. Para mantener su competitividad, las malterías deben influir en todos los aspectos del proceso de producción, desde la selección de los cultivares y las técnicas del cultivo hasta el ajuste de las condiciones de malteado a las características de cada lote de cebada que procesan.

La comercialización de la cebada en Uruguay se da bajo la modalidad de contrato entre el agricultor y la industria. A través del mismo, la industria brinda asistencia técnica, provee de semillas elegidas de acuerdo con el tipo de malta a producir y se comprometen en la compra de su producción. Existe así una integración vertical del complejo agroindustrial cebada-malta que facilita una gestión integral de la calidad del producto y la programación de las campañas agrícolas en función de las demandas estimadas, Abeledo (2006).

## 2.2 USO DE LA CEBADA CERVECERA

El grano de cebada con destino a malteo es el único cereal que debe mantener la capacidad de germinar debido al proceso industrial al cual se destina. Esto tiene efectos directos sobre la elección de cultivares, aspectos de manejo a nivel de chacra y cuidados del grano post-cosecha, además de los parámetros de calidad exigidas por la industria e importadores de malta.

El proceso de “malteo” consiste en inducir la germinación mediante una serie de periodos de remojo en agua intercalados con periodos de aireación, proceso que se detiene finalmente mediante un secado del grano. En el remojo, la humedad y respiración de la semilla aumentan, pudiéndose generar una condición de hipoxia, para evitarlo se pasa por una fase de aireado y se vuelve a remojar. De este modo se da la conversión enzimática de los almidones que componen el endosperma en azúcares fermentables, principalmente maltosa. Luego de esta etapa, cuando la mayor parte del almidón ha sido convertido en azúcares, se la somete a un secado o tostado para interrumpir la germinación y secar los granos. Todo el proceso de malteo se realiza bajo condiciones controladas que influirán sobre las propiedades de la malta.

## 2.3 LA SEMILLA

Una semilla por definición botánica, es el resultado de la fertilización y maduración de un óvulo. Consta de un embrión, a partir del cual se desarrolla la plántula durante la

germinación, de un tejido nutritivo (endosperma en el caso de las gramíneas) y de una cubierta protectora, la testa, que recubre a ambos, Bekendam y Grob (1980).

Según Della Mea (1991), se puede resumir los distintos eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla en: diferenciación de los tejidos (una célula sufre sucesivas divisiones mitóticas y forma el embrión), expansión de las células y deposición de las reservas, y por último la preparación del embrión para la dormición por la reducción del proceso metabólico y contenido de agua.

El fruto en gramíneas se denomina cariopse. En cebada el grano cosechado, es un cariopse vestido por el antecio (conjunto de lemma y pálea), en cuyo surco ventral conserva la prolongación de la raquilla. La base de la lemma está más o menos fracturada o conserva restos de las glumas y raquilla, mientras que en el ápice pierde la arista, Rosengurtt et al. (1997).

### 2.3.1 Dormición

El estado de dormición, en el grano de cebada, es un bloqueo interno propio de la semilla que le impide germinar temporalmente aunque esté ante condiciones adecuadas de temperatura, luz y agua. Es una característica heredable pero con fuerte interacción con el medio ambiente. Se llama dormición primaria cuando es inducida en la planta madre y secundaria cuando ocurre luego de la dispersión de la semilla, Kermode (2005). Hay varios mecanismos que actúan en la dormición. Para cebada y otros cereales, el mecanismo que principalmente se presenta es el impuesto por las cubiertas, es decir los tejidos que rodean el embrión (testa, lemma y pálea) que pueden llegar a restringir la entrada de oxígeno, impidiendo la remoción de inhibidores como el ácido abscísico (ABA) y disminuyendo la germinación, Benech-Arnold et al. (2006).

El control de la germinación de semillas en las plantas superiores, involucran regulaciones a nivel transcripcional de genes que responden principalmente a la acción de dos fitohormonas: ABA y giberelinas (GA). El ABA cumple una función importante en mantener el estado de dormición de la semilla, inhibiendo la transición de crecimiento embrionario a germinativo, mientras que la GA promueve la germinación y la movilización de reservas durante ésta. El ABA es fundamental durante la maduración de la semilla ya que promueve la acumulación de reservas y la adquisición de tolerancia a la desecación durante los estadios tardíos del desarrollo de la semilla, Casaretto (2004).

La predisposición a pre-germinar de los granos en la espiga es influenciada por el genotipo (resistente o susceptible) y en determinadas condiciones ambientales durante el desarrollo de la semilla (principalmente temperatura) determinan la expresión de la dormición, González et al. (2008).

Bewley, citado por González et al. (2008) describe que tanto el trigo como la cebada, presentan un menor grado de dormición cuando el desarrollo de las semillas ocurre a altas temperaturas (20-28°C) en relación a relativas bajas temperaturas (10-20°C). Esto, sumado a cortas exposiciones (24 hs) a lluvias pueden causar pregerminación o germinación precosecha.

Según Arias (1991), en nuestro país la dormancia en cebada puede ser mas profunda si durante el cultivo se dan condiciones de estrés hídrico al inicio del llenado del grano del cultivo. Luego de la cosecha, esta dormancia puede continuar en el almacenamiento durante 30 a 90 días.

### 2.3.2 Sensibilidad al agua

La sensibilidad al agua es el comportamiento que algunos lotes de cebada muestran al entrar en contacto con un exceso de agua. Se manifiesta a través de una germinación lenta y desaparece cuando se colocan las semillas frente a esta situación, provocando problemas durante el proceso de malteado. Se relaciona con las condiciones ambientales durante la maduración de la semilla y en menor medida con el genotipo, también la presencia de microorganismos desempeña un papel importante; y se encuentra en estrecha relación con el fenómeno de dormición (Reiner, citado por Arias, 1991).

La disminución de la germinación en condiciones de exceso de agua en donde los granos son cubiertos por un film de humedad que limita la respiración es provocada por un enlentecimiento de la metabolización del ABA (inhibidor de la germinación) a través del embrión (Vissers et al. 1996, Narimanov y Korystov 1998, Benech-Arnold et al. 2006). En ese sentido la hipoxia interfiere con el catabolismo del ABA a través de la regulación de la actividad de la enzima ABA 89-hydroxylase (Krochko et al., citados por Benech-Arnold et al., 2006). Si esto fuera así se estaría frente a un caso de dormición relativa, donde la dormición se expresa a determinados contenidos de agua en el medio de incubación.

La sensibilidad al agua puede ser estimada en el laboratorio a través del Test de Pollock. Este método mide la diferencia entre el porcentaje de germinación entre semillas en condiciones estándar y en condiciones de exceso de agua. Para esto se colocan las muestras en placas de Petri de 90 mm de diámetro con 4 ml de agua semejando la condición estándar y 8 ml para la condición de exceso de agua, como puede ocurrir durante la fase de remojo en el malteo.

Se dice que un lote tiene alta sensibilidad al agua cuando su energía germinativa en condiciones de exceso de humedad es sustancialmente menor a su energía germinativa en condiciones adecuadas de humedad. Esta característica se manifestó en la práctica de las malterías al constatarse que algunos lotes de cebada tenían una germinación muy lenta y menor que la obtenida en los ensayos de germinación, Arias (1991).

En 1967, Pollock, citado por Arias (1991), propuso la siguiente clasificación para determinar la sensibilidad al agua.

<b>Categoría</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Muy poco sensible	Menos de 10
Poco sensible	10 a 25
Sensible	26 a 40
Muy sensible	Más de 45

Por la tabla anterior, se puede interpretar el comportamiento de un lote ante el malteo. Cuando la diferencia es menor a 10 %, el lote es apto para el malteo, en cambio una alta sensibilidad (más de 45% de diferencia) inhabilita ese lote para el proceso de malteo ya que una alta proporción de sus semillas no iniciarán el proceso germinativo y darán un inadecuado resultado de la malta.

## 2.4 GERMINACIÓN Y SU ANÁLISIS EN LABORATORIO

El poder germinativo es una característica indispensable en una cebada cervecera, ya que lo ideal es que todos los granos germinen en el malteo. Los que no germinan no contribuyen en la producción de malta y afectan la calidad final de la misma, Arias (1991).

La germinación, se define como la reanudación de las actividades de crecimiento del embrión, suspendidas o disminuidas al momento de alcanzar la semilla su madurez

fisiológica. Esta reanudación implica el establecimiento de un estado metabólicamente activo que se manifiesta fisiológicamente con división celular y diferenciación, y morfológicamente con la transformación de un embrión en una plántula, Peretti (1994).

El objetivo del análisis de germinación es determinar la germinación potencial de un lote de semillas, ISTA (2008). Esta prueba de germinación tiene aceptación en todo el mundo como índice de la capacidad de la semilla de generar una plántula, y como factor de calidad de la misma, Correa (2002). El ISTA, es una asociación que busca principalmente la uniformidad de normas, acordadas internacionalmente, para el muestreo y el análisis de semillas entre laboratorios.

La metodología utilizada de germinación de semillas de cebada depende de cuál sea el objetivo del análisis (siembra o malteo), el test de germinación en laboratorios es diferente a la realizada por las malterías. Cuando el objetivo es determinar la germinación para la siembra para cultivo la metodología empleada se ajusta a las reglas establecidas por la International Seed Testing Association (ISTA). En este caso el objetivo es determinar el porcentaje de plántulas normales o sea aquellas que presentan intactas todas las estructuras esenciales y no considera dentro del porcentaje de germinación las plántulas que germinaron pero presentan anomalías (ver definición ISTA).

La industria maltera emplea como estimador de germinación parte de la metodología del Test de Pollock, descrito en el punto 3.3.1. Para ello se siembran 100 semillas en placa de Petri con 4 ml, obteniendo así el poder germinativo luego de 72 horas. La evaluación consiste en el recuento de semillas con dos milímetros de longitud radicular cada 24 horas.

Es esperable entonces encontrar diferencias entre los análisis de laboratorio de semillas y de la industria ya que buscan objetivos diferentes. La maltería necesita únicamente que se active el complejo hormonal y enzimático del grano, independientemente de cómo será esa plántula (normal o anormal), mientras que el laboratorio evalúa el resultado de las plántulas normales capaces de desarrollarse en plantas en condiciones de campo. Las plántulas anormales son un indicador de deterioro físico, fisiológico o sanitario del lote y al no sumarse al resultado final es esperable que por esta metodología el poder germinativo sea normalmente menor que el logrado en placas de Petri.

Cuando se habla de viabilidad en semillas debe tenerse en cuenta que se trata de un valor “promedio” de un lote, o sea que no se están deteriorando todas las semillas a la vez con igual intensidad y que el deterioro del lote es consecuencia de la muerte de semillas individuales en el transcurso del tiempo (Goldbach, citado por Correa, 2002).

Algunos de los factores que más pueden contribuir al deterioro son: acumulación de metabolitos tóxicos; desnaturalización de las proteínas, ácidos nucleicos y lipo-proteínas de las membranas celulares; agotamiento de los metabolitos esenciales y ataque de microorganismos dañinos a células, tejidos y órganos sexuales, Correa (2002).

El valor de germinación ofrece información suficiente sobre el desempeño de un lote de semillas, cuando este es de baja calidad (Ferguson, citado por Salinas et al., 2001). Mientras que lotes con alta germinación solo se podrán diferenciar en base al vigor.

Una elevada germinación no constituye una garantía de que el lote tendrá longevidad semejante a otro lote de la misma especie con poder germinativo igual e incluso inferior. Algunos test de vigor son capaces de detectar con mayor precisión el avance del deterioro en un lote de semillas, permitiendo diferenciar lotes de poder germinativo similar. Estos test de vigor permiten también evaluar el potencial relativo de almacenamiento de los lotes.

La germinación y el vigor son características influenciadas por factores bióticos (enfermedades, insectos) y abióticos (temperatura, humedad, deficiencias nutricionales, etc.) durante el desarrollo del cultivo de la planta madre y por las condiciones de almacenamiento del grano o semilla.

## 2.5 VIGOR

El vigor de las semillas ha sido definido como la sumatoria de aquellas propiedades de las mismas que determinan el nivel de actividad y su comportamiento durante la germinación y emergencia de las plántulas. Las semillas que muestran un buen comportamiento son consideradas de alto vigor, y aquellas que presentan un pobre comportamiento son llamadas semillas de bajo vigor (ISTA, citado por Salinas et al., 2001)



La Association of Official Seed Analysts (AOSA) (1983), define el vigor de la semilla como el conjunto de propiedades que determinan su potencial para una emergencia rápida y uniforme y el desarrollo de plántulas normales, bajo una amplia variación de condiciones. Estas propiedades engloban: constitución genética, condiciones ambientales y nutrición de la planta madre, estado de madurez a la cosecha, integridad física, deterioro y envejecimiento, y presencia de patógenos (Peretti 1994, André Tillman 2004).

La calidad de las semillas compromete la suma de todas las propiedades o características que determinan la performance potencial del lote de semillas y del establecimiento del cultivo. Los componentes de calidad de la semilla incluyen aspectos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios, Marcos-Filho (1998).

Para algunas especies, el momento en que el estado de desarrollo de la semilla alcanza su máximo peso de materia seca se llama madurez fisiológica. Coincidentemente la semilla posee en ese estado el máximo de germinación y vigor. Este momento se alcanza previamente al momento de cosecha. En soja y trigo ocurre con 45 y 35 % de humedad de la semilla respectivamente, Della Mea (1991).

Luego de este momento el vigor comienza a descender a una tasa diferencial según la especie. Aquí se dice que la semilla comienza su proceso de envejecimiento.

Esta calidad disminuye con el transcurso del tiempo y la tasa de deterioro dependerá de las condiciones ambientales durante el almacenamiento y el tiempo en que estas permanecen almacenadas. El primer componente de la calidad que muestra señales de deterioro es el vigor de las semillas, seguido por una reducción en la germinación o de la producción de plántulas normales y finalmente la muerte de las semillas afirma Ferguson, citado por Salinas et al. (2001). Según este autor, el vigor de las semillas se basa en el comportamiento físico o fisiológico de un lote de semillas, incluyéndose: 1) cambios en los procesos bioquímicos; 2) la tasa y uniformidad de germinación y crecimiento de las plántulas y 3) la germinación o capacidad de emergencia de las semillas al ser expuestas a condiciones de estrés, Salinas et al. (2001).

Además de las alteraciones en los procesos bioquímicos, condiciones de alta humedad en las semillas y/o elevadas temperaturas durante el almacenamiento, que conducen a un rápido envejecimiento, son tomadas como base para la ejecución de pruebas de vigor (Powell, citado por Salinas et al., 2001).

Un lote de alto vigor se desempeñará mejor ante condiciones desfavorables para su germinación e instalación del cultivo, y considerando la perspectiva de la industria maltera, permitiría planificar el malteo priorizando los lotes de bajo vigor y que rápidamente puedan perder viabilidad en las condiciones de almacenaje.

### 2.5.1 Pruebas de vigor

Las pruebas de vigor son usadas principalmente para proporcionar un índice más sensible de la calidad de la semilla que el análisis de germinación. El objetivo es proporcionar información sobre el potencial de desempeño a campo y/o en el almacenamiento de lotes de semillas con alta germinación, André Tillman (2004).

Según McDonald, Hampton, citados por Marcos Filho (1998), para que un test y análisis de vigor sea aceptado internacionalmente debe: a) proveer de un índice de calidad de semilla más sensible que el test de germinación, b) ranquear consistentemente los lotes de semillas en términos de performance potencial en el campo y/o en el almacenaje, c) ser objetivo, barato, simple, rápido, reproducible, interpretable y relacionado con la emergencia a campo (Marcos Filho 1998, André Tillman 2004).

A pesar de que se ha desarrollado y se ha lanzado un gran número de pruebas de vigor, algunas presentan mayores posibilidades de uso que otras, incluso con mayor perspectiva de estandarización, por lo menos en una misma especie, André Tillman (2004).

A continuación se presenta la lista de pruebas de vigor aceptadas por distintas asociaciones internacionales. No todas las pruebas sirven para la misma especie, además de tener objetivos diferentes. Ejemplo: El test de frío en maíz se utiliza para predecir el comportamiento de un lote ante siembras tempranas.

El ISTA propone este listado como las más convenientes: André Tillman (2004)

- Tasa de crecimiento de las plántulas
- Clasificación de vigor de plántulas
- **Envejecimiento acelerado**
- Prueba de frío
- Prueba del ladrillo molido o de Hiltner & Ihssen
- Deterioro controlado

- **Tetrazolio**
- **Conductividad eléctrica**
- Tetrazolio de la capa de aleurona

La AOSA propone este listado como las más convenientes: André Tillman (2004)

- Clasificación de vigor de plántulas
- Tasa de crecimiento de las plántulas
- **Envejecimiento acelerado**
- Prueba de frío
- Germinación a temperatura sub óptima
- **Tetrazolio**
- **Conductividad eléctrica**

#### 2.5.1.1 Test de envejecimiento acelerado

Este método fue desarrollado por primera vez en la Universidad de Mississippi en EEUU por Delouche en 1965, ISTA (1987)

En este test, las semillas son sometidas a condiciones excesivas de humedad y elevada temperatura, consideradas inadecuadas para la conservación de su viabilidad, Peretti (1994). Por ejemplo, la ISTA (1987) establece un periodo de 72 horas a 40°C para *Festuca arundinacea*. Para cebada Della Mea (1991) cita aproximadamente 58 horas a 40 °C y humedad relativa de 100%.

Uno de los objetivos de este test, es predecir el mantenimiento de la viabilidad de lotes de semillas durante el almacenamiento. Su uso como test de vigor está muy difundido para trigo y maíz, está en fase de prueba para girasol y está internacionalmente estandarizado para la soja, ISTA (2010). También se lo ha aplicado en especies hortícolas y leguminosas forrajeras, Peretti (1994).

Para semillas de pequeño tamaño se propuso una variación del método para retrasar la absorción de agua por la semilla usando los mismos principios y procedimientos del test de envejecimiento acelerado pero sustituyendo el agua por soluciones salinas (NaCl, KCl, NaBr), Marcos-Filho (1998). Esta práctica, sirve para evitar daños en las membranas por la rápida y alta absorción de agua, causando alteraciones en los resultados.

Cuando los resultados de esta prueba son comparados con los de la germinación del mismo lote de semillas antes del envejecimiento, la germinación de semillas después del envejecimiento es similar a la de la germinación antes del envejecimiento acelerado cuando las semillas son de alto vigor o menores que la germinación previa en semillas con medio o bajo vigor. De esta manera, los resultados pueden ser utilizados para clasificar los lotes de semillas según su vigor y para la toma de decisiones en cuanto a la capacidad de almacenamiento o potencial de siembra de cada lote de semillas. Aquellos lotes de semillas que presenten una germinación superior al 80% después del envejecimiento acelerado, podrían ser clasificados como de alto vigor, entre 60 y 80% como vigor medio, y menores de 60%, como de bajo vigor, Salinas et al. (2001).

Las muestras deben ser todas tratadas contra hongos o todas sin tratar, no podrán hacerse comparaciones entre tratadas y no tratadas. Además, los lotes a evaluar deben tener una humedad dentro de cierto rango que dependerá de cada especie, ISTA (1987). Para trigo este rango es de 10-14% de humedad. La cámara a utilizar debe tener como máxima variación 0,3°C, ya que diferencias de 0,5°C puede provocar variación de resultados en el orden del 20%, André Tillman (2004).

#### 2.5.1.2 Test de conductividad eléctrica

Fue por primera vez adaptado por Presley en 1958 como prueba de semillas para medir la viabilidad de las semillas de algodón, AOSA (1983).

Aunque la aceptación y estandarización internacional de este test ha sido alcanzada recientemente para semillas de *Pisium sativum* y *Phaseolus vulgaris*, algunos detalles de la metodología todavía constituyen un desafío para la investigación, Marcos-Filho (1998).

El test de conductividad efectúa una evaluación indirecta de la integridad de la membrana. La integridad de las membranas es importante para muchas reacciones bioquímicas en células vivas. Cambios en la ultraestructura de semillas envejeciendo han sido detectados por electromicroscopios y por test sensibles de lixiviación (Hill y Delouche, Harman y Granett, citados por AOSA, 1983).

El vigor puede ser estudiado también midiendo la cantidad de iones liberados como aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas por las células de una semilla. El concepto base es que las membranas celulares sufren cambios en su organización molecular

durante el proceso de deshidratación que sufre la semilla hasta lograr su madurez fisiológica. Pero durante la imbibición lenta propia del comienzo de la germinación, se reconstituye la ultraestructura de esas membranas. Al alcanzar integridad, permite que se ejerza la permeabilidad selectiva en el pasaje de sustancias, iones y solutos hacia y desde la célula, Peretti (1994).

El primer reporte de la existencia de una relación entre la lixiviación de solutos y la emergencia a campo fue en 1968 por Matthews y Whitbread, citados por ISTA (1987). Existen dos metodologías para la determinación de la conductividad en semillas: masal e individual. La primera consiste en la medición de la conductividad de un conjunto de semillas con cierto volumen de agua representando a un lote de semillas. La segunda es individual, por cada semilla se obtiene un valor de conductividad.

Los lotes de semillas que muestran una elevada germinación en laboratorio pero que liberan grandes cantidades de electrolitos durante el periodo de lixiviación, son considerados de bajo vigor, indicando que ese lote de semillas puede tener un bajo desempeño ante condiciones de estrés. Contrariamente, lotes con una alta germinación y baja liberación de electrolitos son considerados de alto vigor y con mejor capacidad para soportar condiciones de estrés (Powell, citado por Salinas et al., 2001). Esto se debe a que las semillas con alto vigor recomponen la integridad de las membranas celulares más rápidamente que las de menor vigor; por lo tanto, cuando son sumergidas en medio acuoso liberan menos electrolitos que las semillas de bajo vigor. Por lo que la conductividad es inversamente proporcional al vigor, Peretti (1994). Esto también fue afirmado en 1995 por Ferguson, citado por Salinas et al. (2001).

Muestras que presentan elevada lixiviación de electrolitos pueden no ser aptas para siembras tempranas donde la germinación de la semilla se encuentre en condiciones desfavorables de humedad y temperatura. Además semillas con altas lecturas de conductividad pueden perder su vigor rápidamente durante el almacenamiento, AOSA (1983).

Arango et al. (1996) trabajando con un conductímetro masal, determinaron la capacidad germinativa de semillas de girasol, y establecieron valores de corte para poder germinativo y vigor. Murcia et al. (2001), reportan para girasol que el potencial germinativo determinado por conductividad eléctrica no difirió de la germinación sobre arena estéril y tamizada.

Murcia (2004), trabajando con semillas de soja no encontró relación entre conductividad eléctrica individual y ensayo topográfico por tetrazolio, no pudiendo clasificar las semillas por su conductividad en categorías de vigor definidas por tetrazolio.

Para Salinas et al. (2001) la conductividad eléctrica es considerada una buena prueba de vigor para detectar indirectamente las alteraciones en las membranas citoplasmáticas, en estadios tempranos del deterioro de las semillas de soja.

Existe una buena correlación entre la podredumbre de las plántulas y la cantidad de carbohidratos exudados de semillas. El test de conductividad eléctrica se ha aplicado en numerosas especies tales como: arroz, soja, arveja, maíz, vicia, trigo, algodón, lupino, girasol, remolacha azucarera, mostaza, tréboles, raigrás perenne, brasicas, alfalfa, tomate, cebolla, pimiento, cebada, porotos y coníferas, Craviotto et al. (2008). Este test ha mostrado una buena correlación con el vigor de las semillas de arroz (Agrawal, citado por AOSA, 1983), maíz (Gill y Delouche, Tao, citados por AOSA, 1983), soja (Abdul-Baki y Anderson, Yaklich et al., Tao, citados por AOSA, 1983), cebada (Abdul-Baki y Anderson, citados por AOSA, 1983), trébol y raigrás (Ching y Schoolcraft, citados por AOSA, 1983).

#### Factores que afectan la medición de la conductividad

Varios factores pueden causar variaciones en los resultados de los test de conductividad, semillas con altos contenidos iniciales de humedad, ejemplo 30% o más para guisantes producen bajas lecturas de conductividad (Simon y Wiebe, citados por AOSA, 1983), mientras que semillas con bajos contenidos de humedad, ejemplo 7,2% para Soja producen lecturas significativamente altas de conductividad (Pollock et al., Tao, citados por AOSA, 1983). Semillas con daños mecánicos dan valores altos de conductividad (Tao, citado por AOSA, 1983), tratamientos químicos sobre las semillas también afectan los resultados (Tao, citado por AOSA, 1983), pero el lavado con metanol elimina el efecto negativo del tratamiento químico que tenga la semilla (Tao, citado por AOSA, 1983). También se menciona el tamaño de los recipientes de lixiviación como factor influyente en los resultados. Para algunos la limitante principal del método de conductividad masal es que los resultados es un promedio de la evaluación de 25 semillas, por lo tanto asume que todas las semillas liberan igual cantidad de electrolitos al agua. Sin embargo, un lote de semillas esta compuesta por una población de individuos, cada uno con su propio performance en el campo. Por lo tanto los resultados de los test de conductividad reflejarían mejor el vigor de un lote de semillas si fueran analizados en celdas individuales. Hoy en día existe un instrumento

comercial que monitorea la conductividad de cada semilla. Estudios recientes sugieren que este instrumento proporciona medidas más precisas de vigor que el actual método, para conductividad de semillas de soja (Mc Donalds y Wilson, Miles y Copeland, citados por AOSA, 1983), algodón (Hopper y Hington, citados por AOSA, 1983) y maíz (Joo et al., citados por AOSA, 1983).

Para que los resultados de los análisis sean comparables y repetibles entre laboratorios es indispensable la estandarización del test, para lo cual es necesario tener en cuenta aspectos relacionados a la estructura vegetal a ser analizada, el tipo de agua a utilizar, el modo de operación del equipo, el manejo del material y la interpretación de los resultados, Craviotto et al. (2008).

Craviotto et al. (2008), trabajando con semillas de trigo y maíz reportan (con un conductímetro de celdas individuales) que las sustancias a ser lixiviadas desde las superficies internas de la semilla, debieron atravesar diferentes capas de células de distinta organización anatómica y textura, que influyeron en el tiempo de la medición de la conductividad. En el caso de algunos cereales forrajeros como cebada, avena, raigrás y festuca que poseen cariopses vestidos, la presencia de glumas, lemma y pálea, ejercieron un obstáculo adicional a la libre difusión de electrolitos.

Las semillas no deben llevar adheridas partículas extrañas como arena, tierra, aceite, restos orgánicos e inorgánicos ya que alteran la medición de la conductividad y ensucian los electrodos, Craviotto et al. (2008).

El contenido de humedad de las semillas es importante y afecta los resultados. Un rango entre 11 y 17% de contenido de humedad no produce alteraciones significativas en la medición de la conductividad. Semillas por debajo de 11% deberían acondicionarse entre papel de toalla húmedo durante 1-2 horas antes de sumergirlas en el agua de cada celda para dar comienzo a la lixiviación. Semillas por encima de 17% de humedad podrán colocarse entre papel de toalla seco hasta lograr la humedad adecuada, Craviotto et al. (2008).

El medio de lixiviación no debe exceder los  $5\mu\text{S}/\text{cm}$  de conductividad eléctrica, lo cual es cumplido por el agua desionizada. Si se utiliza agua destilada debe tenerse en cuenta este último aspecto. Es recomendable almacenar el medio de lixiviación en un ambiente a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por lo menos 24 horas antes de su uso para evitar alteraciones durante el periodo de lixiviación, Craviotto et al. (2008).

El volumen de agua en cada una de las celdas es otro factor de importancia, debiéndose mantener constante entre análisis. Las semillas y/o frutos liberan electrolitos al medio acuoso, y se produce una dilución de los mismos. Cuanto menor es la cantidad de sustancias liberadas, que puedan conducir la corriente eléctrica, mayor es la incidencia del volumen de agua en la medición, Craviotto et al. (2008).

Hay evidencia del efecto cultivar en maíz (Tao, citado por AOSA, 1983). El bajo vigor de las semillas de un cultivar en particular puede tener menores lecturas de conductividad que semillas de alto vigor que otro cultivar. Por lo tanto ciertos cultivares deberían tener sus propios estándares de vigor debidos a sus cualidades genéticas, AOSA (1983).

#### 2.5.1.3 Prueba topográfica de tetrazolio

Los test que dan resultado en un corto periodo son los más demandados para agilizar las decisiones en las diversas etapas del proceso productivo. En este contexto, el test de tetrazolio ha mostrado ser una alternativa promisorio por la confiabilidad y rapidez en la determinación de viabilidad y vigor de la semilla (Behring, citado por Russi et al., 2007).

Se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas, particularmente de las enzimas deshidrogenasas del ácido málico que reducen la sal de tetrazolio en los tejidos vivos de las semillas, donde los hidrogeniones son transferidos a la referida sal. Cuando la semilla es inmersa en la solución de tetrazolio, ocurre una reacción de reducción en las células vivas resultando en la formación de un compuesto rojo, no difusible, conocido como trifenilformazán, indicando que hay actividad respiratoria en las mitocondrias y, consecuentemente, que el tejido es viable (vivo). Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución y conservan su color natural (Behring, citado por Russi et al., 2007).

A través de la observación de la coloración obtenida en las diferentes partes de la semilla permite determinar la presencia, localización y naturaleza de las alteraciones en los tejidos (embrionales) de la semilla, permitiendo frecuentemente identificar las causas de la pérdida de la viabilidad y del vigor de un lote de semillas (Behring, citado por Russi et al., 2007).



Como limitantes se destacan la subjetividad y la baja repetibilidad, AOSA (1983). Su dificultad radica en que es necesario ajustarse con precisión los patrones de tinción para minimizar la interpretación subjetiva, Peretti (1994).

Según Behring, citado por Russi et al. (2007) existe una alta correlación entre las determinaciones de poder germinativo y vigor por tetrazolio, si bien es posible hallar algunas variaciones entre ambos debido a factores que afectan la germinación, como son: factores agroclimáticos, de dormición, de nutrición o agentes patógenos. Se puede conseguir ajustar la exactitud de la interpretación realizando al mismo tiempo las pruebas de tetrazolio y de germinación estándar y comparando los resultados.

La eficiencia del test en avalar el vigor y la viabilidad de las semillas esta relacionada al desarrollo de la metodología adecuada para cada especie, de modo de definir las condiciones más apropiadas para la preparación, pre-acondicionamiento y coloración de las semillas, Russi et al. (2007).

La determinación de viabilidad por tetrazolio se facilita y acelera empleando el Vitascopio, aparato que efectúa la tinción de las semillas en pocos minutos. La rapidez ha posibilitado su aplicación en partidas de cebada con destino a malteo en donde la celeridad de la toma de decisiones impide el uso de otros análisis de calidad de semilla (poder germinativo, etc.). Su uso no es aceptado por normas internacionales y no es comparable con el análisis de tetrazolio, Russi et al. (2007).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de análisis de semillas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) pertenecientes a las estaciones experimentales de La Estanzuela y Treinta y Tres y el Instituto Nacional de Semillas (INASE). Los laboratorios de INIA son habilitados por INASE y miembros de la International Seed Testing Association (ISTA), en tanto que el laboratorio de INASE es habilitado por ISTA. El período experimental se extendió desde marzo de 2008 hasta diciembre de 2009.

#### 3.2 DESCRIPCIÓN Y CALIBRACIÓN DEL CONDUCTÍMETRO

##### 3.2.1 Analizador automático de semillas, SAD-9000-S

El Analizador automático de semillas SAD-9000-S determina la conductividad eléctrica individual de cada semilla. El equipo consta de gradillas múltiples de lixiviación con cien celdas cada una, donde se colocan las semillas; un cabezal múltiple de cien pares de electrodos que determinan la conductividad individual de cada semilla; una bandeja lavadora del cabezal que se utiliza para limpiar los electrodos entre evaluaciones; un pad para el secado del cabezal; un dosificador múltiple de agua destilada para diez celdas que asegura la exactitud del llenado; un Software; y manuales.

##### 3.2.2 Calibración

Un objetivo de este experimento fue calibrar el analizador automático de semillas SAD-9000-S para poder estimar la germinación de semillas de cebada cervecera. Para su calibración se determinó el tiempo de lixiviación y los valores de corte del poder germinativo en lotes de cebada de diferente calidad fisiológica.

### 3.2.2.1 Determinación del periodo de lixiviación

El término lixiviación se refiere a la liberación de sustancias (solutos) de una semilla colocada en una solución durante un periodo.

Se colocaron dos lotes con 70% y 98% de germinación, con dos repeticiones de cien semillas cada uno en las celdas individuales conteniendo éstas 5 ml de agua destilada. A partir del tiempo cero, se midió la conductividad en intervalos de tiempo de dos horas hasta llegar al tiempo de lixiviación de 24 horas. Para el lote de 70% de germinación, al tiempo de 14 horas no se pudo registrar el dato de conductividad eléctrica.

Se construyó una tabla con los valores de conductividad obtenidos y se visualizó mediante un gráfico a partir de cuántas horas no se producen incrementos importantes en la conductividad. En este trabajo se ajustó un modelo tri-segmentado y así determinar el periodo de lixiviación.

### 3.2.2.2 Determinación de valores de corte para el poder germinativo en cebada cervecera

Establecer los valores de corte para poder germinativo (PG) tuvo por objetivo diferenciar semillas según el potencial fisiológico para germinar mediante los principios de la conductividad eléctrica.

Para lograr este objetivo se requieren lixiviar diez a veinte lotes de semilla de diferente poder germinativo (PGerm) como fuente de variación, según se indica en el manual del equipo SAD-9000-S. En este sentido se trabajó con 12 lotes cuyas características se presentan en el cuadro 1. Cabe destacar que todos los lotes fueron previamente clasificados en 1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup>. Los granos que no pasan la zaranda de 2,8 mm son denominados granos de 1<sup>a</sup>; los que quedan por encima de la de 2,5 mm, son los granos de 2<sup>a</sup>.

Cuadro 1. Características de las muestras utilizadas para determinar el valor de corte de conductividad para poder germinativo (%PGerm)

Cosecha	Cultivar	%PGerm
2005	CLE233	98
2007	CLE247	70
2007	INIA Arrayán	90
2007	Norteña Carumbé	90
2007	Norteña Carumbé	91
2007	Norteña Carumbé	98
2007	Perún	94
2008	MUSA 936	92
2008	MUSA 936	94
2008	Norteña Carumbé	97
2008	Perún	99
2008	Norteña Daymán	95

Se colocaron a lixiviar dos repeticiones de 100 semillas por lote con germinación conocida, la cual se ingresó en el software del equipo SAD-9000-S. Cada semilla se dispuso en una celda individual con 5 ml de agua destilada por 16 horas (tiempo de lixiviación utilizado). Luego de este período de lixiviación, el equipo registró el valor de conductividad individual en la unidad micro Siemens por cm ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) para cada semilla de la gradilla y el promedio de las 100 semillas. El valor de corte se determina en función del valor de germinación ingresado al programa. Si para un lote la germinación es 98% el valor de corte será el segundo valor de conductividad más alto en la lectura sobre las cien semillas de la gradilla múltiple.

Según el manual SAD-9000-S el valor de corte se consigue mediante un análisis de frecuencias de los valores de corte obtenidos. El valor de corte para la especie será aquel que más veces se repite sobre un total de 10 o 20 lotes.

Se construyó un gráfico de dispersión de la germinación en función de los valores de corte de cada lote. Sobre este gráfico se ajustó una línea de tendencia y se observa su coeficiente de correlación.

### 3.3 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE ALMACENAMIENTO MEDIANTE TRES MÉTODOS DE VIGOR

Para evaluar la capacidad predictiva de diferentes métodos de vigor respecto al potencial de almacenaje de la semilla de cebada se trabajó con 6 lotes, los cuales fueron seleccionados en función de su germinación y del año de cosecha (2007 y 2008), (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Características de las muestras de semillas utilizadas

Material	Año de Cosecha	Denominación	Germinación (%)
Norteña Carumbé	2007	NC-07A	97
Norteña Carumbé	2007	NC-07M	91
CLE 247	2007	C247-07B	64
Norteña Carumbé	2008	NC-08A	97
Norteña Daymán	2008	ND-08M	91
CLE 258	2008	C258-08B	23

Nota: La germinación referida en este cuadro es la obtenida en rollo de papel

Las semillas utilizadas correspondieron a las variedades Norteña Carumbé, Norteña Daymán y a dos líneas experimentales, CLE 247 y CLE 258. Los datos de germinación del cuadro 2 fueron tomados el 16 de junio de 2009. Los lotes se clasificaron según el poder germinativo en alto (NC-07A y NC-08A), medio (NC-07M y ND-08M) y bajo (C247-07B y C258-08B).

Las muestras fueron almacenadas en sacos de lienzo a temperatura ambiente (20-22°C) por un periodo de 7 meses. Posteriormente los lotes fueron sometidos a condiciones de stress que consistió en colocarlas 24 horas a 42 °C con alta humedad relativa (cerca al 100%). De este modo se aceleró el envejecimiento natural de las semillas permitiendo acortar los tiempos biológicos necesarios para determinar el deterioro en condiciones de almacenaje. Luego de someterlas en estas condiciones, las semillas fueron colocadas a germinar las semillas en rollos según la metodología de las reglas ISTA y en placas de Petri con 4 ml de agua.

### 3.3.1 Envejecimiento acelerado

La prueba de envejecimiento acelerado (EA) se realizó según el manual de pruebas de vigor ISTA (1995). Se utilizó un equipo de EA, Seedburo Quality, con variación de temperatura de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

El diseño experimental fue en bloques al azar con tres repeticiones diferidas en el tiempo. En cada unidad experimental se colocaron 22 gramos de semilla, buscándose asegurar un mínimo de 400 semillas, distribuidas en forma homogénea en una sola capa sobre una malla de metal suspendida dentro de una caja gerbox (7cm x 12cm x 11cm) conteniendo 50 ml de agua destilada. En cada bloque se colocó un registrador de temperatura y humedad a fin de registrar la variabilidad de la cámara de EA. El tratamiento de EA consistió en exponer a las semillas durante 60 horas a  $42^{\circ}\text{C}$  de temperatura y a alta humedad relativa, cercano al 100%. Una vez transcurrido el tiempo de envejecimiento las semillas fueron retiradas de la cámara y colocadas a germinar, en un plazo menor a una hora utilizándose dos metodologías de germinación:

#### Germinación como semilla

La prueba de germinación estándar se realizó de acuerdo con las Reglas de Análisis de Semillas ISTA (2009). De cada caja gerbox se colocaron a germinar 2 repeticiones de 100 semillas, sobre un sustrato de papel de germinación (Anchor paper) humedecido con agua. Las semillas fueron acondicionadas en rollos y colocadas a germinar a temperatura controlada de  $20^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 7 días. La evaluación consistió en dos recuentos de plántulas a los 4 y 7 días de comenzada la prueba de germinación. A los 4 días, se evaluó la energía germinativa a través del número de plantas normales y los 7 días se evaluó el número de plántulas normales, anormales y semillas muertas. Los resultados se expresaron como porcentaje promedio de las 2 repeticiones.

#### Germinación como grano malteable

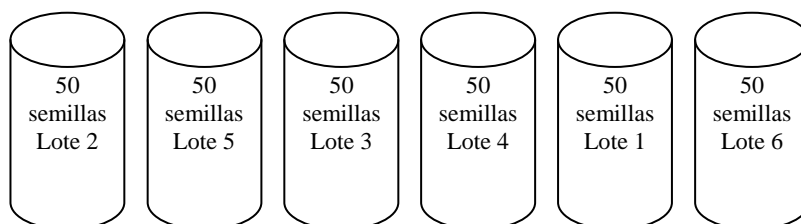
De cada caja gerbox se colocaron a germinar 2 repeticiones de 100 semillas sobre una placa de Petri con 2 papeles filtro Watman No.1 de 9 mm y 4 ml de agua destilada. Las semillas fueron distribuidas sobre el papel en forma radial en posición ventral Pollock (1952), foto 1. Las placas se colocaron en cámara de germinación a  $20^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad durante 72 horas. A las 24, 48 y 72 hs se contaron y retiraron los granos con protrusión de raíz 2 mm de longitud. El resultado se expresa como el porcentaje de granos germinados a las 72 horas.

Foto 1. Distribución de las semillas en placas de Petri



### 3.3.2 Prueba topográfica por tetrazolio

Para evaluar el vigor de las semillas mediante la prueba topográfica por tetrazolio se utilizó un diseño en bloques desfasados en el tiempo con 3 repeticiones. Para cada tratamiento se analizaron 50 semillas por lote.



Bloque 1, 1/6/2009

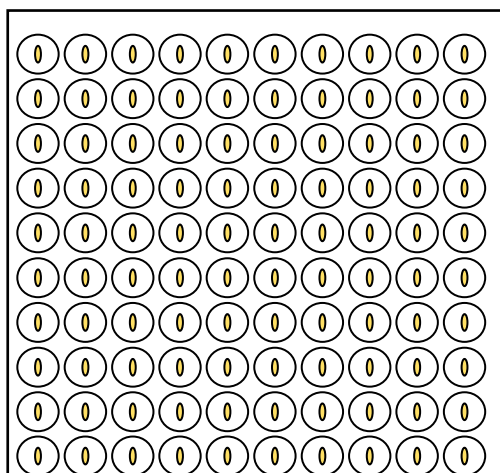
Las semillas fueron acondicionadas 12 horas sumergiéndolas en agua y colocándolas en cámara a 20°C. Posteriormente, se les efectuó un corte longitudinal a través del embrión hasta  $\frac{3}{4}$  del endosperma. Una vez efectuado el corte las semillas fueron colocadas dentro de una solución de 1% de sal de tetrazolio -Sigma- (cloruro de 2,3,5, -trifenil-tetrazolio) y colocadas en estufa a 30°C durante 3 horas para provocar su tinción.

Luego del período de tinción con la solución de tetrazolio los tejidos del embrión muestran diferentes coloraciones en función de su viabilidad. La coloración blanca indica la presencia de tejido muerto o “no viable”, mientras que la coloración roja la de tejido viable.

La determinación del vigor de las semillas de cada lote se efectuó bajo lupa con aumento de 20x, considerando la proporción y localización de tejido muerto en el embrión. De esta forma se clasificaron las semillas en cuatro categorías: viables sin defectos (el embrión no presenta tejido muerto); viables con defectos moderados (la localización y proporción de tejido muerto en el embrión no compromete la producción de una plántula normal); viables con defectos severos (la localización y proporción de tejido muerto en el embrión compromete la producción de una plántula normal) y no viables (la localización y proporción del tejido muerto en el embrión compromete la viabilidad del embrión). El valor de vigor de cada lote se determinó por dos criterios, una de ellas por la suma de las semillas viables sin defectos y con defectos moderados; la otra es considerando únicamente las viables sin defectos determinando así el máximo vigor del lote.

### 3.3.3 Test de vigor mediante conductividad eléctrica

La prueba de conductividad eléctrica se realizó mediante el uso del analizador automático de semillas SAD-9000-S (MR Consultar Ingeniería e Informática, Rosario Argentina) utilizándose dos repeticiones de 100 semillas para cada tratamiento.



Gradilla múltiple de lixiviación

Previo a la colocación de las semillas a lixiviar se las acondicionó para que la humedad de las mismas quedara comprendida en el rango de 11% a 14% de forma de evitar daños en los tejidos debido a un proceso de imbibición excesivamente rápida. La humedad fue medida previamente a este ensayo mediante En aquellos casos donde la humedad era inferior a 11% las semillas eran humedecidas sobre un papel de filtro húmedo hasta llegar a los valores deseados por diferencia de peso, ya que la humedad se conocía se determinó de la siguiente forma:



$$\% \text{ peso final} = \frac{\text{peso inicial de 100 semillas (g)} \times \% \text{ humedad objetivo}}{\% \text{ humedad inicial}}$$

### 3.3.4 Análisis de datos

Los resultados obtenidos de los métodos de germinación y vigor fueron sometidos a un análisis de regresiones mediante el programa SAS (del SAS Institute). Para buscar el mejor ajuste entre la germinación post-almacenaje y cada método de vigor se realizaron las transformaciones de las variables a su logaritmo. Luego se buscó un ajuste lineal.

El modelo lineal general que se utilizó fue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x + \epsilon_i$$

Donde  $Y_i$  es la media ajustada por el diseño experimental de la variable de respuesta (Tetrazolio, T<sub>max</sub>vigor, conductividad eléctrica, REA y PEA),  $\beta_0$  es el intercepto,  $\beta_1$  es la pendiente de la curva,  $x$  es la variable independiente (germinación post-almacenaje y caída de germinación post-almacenaje evaluado en rollo y en placa de Petri),  $\epsilon_i$  es la falta de ajuste de la regresión.

Este modelo fue comparado con un modelo logarítmico donde se ajustó una regresión sobre  $x$ . Se compararon los ajustes ( $R^2$  corregido) de los modelos lineales y logarítmicos, se reporta el modelo con mejor ajuste en cada caso.

El valor de  $P$  surge de los análisis de Varianza y es la probabilidad de cometer un error de tipo I (falso positivo) si se rechaza la hipótesis nula. El valor de  $R^2$  proporciona una idea sobre el ajuste del modelo.

Además de  $P$  y  $R^2$ , se proporciona el desvío estándar, calculado como:

$$\sigma = \sqrt{CME + (1 + 1/6)}$$

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 PODER GERMINATIVO INICIAL DE LOS LOTES

Los valores de germinación de los 6 lotes de semillas utilizados en el estudio se presentan en el cuadro 3. Allí se observan los resultados obtenidos con dos metodologías, bajo la forma estándar de germinación de semillas (rollo) y como grano malteable (placas de Petri).

Cuadro 3. Porcentaje de germinación inicial de los lotes evaluados

Lote	% Germinación inicial	
	Rollo	Placa de Petri
NC-07A	97	99
NC-07M	91	92
C247-07B	64	87
NC-08A	97	99
ND-08M	91	97
C258-08B	23	24

Se observa del cuadro 3 que en todos los casos, los valores de germinación obtenidos al colocar las semillas en placas de Petri son mayores que los valores obtenidos mediante la germinación estándar en rollo. Dichas diferencias se explican porque mientras el análisis de germinación estándar en rollo tiene una duración total de 7 días y discrimina entre las plántulas normales, anormales y semillas muertas; considerando únicamente las primeras para obtener el valor de germinación. El análisis en la placa de Petri tiene una duración de 3 días en el cual se determina el número de semillas que presentan 2 mm de longitud radicular, las cuales son consideradas para obtener el valor de poder germinativo o “granos malteables”.

## 4.2 EVALUACIÓN POR MÉTODOS DE VIGOR

### 4.2.1 Prueba topográfica por tetrazolio

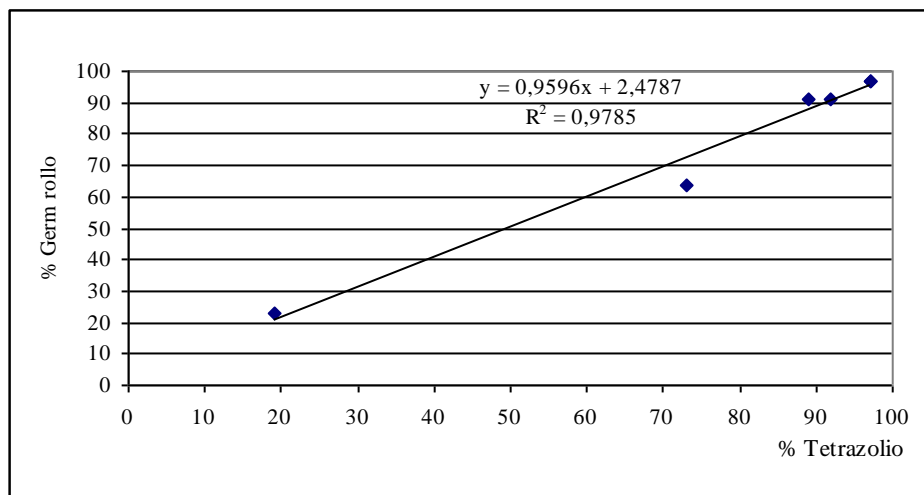
En el cuadro 4, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los diferentes lotes utilizando la metodología de análisis topográfico por Tetrazolio. En dicho cuadro, la columna Tetrazolio corresponde a la suma de semillas viables sin defectos y semillas viables con defectos moderados, mientras que en caso de la columna Tmaxvigor (Tetrazolio máximo vigor) solo se incluyeron las semillas viables sin defectos.

Cuadro 4. Porcentaje de vigor del análisis topográfico por Tetrazolio

Lote	Tetrazolio (%)	Tmaxvigor (%)
NC-07A	97	78
NC-07M	89	75
C247-07B	73	56
NC-08A	97	83
ND-08M	92	70
C258-08B	19	13

Comparando los resultados en los cuadros 3 y 4 se puede observar que el método por Tetrazolio es capaz de discriminar calidades en forma similar a la germinación en rolo, entre estas variables hay una alta correlación como se muestra en el gráfico 2. Behring, citado por Russi et al. (2007) explica que entre estas dos técnicas existe una alta correlación. Estos métodos se diferencian de la germinación en placa de Petri, ya que en este último método no se discriminan aquellas semillas que presentan daños en zonas de importancia para un desarrollo normal de la plántula.

Gráfico 2. Germinación inicial evaluada en rollo en función del Tetrazolio



La diferencia entre los resultados de Tmaxvigor y Tetrazolio expresan la cantidad de semillas viables con defectos moderados. En el caso particular de los lotes estudiados, estas diferencias no cambiaron el ranking de los lotes aunque si atenuaron o incrementaron algunas diferencias, como se observa por ejemplo entre los lotes ND-08M y NC-08A que pasan de un 2% de diferencia para la germinación en placas de Petri y 6% para la germinación en rollo a 13 % cuando se comparan bajo el método denominado Tmaxvigor.

#### 4.2.2 Envejecimiento acelerado

Los resultados obtenidos para la prueba de envejecimiento acelerado son presentados en el Cuadro 5, donde se evaluó la germinación en rollo y como grano malteable en placas de Petri.

Cuadro 5. Porcentaje de vigor obtenido en el Envejecimiento Acelerado evaluado en rollo y en placas de Petri (P Petri)

Lote	Envejecimiento Acelerado	
	Rollo (%)	P Petri (%)
NC-07A	81	68
NC-07M	66	56
C247-07B	44	41
NC-08A	82	89
ND-08M	71	78
C258-08B	4	3

Del cuadro anterior se destaca que las semillas de un mismo lote y expuestas al mismo tratamiento de envejecimiento, expresaron diferencias en su germinación al ser evaluadas en rollo o en placas de Petri. Para algunos casos, el comportamiento es contrario al encontrado en el cuadro 3 donde se observó mayores valores de germinación en placas de Petri.

Las condiciones a la que son expuestas las semillas en el método de envejecimiento acelerado (altas temperaturas y humedad relativa) pueden hacer proliferar microorganismos (hongos y bacterias) presentes en las semillas. Es así que la menor germinación encontrada en placas de Petri, posiblemente se deba a la proliferación de microorganismos que se desarrollan en un menor espacio (63,61 cm<sup>2</sup>) si se lo compara con el rollo de papel de 38,0 x 25,4 cm (965,2 cm<sup>2</sup>). Además de perjudicarse las semillas infectadas, éstas pueden provocar infecciones secundarias en semillas sanas vecinas que en esas condiciones no inician la germinación al cabo de 72 hs, tiempo en que finaliza la evaluación. Esta situación se expresó en los lotes del año 2007 en los cuales es esperable que exista un mayor desarrollo de hongos de almacenaje que en los lotes de cosecha más reciente (2008).

Los valores de Envejecimiento Acelerado cuando se realizó la germinación en rollo resultan comparables a los de Tmaxvigor (Cuadro 4) aunque en algunos casos logran una mayor discriminación entre los lotes como se manifiesta en los casos de NC-07M y C247-07B.

### 4.2.3 Conductividad eléctrica individual

#### 4.2.3.1 Determinación del periodo de lixiviación

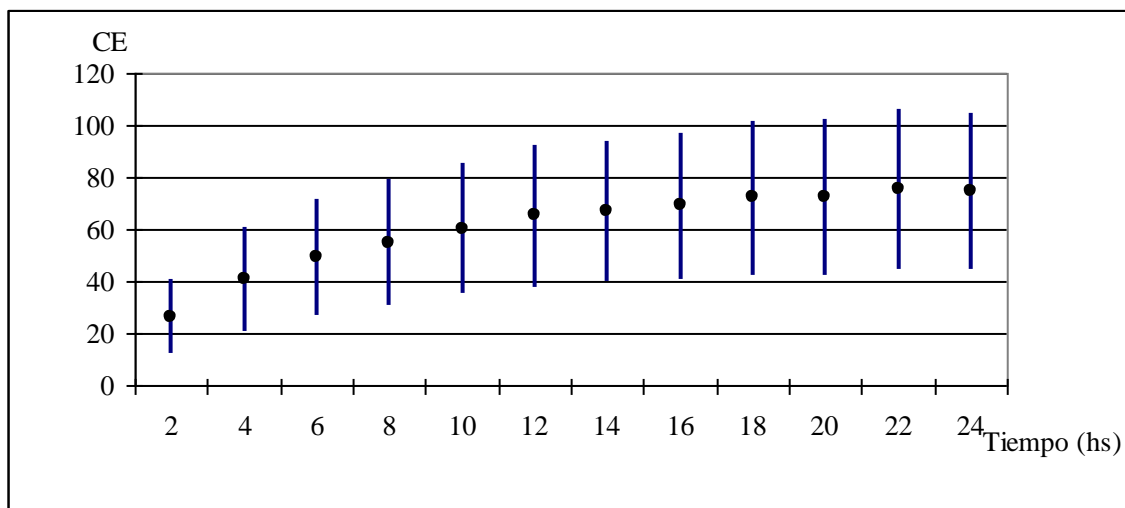
Para utilizar el equipo con semilla de Cebada, fue necesario determinar el periodo de lixiviación al cual deberían estar expuestas las semillas antes de tomar la lectura de conductividad. A continuación se presentan en el cuadro 6 y el gráfico 2, los resultados promedios de conductividad eléctrica obtenidos en dos lotes de cebada con distinto poder germinativo (evaluado en rollo).

Cuadro 6. Valores de conductividad eléctrica promedio (CE) de dos repeticiones y sus desvíos estándar medidos cada 2 horas para el lote con 70% de germinación

Lote de 70% de germinación					
Rep 1	CE ( $\mu\text{S/cm}$ )	Desvío ( $\mu\text{S/cm}$ )	Rep 2	CE ( $\mu\text{S/cm}$ )	Desvío ( $\mu\text{S/cm}$ )
2 hs	42,10	15,42	2 hs	35,00	16,32
4 hs	65,01	18,97	4 hs	54,45	20,40
6 hs	80,47	22,90	6 hs	68,07	22,38
8 hs	87,67	24,50	8 hs	76,85	25,58
10 hs	98,99	27,99	10 hs	85,25	28,35
12 hs	102,74	29,87	12 hs	90,88	31,39
14 hs	Sd	sd	14 hs	sd	sd
16 hs	115,90	36,10	16 hs	101,20	36,60
18 hs	115,34	37,84	18 hs	104,29	38,87
20 hs	122,58	42,17	20 hs	106,62	40,38
22 hs	120,44	42,91	22 hs	108,36	41,43
24 hs	125,34	45,93	24 hs	111,39	43,69

Comparando los resultados del cuadro 6 y la gráfica 2, se observa que el equipo de conductividad demostró cumplir con los principios básicos indicados en el punto 2.5.1.2. Es decir, las semillas de mayor poder germinativo expresan menores valores de conductividad y a medida que avanza el tiempo de lixiviación, mayor es la cantidad de solutos disueltos al medio y por lo tanto mayores son los valores de conductividad eléctrica. Para el lote de 70% de germinación no se registraron los datos de conductividad eléctrica individual a las 14 horas de periodo de lixiviación.

Gráfico 3. Conductividad eléctrica promedio de dos repeticiones y su desvío estándar en función del tiempo para un lote con 98% de germinación



Con los resultados obtenidos se ajustó un modelo tri-segmentado para predecir a partir de qué tiempo no se producen incrementos significativos en la conductividad eléctrica durante la lixiviación. Para el lote de 70% de germinación el tiempo exacto para medir la conductividad fue 13,92 horas y para el lote de 98% fue 13,06 horas, por lo que 14 horas sería un tiempo suficiente para tomar la lectura de conductividad. En el trabajo, por razones prácticas, se realizaron las mediciones al cabo de 16 horas de lixiviación.

Como se muestra en el Cuadro 7, al evaluarse la calidad de los lotes por el método de conductividad eléctrica, los valores de conductividad obtenidos con el equipo no concuerdan con el principio básico de conductividad definido en el punto 2.5.1.2. Estos resultados fueron inconsistentes en relación a los valores de germinación de los lotes. Este comportamiento estuvo asociado a fallas del equipo debido a problemas con los electrodos individuales de cada celda.

Cuadro 7. Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) promedio para cada lote

Lote	Conductividad eléctrica promedio ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
NC-07A	167
NC-07M	91
C247-07B	109
NC-08A	212
ND-08M	146
C258-08B	105

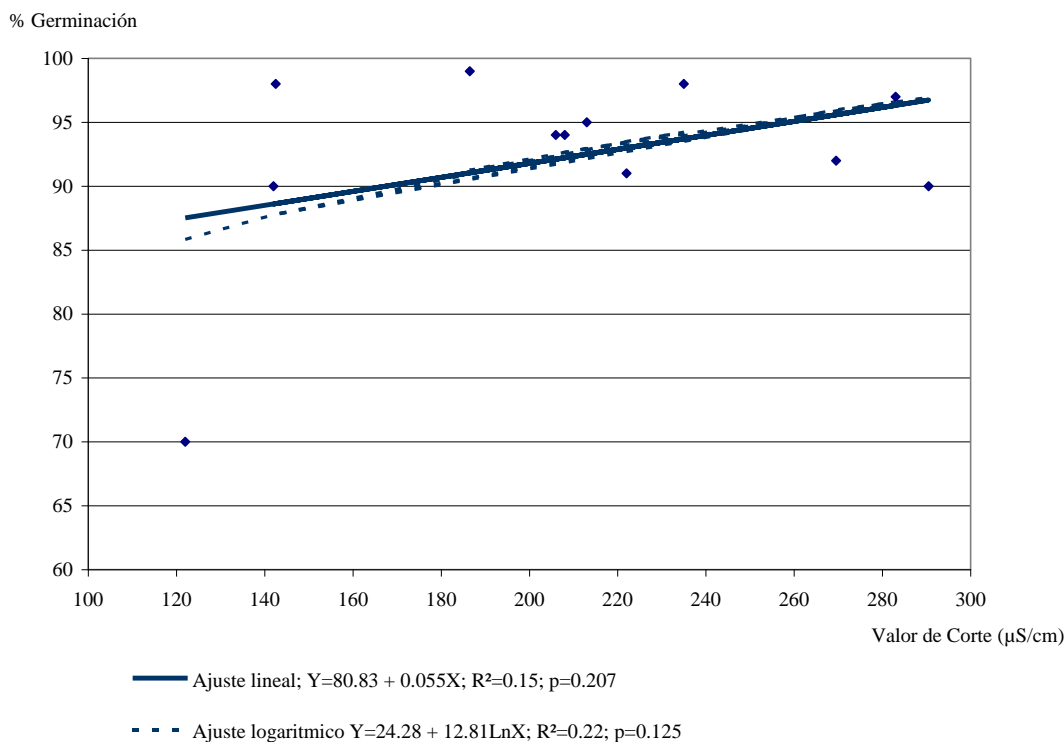
#### 4.2.3.2 Determinación de los valores de corte para poder germinativo

Para la determinación del valor de corte se siguieron las recomendaciones del manual del equipo SAD-9000-S como se explica en el punto 3.2.2.2.

Al graficar el poder germinativo en función del valor de corte observamos que existe una baja relación entre dichos parámetros. La función obtenida es positiva, lo cual contradice el principio básico de la conductividad eléctrica el cual expresa que un valor alto de conductividad nos indica mayor deterioro en las membranas celulares de la semilla y por tanto menor calidad de la semilla respecto a un lote con menor valor de conductividad eléctrica.



Gráfico 4. Porcentaje de germinación en función del valor de corte



Se conoce que los valores de corte son específicos para cada especie, pero existen opiniones de que podría existir especificidad a nivel varietal lo cual haría más complejo aún la utilización de esta metodología. <sup>1</sup>

#### 4.3 CAPACIDAD DE PREDECIR LA EVOLUCIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE VIGOR

Se muestran aquí los resultados de análisis que se realizaron como se indica en el punto 3.3.4. Se presenta en los cuadros 9, 10, 11, 12 y 13 los valores de P y R<sup>2</sup> obtenidos entre los métodos de vigor evaluados y la germinación post-almacenaje medida en rollo y en placas de Petri. También se analizaron los resultados discriminados por el año de las muestras utilizadas. Estos valores no son presentados en este punto, pero pueden encontrarse en el anexo correspondiente.

<sup>1</sup> Craviotto, A. 2009. Com. personal

Previamente, se realizó la comparación entre el poder germinativo inicial y final, evaluados tanto en rollo como grano malteable en placas de Petri.

En el cuadro 8 se presentan los resultados de las germinaciones de los diferentes lotes al inicio del estudio y su germinación final luego de un periodo de almacenamiento y estrés.

Cuadro 8. Resultados de la germinación inicial y posteriores al almacenamiento y estrés (PG final) en rollo y placa de Petri

Lote	Inicial (%)		PG final (%)	
	Rollo	P Petri	Rollo	P Petri
NC-07A	97	99	88	60
NC-07M	91	92	75	50
C247-07B	64	87	46	23
NC-08A	97	99	90	80
ND-08M	91	97	81	69
C258-08B	23	24	1	2

Teniendo en cuenta que el deterioro final fue un estrés menor que el ocasionado en el envejecimiento acelerado, se debe considerar que entre estos ensayos transcurrieron 7 meses, por lo que hubo un periodo donde las semillas envejecieron naturalmente a 20-25°C en bolsas de lienzo y posteriormente se afectó su calidad con un estrés o deterioro final.

Al comparar los cuadros 5 y 8, resulta que el deterioro de las semillas se manifestó principalmente a nivel de las plántulas anormales, esto se observa al comparar PG rollo y PG Petri del deterioro final y del envejecimiento acelerado. Por ejemplo para el lote C247-07B la diferencia es de 23% en el deterioro final y de 3% en el envejecimiento acelerado. Esto se puede deber al periodo transcurrido entre ensayos, expresándose una caída de la germinación en placas de Petri, debido al bajo vigor y a la muerte de semillas que al cabo de la evaluación no germinaron. Esto coincide con lo afirmado por Ferguson, citado por Salinas et al. (2001) donde explica que el deterioro de la semilla se expresa primero por la reducción del vigor y luego por la reducción de plántulas normales, y por último la muerte de las semillas. Por otra parte, las diferencias de plántulas anormales fueron mas importantes para lotes viejos que en los nuevos.

En el cuadro 8, se observa además la necesidad de disponer de un método que permita predecir la evolución en la germinación de los lotes ya que aunque en este estudio cuando la germinación se evaluó en rollo los lotes evolucionaron en relación a su germinación inicial, algo que podría no haber sido así, cuando la germinación se evaluó en placa de Petri existen casos (ej. NC07-A vs NC08-A) donde con similares valores iniciales los valores finales son marcadamente diferentes.

#### 4.3.1. Tetrazolio

El método de tetrazolio presentó altos valores de significancia con respecto a las evaluaciones de germinación final y la transformación logarítmica de los resultados obtenidos. Los valores de regresión son también muy buenos con excepción de la germinación sin transformar medida en placa de Petri, así como su desvío estándar.

Cuadro 9. Ajuste del método Tetrazolio a las diferentes evaluaciones de germinación final

Tetrazolio			
	P	R <sup>2</sup>	$\sigma$
PG rollo	0,0004	0,9606	6,1765
PG Petri	0,0122	0,7816	14,5428
Log PG rollo	0,0003	0,9642	5,8884
Log PG Petri	<,0001	0,9939	2,4233

El tetrazolio se ajustó muy bien cuando la germinación final se evaluó en placas de Petri y fue transformado a su logaritmo, el error de predecir la germinación final fue de  $\pm 2,4$  %. En el caso de las germinaciones finales realizadas en rollo su regresión con el método de tetrazolio como predictor fue buena con y sin transformación, presentando valores intermedios de desvío estándar.

#### 4.3.2. Tetrazolio máximo vigor (Tmaxvigor)

El ajuste del Tmaxvigor respecto a las germinaciones finales presentó niveles de significancia altos (< 1%) para ambos métodos de germinación e independientemente de sus transformaciones. Los valores de ajustes fueron en general altos como se puede observar en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Ajuste del método Tmaxvigor a las diferentes evaluaciones de germinación final

Tmaxvigor			
	P	R <sup>2</sup>	$\sigma$
PG rollo	<0,0001	0,9802	3,7433
PG Petri	0,0075	0,8278	11,0260
Log PG rollo	0,0011	0,9342	6,8168
Log PG Petri	<0,0001	0,9841	3,3474

Al igual que para el método de Tetrazolio, el Tmaxvigor tuvo un buen ajuste al log PG Petri y también para PG rollo. En este sentido se destaca la ventaja de su practicidad ya sea para un estudio de germinación en rollo como en grano malteable en placas de Petri. El error de predecir el vigor es levemente superior que para el caso de Tetrazolio con log PG Petri.

#### 4.3.3. Conductividad eléctrica

El método de conductividad eléctrica presentó valores bajos de significancia en su ajuste a los valores de germinación final lo cual.

Cuadro 11. Ajuste del método conductividad eléctrica a las diferentes evaluaciones de germinación final

CE			
	P	R <sup>2</sup>	$\sigma$
PG rollo	0,2142	0,1905	44,1033
PG Petri	0,1014	0,4113	37,6090
Log PG rollo	0,4180	-0,0387	49,9573
Log PG Petri	0,3097	0,0656	47,3833

Era esperable no encontrar un ajuste satisfactorio de la conductividad eléctrica individual con el vigor ya que tampoco se encontró una relación entre CE y germinación.

Como se explicó anteriormente, el equipo utilizado no permitió obtener resultados satisfactorios. Se considera que debe realizarse otras pruebas para conocer si con otros equipos y evaluaciones es posible ajustar el valor de corte para esta especie y si es posible encontrar una relación con la germinación y/o vigor.

#### 4.3.4. Envejecimiento acelerado evaluado en rollo

Ambos métodos de germinación y sus transformaciones presentaron valores de significancia altos (<1%) en relación a los resultados del envejecimiento acelerado evaluado en rollos. Los niveles de regresión y del desvío estándar fueron más variables entre las diferentes metodologías (Cuadro 13).

Cuadro 12. Ajuste del método envejecimiento acelerado en rollo a las diferentes evaluaciones de germinación final

	REA		
	P	R <sup>2</sup>	$\sigma$
PG rollo	<0,0001	0,9969	1,7923
PG Petri	0,0040	0,8737	11,3889
Log PG rollo	0,0046	0,8643	11,8065
Log PG Petri	0,0008	0,9431	7,6471

El mejor ajuste del envejecimiento acelerado evaluado en rollo fue con el PG rollo para predecir el vigor, algo predecible ya que ambos casos se evalúan las germinaciones de forma similar, especialmente en lo que tiene que ver con la evaluación de las plántulas (normales y anormales). El desvío estándar fue el más bajo si se lo compara con el resto de los métodos de vigor estudiados. Esta combinación de resultados lo posiciona en el método que mejor se ajusta al modelo para predecir el vigor en Cebada.

#### 4.3.5. Envejecimiento acelerado evaluado en placas de Petri

Se observa en el Cuadro 13 buenos valores de significancia en el ajuste del Envejecimiento acelerado medido en placa de Petri y los diferentes métodos de germinación. Los valores de correlación y de desvíos estándares son más variables, siendo en particular estos últimos algo altos en comparación a los otros métodos de vigor evaluados.

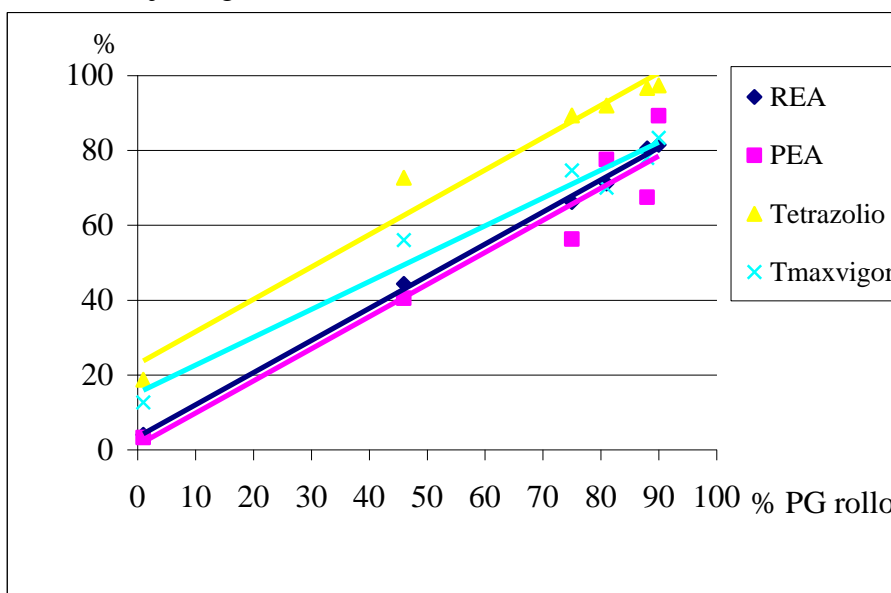
Cuadro 13. Ajuste del método envejecimiento acelerado en placa de Petri a las diferentes evaluaciones de germinación final

PEA			
	P	R <sup>2</sup>	$\sigma$
PG rollo	0,0019	0,9110	9,9025
PG Petri	0,0003	0,9652	6,1885
Log PG rollo	0,0164	0,7481	16,6590
Log PG Petri	0,0038	0,8768	11,6522

El método de envejecimiento acelerado evaluando la germinación como grano malteable (placa de Petri) logra un aceptable ajuste con la germinación final medida en placa de Petri, algo similar a lo que sucedió entre el envejecimiento acelerado medido en rollo y la germinación final en Rollo, pero sus valores son inferiores a los de otros métodos evaluados en este estudio.

En el gráfico 5 se puede visualizar la relación entre los resultados de los diferentes métodos de vigor analizados y la germinación final medida en rollos. Todos los métodos evaluados tuvieron una relación lineal y positiva con la germinación como ya se había presentado en los cuadros anteriores.

Gráfico 5. Porcentaje de germinación final en rollo en función de los métodos de vigor



Si comparamos las gráficas de los diferentes métodos con la línea de ajuste perfecto podemos ver que el Tetrazolio siempre dio valores por encima a esta línea, o sea, estimó valores superiores a los que dieron finalmente. Como elementos positivos se puede indicar que se mantuvo paralelo a la línea de un ajuste perfecto, con baja dispersión de sus valores y que no presentó alteraciones en el ranking respecto a la germinación final en rollo, algo que es sumamente importante en estos análisis. Realizando esta comparación con Tmaxvigor se observa un ajuste muy bueno para los valores de germinación final medios y altos y un comportamiento similar al Tetrazolio en los valores bajos.

Finalmente; se destaca que tanto REA como PEA tienen comportamientos muy similares, pero debe tenerse en cuenta lo indicado anteriormente ya que PEA no tiene ajustes muy satisfactorios y los errores de precisión son altos.

## 5. CONCLUSIONES

Según las condiciones en las que se realizaron los ensayos, se destacan los siguientes resultados más relevantes:

La prueba de conductividad eléctrica individual no permitió encontrar el valor de corte para la especie. Bajo las condiciones dadas, no se puede considerar como buen método para predecir el vigor.

El envejecimiento acelerado evaluado en rollo es el mejor predictor de vigor cuando la germinación final se realiza en rollo, ya sea por su ajuste al modelo (0,9969%) como su menor desvío estándar ( $\pm 1,79\%$ ).

El Tetrazolio Máximo Vigor fue un muy buen predictor de la germinación final en rollo con un ajuste al modelo de 0,9802 y un desvío estándar de  $\pm 3,74\%$ . Este método presenta como ventaja, respecto al Envejecimiento acelerado, su rapidez y su simplicidad en comparación al Tetrazolio normal.

El método de Tetrazolio es buen predictor de vigor cuando la germinación final se realiza en placas de Petri y es transformado a su logaritmo. El ajuste al modelo es de 0,9939 y el desvío estándar es de  $\pm 2,42\%$ .

El Tetrazolio Máximo Vigor puede considerarse un método alternativo cuando la germinación se realiza en placas de Petri y sus valores son transformados logarítmicamente ( $r^2 = 0,98$  y desvío estándar =  $3,347\%$ ).



## 6. RESUMEN

En Uruguay se produce anualmente unas 400.000 toneladas de Cebada, destinándose el 90% a la producción de malta. Es importante para la industria predecir la evolución de la capacidad germinativa de cada lote, para tomar decisiones sobre el malteo. El objetivo del trabajo fue evaluar tres métodos de vigor descritos por la International Seed Testing Association para predecir la evolución del poder germinativo de los lotes durante el almacenamiento. Se evaluó: conductividad eléctrica individual (equipo SAD-9000-S), envejecimiento acelerado evaluado por germinación en rollo (REA) y en placas de Petri con 4 ml de agua (PEA) y prueba topográfica por tetrazolio evaluado como semillas viables sin defectos y con defectos moderados (Tetrazolio), y viables sin defectos (Tmaxvigor). Los lotes fueron sometidos a condiciones de stress homogéneas buscando acortar los tiempos biológicos necesarios para conocer el deterioro durante el almacenaje. En el año 2009 se analizaron seis lotes de distintos cultivares, clasificados según el poder germinativo y año de cosecha. Se estudió la relación entre los valores finales de germinación y cada método de vigor mediante análisis de regresiones ( $p < 0,05$ ). Los resultados mostraron una baja capacidad predictiva del método de conductividad eléctrica individual para estimar la evolución del poder germinativo. El envejecimiento acelerado evaluado en rollo es el mejor predictor de vigor cuando se lo quiere evaluar. El segundo método es el tetrazolio cuando se evalúa la germinación final en placas de Petri y se transforma a su logaritmo. El Tetrazolio Máximo Vigor se presenta como una interesante alternativa para ambas formas de medir la germinación final de los lotes.

Palabras clave: Cebada; Vigor; Conductividad eléctrica; Tetrazolio; Envejecimiento acelerado.

## 7. SUMMARY

Uruguay produces annually 400,000 tons of barley and nearly 90% of this production is targeted to the malting process. In order to improve decision making, it is a key step for the malting industry to efficiently predict the progression of the germination potential of each batch. The aim of this work was to evaluate three different methods, described by the International Seed Testing Association and traditionally used to determine seed vigor, to predict the evolution of the germination potential during storage of seed lots. These methods were: 1) Individual electrical conductivity; 2) Accelerated aging, evaluated both as germination following ISTA rules and in Petri dish with 4 ml of water); 3) Tetrazolium test, where seeds were sorted in two ways: viable without any deficiency (Tmaxvigor) and viable with moderate defects. Lots were subjected to homogeneous stress conditions in order to simulate usual deterioration during storage. In 2009, six seed lots from different cultivars were classified according to germination rate and harvest year and then analyzed. The relationship between the final germination percentages and each seed vigor method was studied by regression analysis ( $p < 0.05$ ). Results showed that accelerated aging, evaluated as roll germination is the best predictor for seed vigor. The tetrazolium method, when evaluating final germination percentage in Petri dishes and transformed to its logarithm, was the second best predictor. Individual electrical conductivity, however, was a poor predictor to estimate the evolution of the germination potential. The Tetrazolium maximum Vigor method is regarded here as a promising alternative to measure both ways of final germination of lots.

Keywords: Barley; Vigor; Electrical conductivity; Tetrazolium; Accelerated aging.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. ABELEDO, C. 2006. Programas de investigación orientados a la resolución de problemas; el caso de la mesa de la cebada en Uruguay. (en línea). Bernal Este, Universidad Nacional de Quilmes. pp. 129-150. Consultado ene. 2009. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/907/90702305.pdf>
2. ANDRÉ TILLMAN, Ma. Á. 2004. Análisis de semillas; módulo 7. In: Curso de Especialización en Ciencia y Tecnología de Semillas por Tutoría a Distancia (2º., 2003, Montevideo, Uruguay). Módulos. Montevideo, s.e. pp. 6-73
3. ARIAS, G. 1991. Calidad industrial de la cebada cervecera. Montevideo, INIA. 54 p. (Serie Técnica no. 18)
4. ASSOCIATION OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA). 1983. Seed vigor testing handbook. s.l. pp. 65-68 (Contribution no. 32).
5. BEKENDAM, J.; GROB, R. 1980. Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación. Madrid, España, Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Estación de Ensayo de Semillas. pp. 4-19.
6. BENECH-ARNOLD, R.L.; GUALANO, N.; LEYMARIE, J.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. 2006. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increase ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 57(6): 1423–1430. Consultado set. 2010. Disponible en <http://jxb.oxfordjournals.org>
7. CASARETTO, J. 2004. Estudio de proteínas 14-3-3 como reguladores de señales hormonales durante la desecación y germinación de semillas de cebada. (en línea). Talca, Universidad de Talca. s.p. Consultado may. 2009. Disponible en <http://biologia.otalca.cl/casaretto.html>
8. CORREA VELÁSQUEZ, J. 2002. Fisiología de semillas y plántulas. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. pp. 55-81
9. CRAVIOTTO, A.; ARANGO, M. R.; FARED, M. 2008. Análisis de semillas; factores que influyen en la medición de la conductividad eléctrica de

- semillas individuales con el analizador automático de semillas SAD 2007. *Análisis de Semillas*. 2 (6): 68-73.
10. CRAVIOTTO, R.M.; ARANGO, M.R. 2006. Simiente de trigo; una nueva herramienta en gestión de calidad. *Revista Técnica de AAPRESID*. abr.: 152-153.
  11. DELLA MEA, J. C. 1991. Determinación del vigor de la cebada almacenada por el método de envejecimiento acelerado. Paysandú, CYMPAY. s.p.
  12. FANAN, S.; FRATIN MEDINA, P.; COSTA LIMA, T.; FILHO, J.M. 2006. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. *Revista Brasileira de Sementes*. 28 (2): 152-158.
  13. GONZALEZ, S.; ROSSI, C.; VAZQUEZ, D. 2008. Pre-germinado en Trigo, un problema de la presente cosecha; detección y consecuencias. (en línea). La Estanzuela, INIA. s.p. Consultado 10 may. 2009. Disponible en [http://www.inia.org.uy/estaciones/la\\_estanzuela/actividades/documentos/semillasweb.pdf](http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/documentos/semillasweb.pdf)
  14. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1987. Handbook of vigour test methods. 2<sup>nd</sup>. ed. Zurich, Switzerland. pp. 37-48.
  15. \_\_\_\_\_. 2003. ISTA working sheets on tetrazolium testing. Zurich, Switzerland. s.p.
  16. \_\_\_\_\_. 2009. International rules for seed testing. Zurich, Switzerland. cap. 5, pp. 1-75
  17. KERMODE, A. R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. (en línea). *Journal of Plant Growth Regulation*. 24: 319-344. Consultado jun. 2010. Disponible en <http://www.springerlink.com/content/p524m0x124700604/fulltext.pdf>
  18. MARCOS-FILHO, J. 1998. New approaches to seed vigor testing. *Scientific Agriculture*. (Piracicaba). 55 (Número especial): 27-33.
  19. MURCIA, M.; PERETTI, A.; SAN MARTINO, S.; PEREYRA, V. 2001. Vigor de semillas y emergencia a campo de girasol (*Helianthus annuus* L.) en siembras anticipadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). (en línea). *Revista Brasileira de Sementes*. 23 (2): 263-267. Consultado dic. 2008. Disponible en <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2001/v23n2/artigo36.pdf>

20. \_\_\_\_\_. 2004. Relación entre conductividad eléctrica individual y ensayo topográfico de tetrazolio en semillas de soja (*Glycine max* L. Merrill). (en línea). Buenos Aires, INTA. Unidad Integrada Balcarce/ Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado dic. 2008. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/posters/25/Murcial-bis.htm>
21. NARIMANOV, A.; KORYSTOV, Y. 1998. The mechanism responsible for the increase of barley seed germination rate in the presence of hydrogen peroxide after excessive wetting. *Biology of Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 25 (1): 93-96. (Tomado de *Field Crops Abstracts*. 51 (12): 8899-1998)
22. PERETTI, A. 1994. Manual para el análisis de semillas. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 73-222.
23. ROSENGURTT, B.; DEL PUERTO, O.; ARRILLAGA DE MAFFEI, B.; LOMBARDO, A.; GRUN, S. 1997. Gramíneas. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 20-80.
24. RUSSI, D.; BARTOSIK, R.; RODRIGUEZ, J.; PERETTI, A. 2007. Adaptación del test de tetrazolio para la detección rápida de daño en la calidad del trigo por altas temperaturas durante el secado. In: Congreso Argentino de Ingeniería Rural (9°), Congreso de Ingeniería del MERCOSUR (1°, 2007, Córdoba, Argentina). Trabajos presentados. Córdoba, Argentina, s.e. s.p.
25. SALINAS, A.R.; YOLDJIAN, A.M.; CRAVIOTTO, R.M.; BISARO, V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. (en línea). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36(2):1-7. Consultado dic. 2008. Disponible en [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2001000200022&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2001000200022&script=sci_arttext&tlng=en)
26. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES ECONÓMICAS AGROPECUARIAS. 2008. Anuario estadístico agropecuario. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado mar. 2009. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,41,O,S,0,MNU;E:27;1;MNU;>
27. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2009. Anuario estadístico agropecuario. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado oct. 2010. Disponible en

<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,85,O,S,0,MNU;E;27;5;MNU;>

28. \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ . 2010. Anuario estadístico agropecuario. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado nov. 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,352,O,S,0,MNU;E;27;6;MNU>
29. VISSER K.; VISSER A.; CAGIRGAN M.; KIJNE J y WANG M. 1996. Rapid germination of barley mutant is correlated whit a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo. Plant Physiology. 111: 1127-1133.

## 9. ANEXOS

## 9.1 RESULTADOS DE GERMINACIONES INICIALES

Cuadro 1. Porcentaje de germinación inicial del lote NC-07A en placas de Petri y en rollo

NC-07A		Fecha de inicio 16 junio			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	88	12		<b>100</b>	
Placa 2	86	12	0	<b>98</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	94	1	4	1	<b>95</b>
Rollo 2	97	2	0	1	<b>99</b>

Cuadro 2. Porcentaje de germinación inicial del lote NC-07M en placas de Petri y en rollo

NC-07M		Fecha de inicio 16 junio			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	79	11	1	<b>91</b>	
Placa 2	67	20	6	<b>93</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	89	1	3	7	<b>90</b>
Rollo 2	88	3	2	7	<b>91</b>

Cuadro 3. Porcentaje de germinación inicial del lote C247-07B en placas de Petri y en rollo

C247-07B		Fecha de inicio 16 junio			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	62	23	0	<b>85</b>	
Placa 2	66	20	2	<b>88</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	65	1	15	19	<b>66</b>
Rollo 2	61	0	11	28	<b>61</b>

Cuadro 4. Porcentaje de germinación inicial del lote NC-08A en placas de Petri y en rollo

NC-08A		Fecha de inicio 16 junio			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	67	32	1	<b>100</b>	
Placa 2	62	34	2	<b>98</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	97	1	2	0	<b>98</b>
Rollo 2	92	3	2	3	<b>95</b>



Cuadro 5. Porcentaje de germinación inicial del lote ND-08A en placas de Petri y en rolo

ND-08M		Fecha de inicio 16 junio			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		56	42	0	<b>98</b>
Placa 2		37	57	1	<b>95</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	91	2	4	3	<b>93</b>
Rollo 2	85	3	10	2	<b>88</b>

Cuadro 6. Porcentaje de germinación inicial del lote C258-08B en placas de Petri y en rolo

C258-08B		Fecha de inicio 16 junio			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		5	8	8	<b>21</b>
Placa 2		7	13	6	<b>26</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	15	7	9	69	<b>22</b>
Rollo 2	17	6	7	70	<b>23</b>

## 9.2 RESULTADOS DE LAS GERMINACIONES LUEGO DEL ENVEJECIMIENTO ACELERADO

### 9.2.1 Bloque 1 (EA1)

Cuadro 7. Porcentaje de germinación del EA1 del lote NC-07A en placas de Petri y en rollo

NC-07A		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	66	13	6	15	<b>79</b>
Rollo 2	72	9	5	14	<b>81</b>

Cuadro 8. Porcentaje de germinación del EA1 del lote NC-07M en placas de Petri y en rollo

NC-07M		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	64	6	5	25	<b>70</b>
Rollo 2	58	10	7	25	<b>68</b>

Cuadro 9. Porcentaje de germinación del EA1 del lote C247-07B en placas de Petri y en rolo

C247-07B		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	29	14	11	46	<b>43</b>
Rollo 2	36	12	12	40	<b>48</b>

Cuadro 10. Porcentaje de germinación del EA1 del lote NC-08A en placas de Petri y en rolo

NC-08A		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	78	9	6	7	<b>87</b>
Rollo 2	80	1	7	12	<b>81</b>

Cuadro 11. Porcentaje de germinación del EA1 del lote ND-08M en placas de Petri y en rollo

ND-08M		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	49	13	13	25	<b>62</b>
Rollo 2	55	13	9	23	<b>68</b>

Cuadro 12. Porcentaje de germinación del EA1 del lote C258-08B en placas de Petri y en rollo

C258-08B		Fecha de inicio 12 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1					
Placa 2					
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	5	0	0	95	<b>5</b>
Rollo 2	4	2	1	93	<b>6</b>

9.2.2. Bloque 2 (EA2)

Cuadro 13. Porcentaje de germinación del EA2 del lote NC-07A en placas de Petri y en rollo

NC-07A		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	20	28	14	<b>62</b>	
Placa 2	22	43	12	<b>77</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	75	8	5	12	<b>83</b>
Rollo 2	70	8	5	17	<b>78</b>

Cuadro 14. Porcentaje de germinación del EA2 del lote NC-07M en placas de Petri y en rollo

NC-07M		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	27	28	5	<b>60</b>	
Placa 2	27	29	4	<b>60</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	59	4	9	28	<b>63</b>
Rollo 2	60	6	6	28	<b>66</b>

Cuadro 15. Porcentaje de germinación del EA2 del lote C247-07B en placas de Petri y en rollo

C247-07B		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	4	33	5	<b>42</b>	
Placa 2	7	29	5	<b>41</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	37	7	8	48	<b>44</b>
Rollo 2	40	5	7	48	<b>45</b>

Cuadro 16. Porcentaje de germinación del EA2 del lote NC-08A en placas de Petri y en rollo

NC-08A		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	45	44	1	<b>90</b>	
Placa 2	45	37	5	<b>87</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	81	2	11	6	<b>83</b>
Rollo 2	77	3	6	14	<b>80</b>

Cuadro 17. Porcentaje de germinación del EA2 del lote ND-08M en placas de Petri y en rollo

ND-08M		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		12	59	12	<b>83</b>
Placa 2		9	61	5	<b>75</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	69	6	17	8	<b>75</b>
Rollo 2	51	8	18	23	<b>59</b>

Cuadro 18. Porcentaje de germinación del EA2 del lote C258-08B en placas de Petri y en rollo

C258-08B		Fecha de inicio 15 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		1	1	0	<b>2</b>
Placa 2		2	1	1	<b>4</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	3	3	1	93	<b>6</b>
Rollo 2	1	0	2	97	<b>1</b>

9.2.3. Bloque 3 (EA3)

Cuadro 19. Porcentaje de germinación del EA3 del lote NC-07A en placas de Petri y en rollo

NC-07A		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	24	28	14	<b>66</b>	
Placa 2	25	35	5	<b>65</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	73	6	5	16	<b>79</b>
Rollo 2	75	8	4	13	<b>83</b>

Cuadro 20. Porcentaje de germinación del EA3 del lote NC-07M en placas de Petri y en rollo

NC-07M		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	7	30	15	<b>52</b>	
Placa 2	13	30	10	<b>53</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	65	5	5	25	<b>70</b>
Rollo 2	53	7	6	34	<b>60</b>



Cuadro 21. Porcentaje de germinación del EA3 del lote C247-07B en placas de Petri y en rollo

C247-07B		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	5	30	6	<b>41</b>	
Placa 2	5	17	16	<b>38</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	39	3	8	50	<b>42</b>
Rollo 2	35	9	9	47	<b>44</b>

Cuadro 22. Porcentaje de germinación del EA3 del lote NC-08A en placas de Petri y en rollo

NC-08A		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
	Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>	
Placa 1	66	20	3	<b>89</b>	
Placa 2	63	25	3	<b>91</b>	
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	79	2	6	13	<b>81</b>
Rollo 2	77	0	8	15	<b>77</b>

Cuadro 23. Porcentaje de germinación del EA3 del lote ND-08M en placas de Petri y en rollo

ND-08M		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		12	48	17	<b>77</b>
Placa 2		9	49	17	<b>75</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	74	8	9	9	<b>82</b>
Rollo 2	70	11	11	8	<b>81</b>

Cuadro 24. Porcentaje de germinación del EA3 del lote C258-08B en placas de Petri y en rollo

C258-08B		Fecha de inicio 18 de Junio de 2009			
		Petri 24 hs	Petri 48 hs	Petri 72 hs	<b>Total</b>
Placa 1		2	1	2	<b>5</b>
Placa 2		0	2	0	<b>2</b>
	1° Conteo	2° Recuento			Total normales
	Normales	Normales	Anormales	Muertas	
Rollo 1	1	1	0	98	<b>2</b>
Rollo 2	2	2	0	96	<b>4</b>

9.3 RESULTADOS DE CONDUCTIVIDAD DE LOS LOTES UTILIZADOS PARA ESTIMAR EL TIEMPO (PERIODO) DE LIXIVIACIÓN

Cuadro 25. Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) eléctrica de las repeticiones (Rep) para el lote de 70% de germinación

Lote de 70%					
Rep 1			Rep 2		
Tiempo	valor	desvio	Tiempo	valor	desvio
2	42,10	15,42	2	35,00	16,32
4	65,01	18,97	4	54,45	20,40
6	80,47	22,90	6	68,07	22,38
8	87,67	24,50	8	76,85	25,58
10	98,99	27,99	10	85,25	28,35
12	102,74	29,87	12	90,88	31,39
14	sd	sd	14	sd	sd
16	115,90	36,10	16	101,20	36,60
18	115,34	37,84	18	104,29	38,87
20	122,58	42,17	20	106,62	40,38
22	120,44	42,91	22	108,36	41,43
24	125,34	45,93	24	111,39	43,69

Cuadro 26. Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) eléctrica de las repeticiones (Rep) para el lote de 98% de germinación

Lote de 98%					
Rep 1			Rep 2		
Tiempo	valor	desvio	Tiempo	valor	desvio
2	31,16	14,88	2	21,61	13,55
4	44,63	20,89	4	36,98	19,36
6	51,26	22,05	6	46,89	22,47
8	57,42	24,06	8	52,37	24,57
10	63,22	24,74	10	57,29	25,5
12	68,00	26,62	12	62,11	27,35
14	68,94	26,60	14	64,92	27,69
16	69,80	27,21	16	68,24	28,74
18	72,82	28,90	18	71,44	30,62
20	71,87	28,55	20	72,87	30,95
22	75,33	29,15	22	75,37	32,02
24	73,35	28,18	24	75,75	32,13

Cuadro 27. Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) promedio obtenido para cada lote

Lote	conductividad eléctrica promedio	
	Rep 1	Rep 2
NC-07A	167,99	165,67
NC-07M	93,24	88,44
C247-07B	115,90	101,20
NC-08A	212,40	210,69
ND-08M	147,82	144,67
C258-08B	106,30	104,00

## 9.4 RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL MÉTODO DE TETRAZOLIO

Cuadro 28. Resultados del Tetrazolio para el lote NC-07A

NC-07A	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	43	<b>86</b>	6	<b>12</b>	0	<b>0</b>	1	<b>2</b>
rep 2	03/06/2009	38	<b>72</b>	11	<b>22</b>	0	<b>0</b>	1	<b>2</b>
rep 3	09/06/2009	38	<b>76</b>	11	<b>22</b>	0	<b>0</b>	1	<b>2</b>
Promedio		39,67	78,00	9,33	18,67	0,00	0,00	1,00	2,00
<b>Total</b>		96,67							

Cuadro 29. Resultados del Tetrazolio para el lote NC-07M

NC-07M	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	40	<b>80</b>	5	<b>10</b>	3	<b>6</b>	2	<b>4</b>
rep 2	03/06/2009	31	<b>62</b>	10	<b>20</b>	4	<b>8</b>	5	<b>10</b>
rep 3	09/06/2009	41	<b>82</b>	7	<b>14</b>	0	<b>0</b>	2	<b>4</b>
Promedio		37,33	74,67	7,33	14,67	2,33	4,67	3,00	6,00
<b>Total</b>		89,33							

Cuadro 30. Resultados del Tetrazolio para el lote C247-07B

C247-07B	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	24	<b>48</b>	10	<b>20</b>	6	<b>12</b>	10	<b>20</b>
rep 2	03/06/2009	30	<b>60</b>	7	<b>14</b>	1	<b>2</b>	12	<b>24</b>
rep 3	09/06/2009	30	<b>60</b>	8	<b>16</b>	3	<b>6</b>	9	<b>18</b>
Promedio		28,00	56,00	8,33	16,67	3,33	6,67	10,33	20,67
<b>Total</b>		72,67							

Cuadro 31. Resultados del Tetrazolio para el lote C258-08B

C258-08B	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	7	<b>14</b>	3	<b>6</b>	10	<b>20</b>	30	<b>60</b>
rep 2	03/06/2009	7	<b>14</b>	0	<b>0</b>	7	<b>14</b>	36	<b>72</b>
rep 3	09/06/2009	5	<b>10</b>	6	<b>12</b>	9	<b>18</b>	30	<b>60</b>
Promedio		6,33	12,67	3,00	6,00	8,67	17,33	32,00	64,00
<b>Total</b>		18,67							

Cuadro 32. Resultados del Tetrazolio para el lote NC-08A

NC-08A	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	42	<b>84</b>	7	<b>14</b>	0	<b>0</b>	1	<b>2</b>
rep 2	03/06/2009	42	<b>82</b>	7	<b>14</b>	0	<b>0</b>	1	<b>2</b>
rep 3	09/06/2009	42	<b>84</b>	7	<b>14</b>	1	<b>2</b>	0	<b>0</b>
Promedio		42,00	83,33	7,00	14,00	0,33	0,67	0,67	1,33
<b>Total</b>		97,33							

Cuadro 33. Resultados del Tetrazolio para el lote ND-08M

ND-08M	Fecha	Viables sin defectos		Viables defectos moderados		Viables defectos severos		No viables	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
rep 1	01/06/2009	36	<b>72</b>	10	<b>20</b>	4	<b>8</b>	0	<b>0</b>
rep 2	03/06/2009	33	<b>66</b>	11	<b>22</b>	5	<b>10</b>	1	<b>2</b>
rep 3	09/06/2009	36	<b>72</b>	12	<b>24</b>	2	<b>4</b>	0	<b>0</b>
Promedio		35,00	70,00	11,00	22,00	3,67	7,33	0,33	0,67
<b>Total</b>		92,00							

## 9.5 RESULTADOS DE LA GERMINACIÓN FINAL (PG)

Cuadro 34. Germinación luego de un stress general

	PG rollos			PG Petri
	Normales	Anormales	Muertas	
rep 1	70	14	16	52
rep 2	80	10	10	48
rep 1	79	12	9	68
rep 2	83	9	8	70
rep 1	88	0	12	80
rep 2	92	0	8	79
rep 1	86	4	10	61
rep 2	90	2	8	59
rep 1	48	50	2	20
rep 2	44	53	3	26
rep 1	1	99	0	1
rep 2	1	99	0	2

## 9.6 AJUSTES DE CADA MÉTODO DE VIGOR CON LA GERMINACIÓN FINAL

Cuadro 35. Ajustes de cada método de vigor con la germinación final

Germinación final	Año	Tetrazolio		Tmaxvigor		CE		REA		PEA	
		P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
caída de PG rollo		0,0276	0,6770	0,0216	0,7127	0,0296	0,6658	0,0105	0,7965	0,0028	0,8943
log caída PG rollo		0,0630	0,5250	0,0490	0,5769	0,0095	0,8064	0,0294	0,6672	0,0089	0,8127
caída PG Petri		0,7945	-0,2262	0,8816	-0,2422	0,3094	0,0660	0,9981	-0,2500	0,7729	-0,2209
log caída PG Petri		0,7162	-0,2041	0,8050	-0,2286	0,2757	0,1058	0,9112	-0,2456	0,8208	-0,2320
PG rollo		0,0004	0,9606	<,0001	0,9802	0,2142	0,1905	<,0001	0,9969	0,0019	0,9110
log PG rollo		0,0003	0,9642	0,0011	0,9342	0,4180	-0,0387	0,0046	0,8643	0,0164	0,7481
PG Petri		0,0122	0,7816	0,0075	0,8278	0,1014	0,4113	0,0040	0,8737	0,0003	0,9652
log PG Petri		<,0001	0,9939	<,0001	0,9841	0,3097	0,0656	0,0008	0,9431	0,0038	0,8768
caída de PG rollo	2007	0,2722	0,6561	0,3615	0,4216	0,2874	0,6193	0,2647	0,6737	0,2499	0,7073
log caída PG rollo	2007	0,3071	0,5697	0,3963	0,3200	0,2526	0,7014	0,2996	0,5889	0,2848	0,6258
caída PG Petri	2007	0,1784	0,8471	0,0891	0,9611	0,7380	-0,6800	0,1859	0,8343	0,2007	0,8078
log caída PG Petri	2007	0,1599	0,8765	0,0706	0,9755	0,7195	-0,6362	0,1674	0,8649	0,1822	0,8407
PG rollo	2007	0,0545	0,9854	0,0348	0,9940	0,6141	-0,3508	0,0620	0,9811	0,0768	0,9711
log PG rollo	2007	0,0980	0,9530	0,0087	0,9996	0,6576	-0,4752	0,1055	0,9456	0,1203	0,9295
PG Petri	2007	0,0817	0,9672	0,0075	0,9997	0,6414	-0,4296	0,0892	0,9610	0,1040	0,9471
log PG Petri	2007	0,1354	0,9109	0,0461	0,9895	0,6950	-0,5751	0,1429	0,9009	0,1577	0,8798
caída de PG rollo	2008	0,0999	0,9512	0,0464	0,9894	0,3076	0,5683	0,0427	0,9910	0,0406	0,9919
log caída PG rollo	2008	0,1798	0,8447	0,1263	0,9223	0,2277	0,7548	0,1226	0,9268	0,1205	0,9292
caída PG Petri	2008	0,8854	-0,9359	0,9389	-0,9816	0,7071	-0,6056	0,9426	-0,9838	0,9447	-0,9849
log caída PG Petri	2008	0,9126	-0,9625	0,9661	-0,9943	0,6799	-0,5355	0,9698	-0,9955	0,9719	-0,9961
PG rollo	2008	0,0374	0,9931	0,0160	0,9987	0,3701	0,3969	0,0198	0,9981	0,0219	0,9976
log PG rollo	2008	0,0081	0,9997	0,0615	0,9814	0,4156	0,2621	0,0653	0,9790	0,0674	0,9777
PG Petri	2008	0,0580	0,9834	0,0046	0,9999	0,3495	0,4554	0,0020	1,0000	0,0020	1,0000
log PG Petri	2008	0,0020	1,0000	0,0546	0,9853	0,4086	0,2831	0,0583	0,9832	0,0604	0,9821

Cuadro 36. Valores del registrador de temperatura y humedad relativa durante el envejecimiento acelerado

12/06/09 10:27:01 PM,C,41.205	12/06/09 10:27:01 PM,%RH,90.716
12/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	12/06/09 11:27:01 PM,%RH,92.266
13/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 12:27:01 AM,%RH,93.804
13/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 01:27:01 AM,%RH,94.313
13/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 02:27:01 AM,%RH,94.821
13/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 03:27:01 AM,%RH,94.313
13/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.328
13/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 05:27:01 AM,%RH,94.313
13/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 06:27:01 AM,%RH,95.328
13/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 07:27:01 AM,%RH,94.821
13/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 08:27:01 AM,%RH,95.832
13/06/09 09:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 09:27:01 AM,%RH,95.832
13/06/09 10:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 10:27:01 AM,%RH,94.821
13/06/09 11:27:01 AM,C,41.703	13/06/09 11:27:01 AM,%RH,95.328



13/06/09 12:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 12:27:01 PM,%RH,95.328
13/06/09 01:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 01:27:01 PM,%RH,95.832
13/06/09 02:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 02:27:01 PM,%RH,95.328
13/06/09 03:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 03:27:01 PM,%RH,94.821
13/06/09 04:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 04:27:01 PM,%RH,94.821
13/06/09 05:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 05:27:01 PM,%RH,95.832
13/06/09 06:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 06:27:01 PM,%RH,94.313
13/06/09 07:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 07:27:01 PM,%RH,95.832
13/06/09 08:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 08:27:01 PM,%RH,96.838
13/06/09 09:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 09:27:01 PM,%RH,94.821
13/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 10:27:01 PM,%RH,96.838
13/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	13/06/09 11:27:01 PM,%RH,96.838
14/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 12:27:01 AM,%RH,95.328
14/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 01:27:01 AM,%RH,95.832
14/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 02:27:01 AM,%RH,94.821
14/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 03:27:01 AM,%RH,94.821
14/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.328
14/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 05:27:01 AM,%RH,94.821
14/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 06:27:01 AM,%RH,97.338
14/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 07:27:01 AM,%RH,94.821
14/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 08:27:01 AM,%RH,94.821
14/06/09 09:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 09:27:01 AM,%RH,96.336
14/06/09 10:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 10:27:01 AM,%RH,96.336
14/06/09 11:27:01 AM,C,41.703	14/06/09 11:27:01 AM,%RH,95.832
14/06/09 12:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 12:27:01 PM,%RH,95.328
14/06/09 01:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 01:27:01 PM,%RH,94.821
14/06/09 02:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 02:27:01 PM,%RH,96.838
14/06/09 03:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 03:27:01 PM,%RH,95.832
14/06/09 04:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 04:27:01 PM,%RH,96.838
14/06/09 05:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 05:27:01 PM,%RH,95.328
14/06/09 06:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 06:27:01 PM,%RH,95.328
14/06/09 07:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 07:27:01 PM,%RH,94.821
14/06/09 08:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 08:27:01 PM,%RH,94.821
14/06/09 09:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 09:27:01 PM,%RH,96.838
14/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 10:27:01 PM,%RH,95.328
14/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	14/06/09 11:27:01 PM,%RH,95.328

15/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 12:27:01 AM,%RH,97.338
15/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 01:27:01 AM,%RH,96.336
15/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 02:27:01 AM,%RH,94.821
15/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 03:27:01 AM,%RH,96.336
15/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 04:27:01 AM,%RH,97.338
15/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 05:27:01 AM,%RH,95.832
15/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 06:27:01 AM,%RH,95.832
15/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 07:27:01 AM,%RH,95.832
15/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	15/06/09 08:27:01 AM,%RH,94.313
15/06/09 09:27:01 AM,C,25.242	15/06/09 09:27:01 AM,%RH,93.804
15/06/09 10:27:01 AM,C,19.237	15/06/09 10:27:01 AM,%RH,65.827
15/06/09 11:27:01 AM,C,20.739	15/06/09 11:27:01 AM,%RH,61.083
15/06/09 12:27:01 PM,C,21.24	15/06/09 12:27:01 PM,%RH,59.882
15/06/09 01:27:01 PM,C,20.239	15/06/09 01:27:01 PM,%RH,66.998
15/06/09 02:27:01 PM,C,19.738	15/06/09 02:27:01 PM,%RH,68.743
15/06/09 03:27:01 PM,C,19.237	15/06/09 03:27:01 PM,%RH,71.048
15/06/09 04:27:01 PM,C,20.739	15/06/09 04:27:01 PM,%RH,71.048
15/06/09 05:27:01 PM,C,20.739	15/06/09 05:27:01 PM,%RH,71.048
15/06/09 06:27:01 PM,C,18.235	15/06/09 06:27:01 PM,%RH,71.048
15/06/09 07:27:01 PM,C,16.732	15/06/09 07:27:01 PM,%RH,72.762
15/06/09 08:27:01 PM,C,18.235	15/06/09 08:27:01 PM,%RH,72.762
15/06/09 09:27:01 PM,C,36.723	15/06/09 09:27:01 PM,%RH,95.328
15/06/09 10:27:01 PM,C,41.205	15/06/09 10:27:01 PM,%RH,91.751
15/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	15/06/09 11:27:01 PM,%RH,93.293
16/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 12:27:01 AM,%RH,94.313
16/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 01:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 02:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 03:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 05:27:01 AM,%RH,94.821
16/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 06:27:01 AM,%RH,95.832
16/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 07:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 08:27:01 AM,%RH,95.328
16/06/09 09:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 09:27:01 AM,%RH,94.821
16/06/09 10:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 10:27:01 AM,%RH,94.821
16/06/09 11:27:01 AM,C,41.703	16/06/09 11:27:01 AM,%RH,96.336

16/06/09 12:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 12:27:01 PM,%RH,96.336
16/06/09 01:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 01:27:01 PM,%RH,95.328
16/06/09 02:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 02:27:01 PM,%RH,96.336
16/06/09 03:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 03:27:01 PM,%RH,96.336
16/06/09 04:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 04:27:01 PM,%RH,95.832
16/06/09 05:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 05:27:01 PM,%RH,95.832
16/06/09 06:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 06:27:01 PM,%RH,94.313
16/06/09 07:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 07:27:01 PM,%RH,95.328
16/06/09 08:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 08:27:01 PM,%RH,96.336
16/06/09 09:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 09:27:01 PM,%RH,95.832
16/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 10:27:01 PM,%RH,95.832
16/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	16/06/09 11:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 12:27:01 AM,%RH,95.328
17/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 01:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 02:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 03:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 05:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 06:27:01 AM,%RH,96.336
17/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 07:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 08:27:01 AM,%RH,96.336
17/06/09 09:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 09:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 10:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 10:27:01 AM,%RH,95.832
17/06/09 11:27:01 AM,C,41.703	17/06/09 11:27:01 AM,%RH,94.821
17/06/09 12:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 12:27:01 PM,%RH,95.328
17/06/09 01:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 01:27:01 PM,%RH,95.832
17/06/09 02:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 02:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 03:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 03:27:01 PM,%RH,96.838
17/06/09 04:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 04:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 05:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 05:27:01 PM,%RH,95.832
17/06/09 06:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 06:27:01 PM,%RH,95.832
17/06/09 07:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 07:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 08:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 08:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 09:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 09:27:01 PM,%RH,95.832
17/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 10:27:01 PM,%RH,96.336
17/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	17/06/09 11:27:01 PM,%RH,95.832

18/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 12:27:01 AM,%RH,96.336
18/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 01:27:01 AM,%RH,95.328
18/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 02:27:01 AM,%RH,96.336
18/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 03:27:01 AM,%RH,95.832
18/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.328
18/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 05:27:01 AM,%RH,96.336
18/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 06:27:01 AM,%RH,95.832
18/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 07:27:01 AM,%RH,95.328
18/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	18/06/09 08:27:01 AM,%RH,96.838
18/06/09 09:27:01 AM,C,20.239	18/06/09 09:27:01 AM,%RH,98.83
18/06/09 10:27:01 AM,C,20.739	18/06/09 10:27:01 AM,%RH,83.299
18/06/09 11:27:01 AM,C,20.739	18/06/09 11:27:01 AM,%RH,76.148
18/06/09 12:27:01 PM,C,18.736	18/06/09 12:27:01 PM,%RH,76.707
18/06/09 01:27:01 PM,C,18.736	18/06/09 01:27:01 PM,%RH,78.929
18/06/09 02:27:01 PM,C,19.738	18/06/09 02:27:01 PM,%RH,78.376
18/06/09 03:27:01 PM,C,18.235	18/06/09 03:27:01 PM,%RH,77.821
18/06/09 04:27:01 PM,C,16.23	18/06/09 04:27:01 PM,%RH,77.821
18/06/09 05:27:01 PM,C,15.228	18/06/09 05:27:01 PM,%RH,78.929
18/06/09 06:27:01 PM,C,15.729	18/06/09 06:27:01 PM,%RH,81.126
18/06/09 07:27:01 PM,C,15.729	18/06/09 07:27:01 PM,%RH,80.579
18/06/09 08:27:01 PM,C,17.734	18/06/09 08:27:01 PM,%RH,81.126
18/06/09 09:27:01 PM,C,37.222	18/06/09 09:27:01 PM,%RH,97.837
18/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	18/06/09 10:27:01 PM,%RH,94.313
18/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	18/06/09 11:27:01 PM,%RH,94.821
19/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 12:27:01 AM,%RH,94.313
19/06/09 01:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 01:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 02:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 02:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 03:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 03:27:01 AM,%RH,94.821
19/06/09 04:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 04:27:01 AM,%RH,95.328
19/06/09 05:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 05:27:01 AM,%RH,95.328
19/06/09 06:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 06:27:01 AM,%RH,96.336
19/06/09 07:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 07:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 08:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 08:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 09:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 09:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 10:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 10:27:01 AM,%RH,95.832
19/06/09 11:27:01 AM,C,41.703	19/06/09 11:27:01 AM,%RH,95.328

19/06/09 12:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 12:27:01 PM,%RH,95.832
19/06/09 01:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 01:27:01 PM,%RH,95.832
19/06/09 02:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 02:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 03:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 03:27:01 PM,%RH,95.832
19/06/09 04:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 04:27:01 PM,%RH,95.832
19/06/09 05:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 05:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 06:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 06:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 07:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 07:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 08:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 08:27:01 PM,%RH,95.832
19/06/09 09:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 09:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 10:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 10:27:01 PM,%RH,96.336
19/06/09 11:27:01 PM,C,41.703	19/06/09 11:27:01 PM,%RH,96.336
20/06/09 12:27:01 AM,C,41.703	