

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE
FISIOLOGÍA VEGETAL**

Víctor Hugo Lallana

María del Carmen Lallana

570	Lallana, Víctor Hugo
CDD	Manual de prácticas de fisiología vegetal / Víctor Hugo Lallana ; María del Carmen Lallana. - 1a ed. 1a reimp. - Paraná : Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER, 2017. 226 p. ; 27 x 19 cm. - (Serie Cátedra ; 3)
	ISBN 978-950-698-329-1
	1. Fisiología Vegetal. I. Lallana, María del Carmen II. Título

Primera edición, 300 ejemplares, 2014.

Directora de EDUNER: María Elena Lothringer

Coordinación de la edición: Gustavo Esteban Martínez

Corrección: Ana Lía Pujato

Diseño gráfico: Gabriela Resett

Foto de tapa: *Bletilla striata* en cultivo *in vitro*. Víctor Hugo Lallana, 2012

© LALLANA, Víctor Hugo; LALLANA, María del Carmen

© EDUNER. Editorial de la Universidad Nacional de Entre Ríos

Entre Ríos, Argentina, 2017.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Resolución C.D. N° 6.794/12

Queda hecho el depósito que marca la ley 11 723.

No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor.

Su infracción está penada por las leyes 11 723 y 25 446.

Eva Perón 24, E3260FIB

Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

eduner@uner.edu.ar

Editado e impreso en Argentina

Colección Cátedra

ISBN 978-950-698-329-1

Germinación y latencia

A. Materiales de reserva en las semillas y su movilización

A.1. Cambios en la actividad de la enzima α -amilasa durante la germinación

A.2. Control hormonal de la síntesis de α -amilasa

B. Factores ambientales que afectan la germinación

B.1. Efecto de la alternancia de temperatura sobre la germinación de *Eryngium horridum* Malme (caraguatá)

B.2. Efecto de un herbicida hormonal sobre la germinación de semillas de *Eruca sativa* Mill (rúcula)

B.3. Viabilidad de semillas

C. Latencia de yemas y semillas

C.1 Interrupción de la latencia en yemas

C.2 Inhibición de la brotación

C.3 Ruptura de latencia en semillas

GERMINACIÓN Y LATENCIA

INTRODUCCIÓN

Fisiológicamente se define la germinación como la reanudación del crecimiento del embrión que comienza con la imbibición (adsorción de agua) y abarca hasta la aparición de la radícula de 2 mm o más.

En los ensayos de laboratorio se define como la aparición y desarrollo a partir del embrión de aquellas estructuras esenciales que, para un cierto tipo de semilla indican la capacidad de producir plantas normales en condiciones ambientales favorables.

El proceso de germinación se puede dividir en las siguientes etapas:

1. imbibición;
2. hidratación de enzimas hidrolíticas y sintéticas;
3. división y alargamiento celulares y,
4. presión de la radícula (o de la plúmula) sobre el tegumento y emergencia a través de éste.

El inicio de cada fase no tiene necesariamente este orden ni inhibe la ocurrencia de la anterior sino que pueden ser simultáneas.

La semilla seca debe absorber agua para poder germinar. El ritmo de absorción depende de la temperatura y la permeabilidad de los tegumentos, tamaño de la semilla y composición química de las reservas. En general cesa cuando el contenido de humedad es del 40 al 60 % de su peso fresco inicial.

El metabolismo de una semilla germinante es catabólico y anabólico, a la vez. Los productos de la hidrólisis de las sustancias almacenadas son utilizados como fuente de energía y como elementos constitutivos de enzimas y proteínas estructurales, necesarios para el desarrollo del embrión.

A. MATERIALES DE RESERVA EN LAS SEMILLAS Y SU MOVILIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante la formación de las semillas se acumulan cantidades relativamente grandes de materiales de reserva, que son los que permitirán el crecimiento y desarrollo de la plántula hasta que ésta pueda establecerse como una unidad fotosintetizadora y comenzar su vida autótrofa independiente. Estas sustancias de reserva pueden ser almacenadas en el embrión (en los cotiledones), en tejidos extraembrionarios (endosperma más raramente perisperma) o en ambos, e incluye lípidos, carbohidratos, proteínas, fosfato orgánico y varios componentes inorgánicos. Durante la germinación estas sustancias son hidrolizadas y transportadas al eje embriónico en crecimiento, lo que lleva aparejado un cambio en las estructuras que las contienen.

El carbohidrato de reserva más importante es el almidón, que se encuentra en forma de granos en el citoplasma.

Los lípidos, constituidos principalmente por grasas neutras están acumulados en los esferosomas, organoides provistos de una membrana.

Las proteínas de reserva, denominadas de este modo por creerse que no desempeñan función metabólica o estructural alguna, se acumulan en cuerpos específicos, los denominados cuerpos proteicos, distribuidos al azar en el citoplasma. En ocasiones es posible distinguir dos componentes, el cristalóide (cristal de proteína) y el globoide (lugar de deposición de fitinas, sales de potasio, magnesio y calcio del ácido fítico).

Durante la germinación los cuerpos proteicos sufren un proceso de vacuolización, aumentando de tamaño y coalesciendo, al tiempo que desaparecen las proteínas de reserva merced a la acción de las enzimas proteolíticas que se localizan en su interior.

El grano de cebada es un fruto indehiscente (cariopse) envuelto por las glumas, que en la mayor parte de las variedades están unidas firmemente al fruto. En la base del mismo se encuentra el embrión (2~5 % del peso seco del grano), en el que se pueden distinguir dos partes funcionales diferentes, el eje embrionario y el escutelo (Fig. 1).

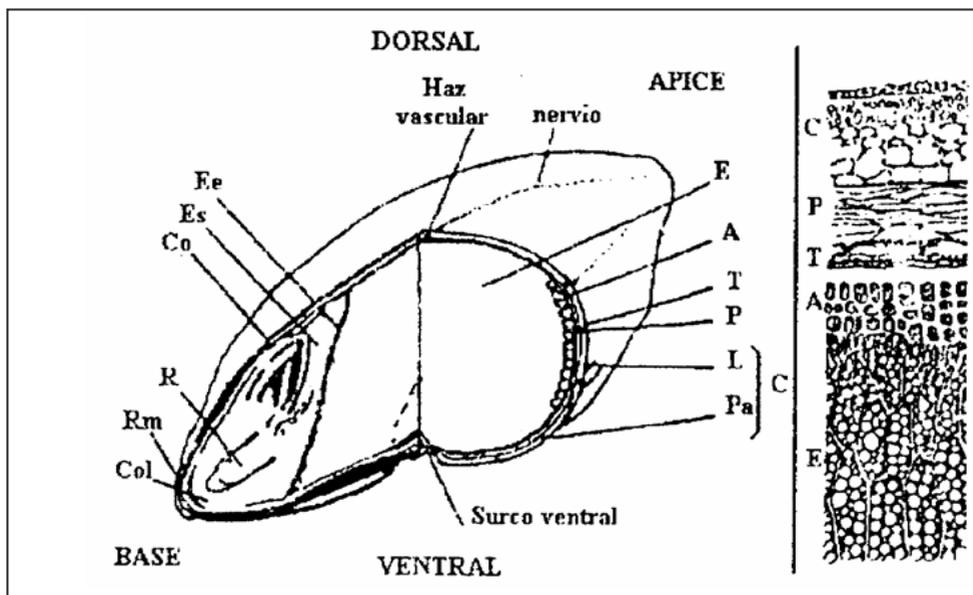


FIGURA 1. Diagrama idealizado de un grano de cebada (adaptado de Briggs, 1973)

Referencias: Ee, epitelio escutelar; Es, escutelo; Co, coleótilo; R, radícula; Rm región micropilar; Col. coleoriza; E, endospermo amiláceo; A, capa de aleurona; T, testa; P, pericarpio; L, lema; Pa, pálea; C, cascarilla.

La superficie interna de este órgano está cubierta por un epitelio columnar, en contacto con el endospermo, tejido parenquimático con un elevado contenido en almidón constituido por células muertas a excepción de las filas más externas (una a tres) que constituyen la denominada «capa de aleurona» y que son capaces de sintetizar proteínas, aunque no presentan en ningún caso división ni alargamiento celular (Figura 1).

El endospermo amiláceo sirve como depósito de reservas (almidón, proteínas, fitato, etc.) que permiten el desarrollo del eje embrionario durante la germinación. La hidrólisis de las reservas está controlada por la actividad del escutelo y la capa de aleurona, y los productos de hidrólisis son absorbidos por el escutelo y transportados al eje embriónico.

MOVILIZACIÓN DEL ALMIDÓN DURANTE LA GERMINACIÓN

El almidón constituye el principal azúcar de reserva del grano de cebada, comprendido entre el 58 y el 65 % del peso seco del mismo y se localiza casi en su totalidad en el endospermo. Durante la germinación es degradado por una serie de enzimas, que en su conjunto reciben el nombre de «diastasa», y que tiene una acción cooperativa en la hidrólisis del almidón. Contribuyen a la actividad enzimática total las enzimas α -amilasa y β -amilasa, así como una α -glucosidasa

capaz de hidrolizar maltosa, isomaltosa y almidón soluble, y al menos dos enzimas desramificadoras.

El contenido de la α -amilasa en el grano sin germinar es muy bajo, y aumenta gradualmente durante la germinación para alcanzar un valor máximo dependiendo de las condiciones de germinación, alrededor del sexto día.

El aumento en la actividad es debido a una síntesis «de novo» de moléculas de enzima, que tiene lugar en el escutelo y fundamentalmente, en la capa de aleurona, de donde son secretadas al endosperma, lugar en el que ejercen la acción. Tanto la síntesis de enzima como su secreción por la capa de aleurona están controladas por el embrión mediante la secreción de giberelinas (AG3 y AG1 fundamentalmente) desde el escutelo, hormonas que estimulan la síntesis de proteínas en la capa de aleurona, entre ellas las moléculas de α -amilasa, proteasa y ribonucleasa. La acción del embrión en la síntesis de enzima puede ser sustituida mediante la adición de giberelinas exógenas que, en el caso del ácido giberélico (AG3) provoca la síntesis de α -amilasa proporcional al logaritmo de la cantidad de hormona aplicada, hasta menos de 50 μg de AG3 por gramo. Este proceso es inhibido tanto por la acción de inhibidores de la síntesis proteica (puromicina, cicloheximida y otros) como por inhibidores de la síntesis de ARN (actinomicina D).

Las giberelinas secretadas a la capa de aleurona se sintetizan en el escutelo a partir de precursores pre-existentes, proceso que es reprimido por la acumulación de azúcares libres. Como el nivel de éstos en el escutelo es regulado «in vivo» por la acumulación de azúcares en el eje embrionario, proceso que depende de su crecimiento, existe por lo tanto un control de la movilización de almidón, por parte del consumo de azúcares del eje embrionario. Este consumo determina el nivel de azúcares libres en escutelo que, a su vez controla la síntesis de giberelinas, hormona que determina la cantidad de α -amilasa sintetizada y secretada por la capa de aleurona y, por tanto, la velocidad de hidrólisis del almidón. Estas relaciones se presentan en forma diagramática en la Figura 2.

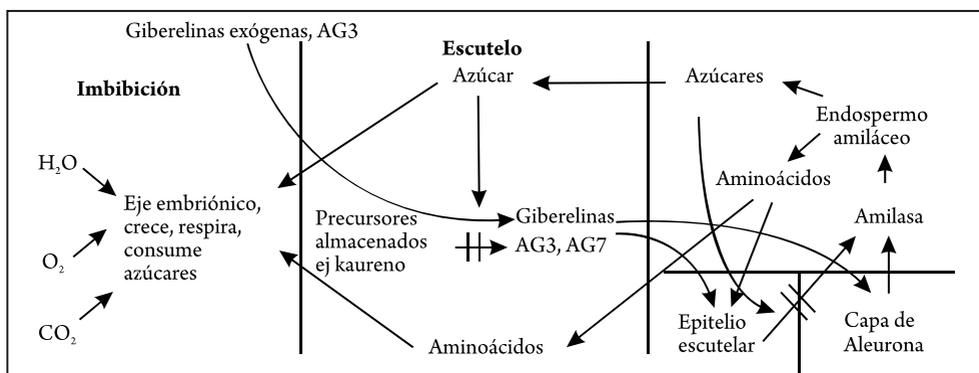


FIGURA 2. Diagrama simplificado de la producción de α -amilasa en el embrión de cebada (tomado de Monerri y Guardiola, 1992)

Dos son los objetivos que se persiguen con este práctico: determinar la variación que se produce en la actividad de la enzima α -amilasa durante la germinación de la cebada (parte A.1) y establecer la naturaleza del control ejercido por el embrión (parte A.2).



A.1. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA α -AMILASA DURANTE LA GERMINACIÓN

El objetivo es determinar la variación que se produce en la actividad de la enzima α -amilasa durante la germinación de la cebada

TÉCNICA OPERATORIA

La estimación de la actividad enzimática se efectúa midiendo la desaparición del almidón en el medio de incubación. La concentración de almidón se determina sobre la base de su propiedad de formar un color azul con el yodo; la absorbancia es proporcional a la concentración de almidón entre valores de aquella entre 0,3 y 1,5 al menos.

Se requieren semillas de cebada puestas a germinar durante 12 horas, 2, 3, 4, y 5 días.

Preparar una solución de almidón soluble: pesar 140 mg de almidón y 29 mg de cloruro cálcico. Disolver en 100 mL de agua, hervir durante 1 minuto y dejar enfriar. Preparar inmediatamente antes de usar.

Preparar una solución de iodo-ioduro: disolver 0,6 g de iodo resublimado y 6 g de ioduro potásico en 100 mL de agua destilada.

Tomar cinco semillas de cada grupo, de acuerdo con su edad. Separar el coleóptilo y el eje embrionario y conservar solamente el endospermo con sus cubiertas.

Triturar cuidadosamente en mortero con pequeña cantidad de arena y una solución tampón acetato 50 mM (pH 4,8). Filtrar a través de muselina o gasa. Aforar a 25 mL con la solución tampón. Colocar en tubos de centrifuga parte del extracto crudo obtenido (equilibrar los tubos) y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. Decantar el sobrenadante y conservarlo en tubos de ensayo.

- Pipetear en un tubo de ensayo 1 mL de tampón.
- Añadir 1 mL de la solución de almidón. Agitar para mezclar.
- Añadir 1 mL de la solución de extracto enzimático convenientemente diluida. Agitar y comenzar a contar el tiempo.

- Al cabo de 10 minutos medidos con exactitud añadir 1 mL de la solución de iodo-ioduro, que detiene la reacción. Agitar.
- Añadir 10 mL de agua destilada y esperar 10 minutos, al menos, antes de leer la absorción en el espectrofotómetro (ajustado a 620 nm, o fotocolorímetro con filtro azul).
- Preparar en simultáneo ensayo en blanco en que la solución de iodo se añade antes que la enzima, por lo que no se inicia la reacción.

Calcular la actividad enzimática como descenso en absorbancia por semilla y por minuto (ΔA) del modo siguiente. Sean N semillas trituradas aforadas a un volumen V. Sea A la absorbancia del blanco y B la de la muestra incubada con la enzima (B es siempre inferior a A).

$$\Delta A = \frac{(A - B) \times V \text{ (mL)}}{N \times 10}$$

Determinar la actividad enzimática de cada extracto del modo descrito. Representar los resultados en una gráfica en que se coloca como ordenadas el descenso en la absorbancia por semilla y por minuto y en abscisas la edad de la planta.



A.2. CONTROL HORMONAL DE LA SÍNTESIS DE α -AMILASA

El objetivo es establecer la naturaleza del control ejercido por el embrión en la germinación de semillas de cebada

TÉCNICA OPERATORIA

Tomar semillas de cebada y con un bisturí cortar el extremo de la semilla (alrededor de 1/3 de la misma) que tiene el embrión. Preparar al menos 60 semillas.

Colocar las semillas así disectadas en una bolsa de gasa y mantener durante 20 minutos en solución de lejía comercial al 2%. Este tratamiento basta para mantener al mínimo la contaminación fungal y bacteriana.

Tomar 6 cápsulas de Petri, previamente esterilizadas, con una hoja de papel de filtro en el fondo. En una de ellas colocar 3 mL de agua conteniendo 90 μ g de estreptomina y 10 semillas intactas que actuaran como controles. En las cinco cápsulas restantes colocar con la ayuda de unas pinzas, 10 semillas desgerminadas y añadir respectivamente:

- 3 mL de agua con sulfato de estreptomicina (30 mg/L)
- 3 mL de la solución de ácido giberélico (0,1 µg/mL), conteniendo sulfato de estreptomicina (30 mg/L)
- 3 mL de la solución de ácido giberélico (0,001 µg/mL), conteniendo sulfato de estreptomicina (30 mg/L).
- 3 mL de la solución de ácido giberélico (0,1 µg/mL) + ciclohexímida (10 µg/mL), conteniendo sulfato de estreptomicina (30 mg/L).
- 3 mL de la solución de ácido giberélico (0,1 µg/mL) + actinomicina D (100 µg/mL), conteniendo sulfato de estreptomicina (30 mg/L).

A los 3 días tomar cinco semillas de cada cápsula de Petri y calcular la actividad enzimática, siguiendo la técnica operatoria descrita en el apartado A.1.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- BEWLEY, J. D. y M. BLACK (1978). *Physiology and biochemistry of seeds*. Vol. 1, pp. 245-281. Berlín: Springer-Verlag.
- BLACK, M. (1972). Control processes in germination and dormancy. *Biology Readers* nº 20, Oxford.
- BRIGGS, D. E. (1973). Hormone and carbohydrate metabolism in germinating cereal grains. En: *Biosynthesis and its control in plants* (B.W. Milborrow, ed.) pp. 219-275. London: Academic Press.
- LALLANA, V.H.; J.H.I. ELIZALDE y F. GARCÍA (2005). Germinación y latencia de semillas y yemas. *Ayuda Didáctica U.T.* nº 11. Cátedra Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, 21 p.
- MONERRI, C. y J. L. GUARDIOLA (1992). *Manual de prácticas de Fisiología vegetal*. (p 3-24). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España, 158 p.
- SÍVORI, E.; MONTALDI, E. y O. CASO (1981). *Fisiología vegetal*. Hemisferio Sur, 681 p.



B. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA GERMINACIÓN

Debe tenerse en cuenta que la germinación es un proceso fisiológico controlado por múltiples factores (temperatura, agua, presión parcial de oxígeno, luz), pudiendo examinarse para cada uno de ellos la homogeneidad fisiológica de las semillas (mínimo, óptimo y máximo). La germinación de una muestra de semillas en determinadas condiciones clasifica a las semillas en dos conjuntos mutuamente excluyentes –las que germinan en esas condiciones y las que no lo hacen. En este sentido, se habla de una evaluación de la homogeneidad fisiológica de esas semillas (Labouriau, 1983).

En muchos casos puede observarse heterogeneidad fisiológica causada por las diferencias en las condiciones ecológicas de maduración o en otros casos, por las condiciones ecológicas en el período de postmaduración de las semillas, causando un fenómeno de «dormición relativa» (Labouriau, 1983).

Un estudio de la capacidad de germinación permite descubrir que factores ambientales influyen en el proceso de germinación y desempeñan un papel central como medida de la homogeneidad fisiológica de las semillas, especialmente en los estudios de dormición (Labouriau, 1983). No obstante ello, la información obtenida por esta vía no es suficiente para un análisis fisiológico del proceso de germinación. Para avanzar en el análisis es preciso considerar a la germinación como un proceso cinético, el cual puede evaluarse midiendo adecuadamente la velocidad de germinación de cada muestra o población estudiada. Varios autores (Popinigis, 1985; Labouriu, 1983, Silva y Nakagawa, 1995) han desarrollado numerosas fórmulas para este cálculo.

Entre los **factores intrínsecos** que regulan la germinación podemos mencionar: Limitaciones físicas de los tegumentos que actúan como barrera a la penetración de sustancias, la existencia de bloqueos metabólicos, presencia de inhibidores, la viabilidad y la longevidad.

Entre los **factores extrínsecos** consideramos el agua, el dióxido de carbono, el oxígeno, la temperatura y la luz. Para cada especie y factor existe un rango dentro del

cual varía de acuerdo a los límites en que se puede dar la germinación; y un óptimo que es el punto o valor donde se observa el mayor porcentaje de germinación.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

LABOURIAU, L. G. (1983). A germinacao das sementes. OEA, Serie de biología, Monografía nº 24, 174 p.

POPINIGIS, F. (1985). Fisiología de sementes. Brasília, AGIPLAN. 289 p.

SILVA, J. V. C. y J. NAKAGAWA, (1995). Estudo de formulas para calculo da velocidade de germinação. Informativo ABRATES 5(1): 62-73.

B.1. EFECTO DE LA ALTERNANCIA DE TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN DE *ERYNGIUM HORRIDUM* MALME (CARAGUATÁ)

INTRODUCCIÓN

La germinación es un proceso fisiológico donde intervienen múltiples factores (agua, luz, temperatura, presión parcial de oxígeno).

La temperatura puede inducir o romper la dormancia de las semillas. En muchas especies se ha observado una estrecha correlación entre los ciclos de temperatura y la pérdida de dormancia. Uno de los mecanismos que explicaría la ruptura de la dormición por regímenes alternos de temperaturas es el estrés ocasionado por las cubiertas seminales. Las fluctuaciones diarias de temperatura causan la expansión y contracción de las cubiertas provocando la separación de las paredes celulares en áreas especiales de las mismas. Esto destruye la impermeabilidad de los tegumentos seminales y permite la entrada de agua, necesaria para la germinación.

Eryngium horridum, comúnmente llamado «falso caraguatá o caraguatá» es una maleza frecuentemente hallada en los campos naturales de Entre Ríos. La semilla necesita alternancia de temperaturas para superar la dormición (Flores, 1991) y estos requisitos tienen que cumplirse dentro del año de ocurrida la dehiscencia debido a su corta longevidad (Maidana y Lallana, 1992).

Lallana y Salinas (2003) en ensayos de germinación de esta especie conducidos a temperatura ambiente observaron que los máximos valores se registraron en los meses de julio a septiembre y luego disminuyeron a cero en enero-febrero, al año de cosecha.

Elizalde (2008) encontró la máxima germinación de *E. horridum* a los 92 días desde la cosecha, tiempo en que las semillas permanecieron expuestas en el campo durante marzo, abril y mayo con amplitudes promedio diarias entre 12,7 y 9,8 °C. En condiciones de campo la interacción de factores como las lluvias durante marzo y abril, las temperaturas más bajas a partir de mayo y una menor amplitud térmica estimularían la germinación temprana de *Eryngium horridum*.



B.1. EFECTO DE LA ALTERNANCIA DE TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN DE *ERYNGIUM HORRIDUM* MALME (CARAGUATÁ)

El objetivo del trabajo práctico será evaluar la germinación de semillas de *Eryngium horridum* («caraguatá») bajo dos condiciones de temperatura

TÉCNICA OPERATORIA

El ensayo constará de 2 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. Para ello se prepararán 8 sobres con 50 semillas de *E. horridum* cada uno. Para el ensayo de germinación se utilizará la técnica del rollo de papel (Krzyzanowski *et al.*, 1992). Se empleará un papel comercial blanco absorbente marca Valot® de 37 cm de longitud por 22 cm de alto, el cual se corta a una altura de 17 cm a los fines de adaptarlo al tamaño del vaso de germinación donde serán colocados en posición vertical. (Fig. 1)

La alternancia de temperaturas estará dada por las condiciones climáticas imperantes durante el ensayo; se aconseja una amplitud térmica de 9 °C, con preferencia en las épocas de otoño-invierno.

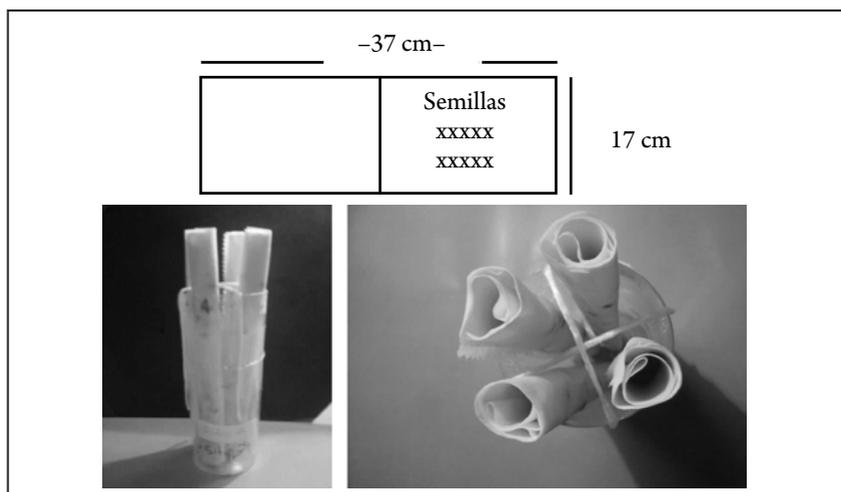


FIGURA 1. Dispositivo experimental para los ensayos de germinación (tomado de Lallana, 2005)

Tratamiento 1: Temperatura alternada. Humedecer el papel absorbente con agua destilada y distribuir sobre él 50 semillas. Luego doblarlo por el medio tapando las semillas, enrollar el papel y colocarlo en el vaso de germinación (Ver fig. 1). Poner este último en una bolsa de plástico transparente, atarla en el extremo superior y colocarla en condiciones de ambiente natural durante 28 días.

Tratamiento 2: Temperatura constante. Proceder del mismo modo que en el tratamiento 1 pero colocándolas en cámara de germinación durante 28 días a temperatura constante (25 °C).

Se considerará semilla germinada fisiológicamente cuando la emisión de la radícula sea visible (2 a 3 mm)

Los tratamientos deberán ser controlados semanalmente hasta los 28 días. En cada oportunidad se registrará el número de semillas germinadas, las que serán extraídas fuera del papel. Se verificará la humedad del sustrato y según necesidad se rociará con agua destilada.

En la planilla adjunta al final del protocolo, registre los resultados del número de semillas germinadas en forma semanal y confeccione un gráfico con la evolución temporal del poder germinativo para ambos tratamientos expresado en número de semillas o en % de semillas germinadas. Efectúe el análisis e interpretación de los resultados y redacte el informe final.

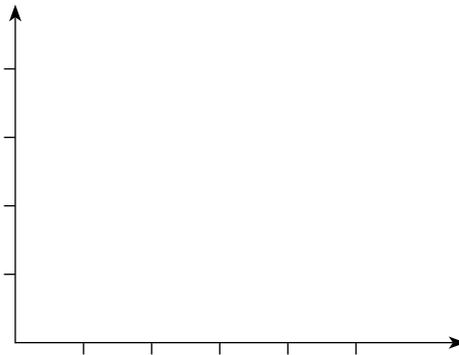
LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap XXVII. McGraw-Hill Interamericana, 522 p.
- ELIZALDE, J.H.I. (2008). Calidad fisiológica de semillas y establecimiento a campo de plantas de *Eryngium horridum* Malme. Tesis de Maestría. 114p.
- FLORES, A.R.I. (1991). Evaluación de la germinación de *Eryngium paniculatum* Cav. et Domb. («caraguatá») bajo diferentes condiciones de temperaturas. XII Reunión Argentina sobre la maleza y su control. Tomo I: Investigación Básica. P. 70-76
- KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J. de B. (Eds.) (1999). Vigor de Sementes: Conceitos e Testes. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes. comité de vigor de Sementes. Londrina, Brasil. 218 p.
- LALLANA, V.H. (2005). Reproducción sexual de *Eryngium horridum* Malme en pastizales naturalizados de Entre Ríos, 220 p. (inédito). Tesis doctoral.
- LALLANA, V.H.; ELIZALDE, J.H.I. y F. GARCÍA (2005). *Germinación y latencia de semillas y yemas*. Ayuda Didáctica U.T. n° 11. Cátedra Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, 21 p.
- MAIDANA, A. y V. H. LALLANA (1992). Longevidad de semillas de *Eryngium paniculatum* Cav. et Domb. («caraguatá»). XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Huerta Grande, Córdoba. Resumen ampliado, pp. 153-154.



**Planilla para toma de datos
de germinación**

TRATAMIENTOS	Nº SEMILLAS GERMINADAS 7 DÍAS	Nº SEMILLAS GERMINADAS 14 DÍAS	Nº SEMILLAS GERMINADAS 21 DÍAS	Nº SEMILLAS GERMINADAS 28 DÍAS
T1				
T2				



B.2. EFECTO DE UN HERBICIDA HORMONAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *ERUCA SATIVA* MILL (RÚCULA)

INTRODUCCIÓN

La germinación es la aparición y desarrollo a partir del embrión de estructuras esenciales que conducen a la formación de plantas normales en condiciones ambientales favorables. Este proceso puede ser afectado por diversos factores que pueden retardar, inhibir o estimular la germinación.

Durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de una plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta; es por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (IDRC/IMTA, 2004).

La evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero sí pueden retardar o inhibir por completo los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo (IDRC/IMTA, 2004).

La reducción del porcentaje de germinación y/o inhibición del desarrollo radical de semillas recién germinadas son respuestas biológicas, subletales, muy sensibles, para la evaluación de los efectos biológicos en vegetales.

Los bioensayos o pruebas biológicas son métodos rápidos, de escasos requerimientos instrumentales, que cuantifican respuestas biológicas en las etapas iniciales del desarrollo vegetal. Estos ensayos se pueden utilizar para la evaluación de toxicidad no específica en aguas superficiales (lagos, represas, ríos, arroyos), aguas subterráneas, aguas residuales domésticas, industriales, lixiviados de suelos, sedimentos, lodos, sustratos, etc.

Además han sido recomendados y aplicados por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales, de compuestos puros y de efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de pesticidas (Wang, 1991; APHA, 1998).

Foti *et al.* (2005) en bioensayos para detectar salinidad con cloruros y sulfatos determinaron que la rúcula es tolerante a altas concentraciones salinas y que la lechuga es más sensible para monitorear aguas de distintos orígenes. En otro ensayo Foti y Lallana (2005) determinaron que la rúcula es un material biológico muy sensible para la detección de sustancias tóxicas y en particular herbicidas en agua.



B.2. EFECTO DE UN HERBICIDA HORMONAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *ERUCA SATIVA* MILL (RÚCULA)

El objetivo del trabajo es determinar el efecto de un agente tóxico en diferentes concentraciones sobre la germinación de semillas de rúcula evaluado a través del crecimiento radical.

TÉCNICA OPERATORIA

Los materiales que se necesitan son: cajas de Petri, papel absorbente, pipetas, propipetas, semillas de rúcula (*Eruca sativa*) con un poder germinativo superior al 90 %, soluciones de herbicida (3 L/ha; 0,05 L/ha; 0,005 L/ha; 0,0005 L/ha; 0,00005 L/ha), agua destilada, etiquetas, lápiz, cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C (16 h de luz y 8 h de oscuridad), calibre digital, lupa de mesa, pinzas, planillas para anotar las mediciones.

Rotular cada caja de Petri en la base o lateral, colocando una etiqueta en la que figure tratamiento y repetición, fecha de siembra, especie vegetal y número de ensayo (escribir con lápiz). Colocar en el fondo de cada una de las cajas papel absorbente.

Utilizando una pipeta embeber el papel absorbente con 4 mL de la solución correspondiente a cada tratamiento o agua destilada en el caso del testigo.

Sembrar en cada caja 20 semillas de rúcula de manera uniforme. Realizar 5 repeticiones por tratamiento. Tapar la caja una vez sembrada. Llevar todas las cajas a cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C.

A las 24 horas desde la siembra controlar el estado de humedad de cada caja. Si estuvieran secas humedecer con la solución correspondiente.

A las 48 horas desde la siembra (o de incubación) se evaluará el número de semillas germinadas y la longitud radical. Para ello se debe contar con una planilla impresa donde se anotarán los datos de cada medición individual y cualquier observación que se crea necesaria. Para las mediciones se utilizará un calibre digital y una lupa de mesa.

Las semillas se consideran germinadas cuando se observa una raíz superior a 2 mm de longitud. No se consideran como germinadas las semillas muertas

o podridas y en aquellas semillas en este estado que logren emitir radícula (podrida o necrosada) no se estimará la longitud radicular. Las mediciones se deben hacer de manera ordenada, midiendo todas las repeticiones pertenecientes a cada tratamiento en el mismo orden en que se los sembró, utilizando la planilla adjunta al final del protocolo.

Calcular el promedio de la longitud radical y el porcentaje de germinación de cada repetición. Estos valores se utilizarán para obtener un índice de germinación (IG) (Zucconi *et al.* 1981 a,b).

$IG = (\text{porcentaje de semillas germinadas en la muestra} \times \text{longitud media de la radícula en la muestra}) \times 100 / (\text{porcentaje de semillas germinadas en el control normal} \times \text{longitud media de la radícula del control normal})$

$$IG = (G/Gc) \times (LR/LRc) \times 100$$

Donde: G = número de semillas germinadas en el tratamiento

Gc = número de semillas germinadas en el control normal

LR = longitud radicular media del tratamiento

LRc = longitud radicular media en el control normal

El IG es un valor porcentual. Un IG de 90 es 90 % respecto del control normal (100); ó 10 % debajo del control. Un IG de 145, es 145 % respecto al control normal ó un 45 % superior al control. Valores de IG menores a 60 son considerados fitotóxicos. (Zucconi *et al.*, 1981 a, b; Ortega *et al.*, 2000)

Se consideran no tóxicas las muestras en las que la germinación es mayor al 90 % respecto del control con agua destilada. Se consideran tóxicas las que presentan valores comprendidos entre 75 y 90 %. Se consideran muy tóxicas las que tienen menos del 75 % de germinación respecto del control (Poi de Neiff y Ramos, 2001).

Lallana y Elizalde (2009) teniendo en cuenta distintas escalas para evaluar toxicidad en muestras de agua aplicadas para bioensayos construyeron una escala con más rangos en función del porcentaje de inhibición radical, que se aplicó para clasificar las aguas según el grado de toxicidad (Tabla 1).

TABLA 1. Clasificación de aguas según grado de toxicidad en relación con la inhibición radical (Lallana y Elizalde, 2009)

CATEGORÍA	INHIBICIÓN RADICAL (%)	GRADO DE TOXICIDAD
1	10-20	Leve toxicidad
2	20-40	Medianamente tóxico
3	40-60	Tóxico
4	60-80	Muy tóxico
5	>80	Severa toxicidad

Realizar los cálculos, graficar, sacar conclusiones y elaborar el informe correspondiente.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

APHA (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Part 8000. Toxicity.

Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E. and Eaton, A. D. Joint Editorial Borrada. 20th Edition.

AQUAtox 2000. *Cuaderno de actividades*. 52 p. Disponible en <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/31600/1/118283.pdf> [Consulta julio 2013].

FOTI, M. N.; BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. (2005). Bioensayos de germinación con semillas de rúcula y lechuga para monitoreo de calidad de agua. *Rev. Cient. Agropecu.* 9(1):47 - 53

FOTI, M. N.; LALLANA, V. H. (2005). Bioensayo de germinación con semillas de *Eruca sativa* Mill. para la detección de salinidad y presencia de herbicida en agua. *Rev. FABICIB* (9): 9 - 16.

IDRC/IMTA. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Estandarización, Intercalibración, resultados y aplicaciones. Edit. Por Gabriela Castillo.

LALLANA, V. H. y ELIZALDE, J. H. I. (2009). Calidad del agua y vegetación acuática en represas y tributarios de la cuenca del Arroyo Feliciano, Entre Ríos, Argentina. IN: *VI Congreso de Medio Ambiente de AUGM*, Universidad Federal de Sao Carlos, Brasil. 5 al 8 de octubre de 2009. Edición CD-ROM. 15 p. ISSN1808-7639.

ORTEGA, M. C.; AGUADO, M. T.; ORDOVÁS, J.; MORENO, M. T.; CARMONA, E. (2000). Propuesta de Bioensayos para detectar factores fitotóxicos en sustratos y enmiendas. *Actas de Horticultura* n° 32: 363 - 376.

POI DE NEIFF, A. y RAMOS, A. (2001). Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina). <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/6-Biológicas.pdf> 019.

WANG, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 381-400.

ZUCCONI, F.; FORTE M.; MÓNACO, A., DE BERTOLDI, M. (1981 a). Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle*, 22: 27-29.

ZUCCONI, F.; PERA A.; FORTE, M.; DE BERTOLDI, M. (1981 b). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22: 54-57.



Planilla para toma de datos (basada en el modelo de Aqatox 2000: cuaderno de actividades)

TRATAMIENTO:		FECHA SIEMBRA:		FECHA MEDICIÓN:	
ENSAYO N°:		OPERADOR:			
LONGITUD DE LA RAÍZ (mm)	CONTROL NORMAL- R1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3	REPETICIÓN 4	CONTROL POSITIVO- R5
	1.	1.	1.	1.	1.
	2.	2.	2.	2.	2.
	3.	3.	3.	3.	3.
	4.	4.	4.	4.	4.
	5.	5.	5.	5.	5.
	6.	6.	6.	6.	6.
	7.	7.	7.	7.	7.
	8.	8.	8.	8.	8.
	9.	9.	9.	9.	9.
	10.	10.	10.	10.	10.
	11.	11.	11.	11.	11.
	12.	12.	12.	12.	12.
	13.	13.	13.	13.	13.
	14.	14.	14.	14.	14.
	15.	15.	15.	15.	15.
	16.	16.	16.	16.	16.
	17.	17.	17.	17.	17.
	18.	18.	18.	18.	18.
	19.	19.	19.	19.	19.
	20.	20.	20.	20.	20.
Longitud total	mm	mm	mm	mm	mm
N° de semillas germinadas					
Longitud promedio	mm	mm	mm	mm	mm

Continúa en página siguiente >>>

B.3. VIABILIDAD DE SEMILLAS

INTRODUCCIÓN

La calidad fisiológica de las semillas se expresa en el momento en que la viabilidad y el vigor adquieren los máximos valores. En algunas especies la máxima viabilidad y vigor ocurren al llegar la semilla a la madurez fisiológica, momento en que su peso seco es máximo, y a partir de ahí comienza el deterioro de las semillas.

La prueba topográfica de tetrazolio es un análisis bioquímico que permite determinar en forma rápida la viabilidad de las semillas y da una referencia de su poder germinativo. Es particularmente útil en el caso de simientes dormidas o lentas en germinar; en este sentido la prueba informa acerca de la potencialidad germinativa del lote de semillas (Peretti, 1994)

El cloruro o bromuro de 2,3,5 trifenil tetrazolium se usa para indicar la reacción óxidoreducción que ocurre en las células que respiran, lo que manifiesta la actividad metabólica, propia de las células vivas (Peretti, 1994). Las sales de tetrazolio indican la actividad de las enzimas del grupo de las deshidrogenasas. Al penetrar en las células vivas la sal se reduce formando un compuesto rojizo e insoluble en agua (formazán). De este modo se pueden distinguir las áreas vivas de las semillas, de color rojo, de las partes muertas, áreas blancas sin coloración.

Esta prueba es muy útil también para detectar lesiones originadas por picaduras de chinches y los daños causados por el ambiente de producción y/o almacenamiento. Todo esto nos permite inferir la calidad del lote que estamos analizando. Así, manchas blancas y redondeadas refieren a picaduras de chinches; manchas longitudinales paralelas manifiestan cambios sucesivos de condiciones de sequía y humedad ambiente, manchas blancas longitudinales indican golpes poscosecha.



B.3. VIABILIDAD DE SEMILLAS DE SOJA

El objetivo de este trabajo práctico es determinar la viabilidad de semillas de soja mediante la técnica de la prueba topográfica de tetrazolio.

TÉCNICA OPERATORIA

Se trabajará con dos lotes de semillas de calidades diferentes de *Glycine max* («soja»). Para la realización de la prueba topográfica por tetrazolio se utilizará una solución al 0,1 % de la sal de 2,3,5 cloruro trifeníl tetrazolium (pH 7).

Etapa 1: acondicionar la semilla de soja entre papeles humedecidos durante 12 horas a temperatura ambiente y luego sumergir en agua durante una hora.

Etapa 2: las semillas se sumergen en la solución de tetrazolio contenida en un vaso de precipitado de 100 mL y se colocan en baño termostático a 35 °C constante (AOSA, 2000) durante 95 minutos y en oscuridad.

Etapa 3: una vez completada la tinción se enjuagan las semillas con abundante agua corriente y se dejan en agua hasta su evaluación bajo lupa.

Etapa 4: se elimina el tegumento y se observa una por una. Para su evaluación cada semilla es cortada longitudinalmente con un bisturí. Se realiza la determinación de la viabilidad tomando como referencia el patrón de tinción y de evaluación de embriones de soja tratados con tetrazolio (Delouche *et al.*, 1971).

Para la interpretación de los resultados las ilustraciones se presentan por pares y muestran ambos lados de la semilla. Las áreas negras, en el manual, indican coloración y tejido vivo; las áreas blancas representan ausencia de coloración y tejido muerto. Se ha establecido una escala de 1 a 15 según la ubicación e intensidad de la mancha que definen: 1 a 6 semilla germinable y 7 a 15 no germinable (Tabla 1, Delouche *et al.*, 1971; Peretti A., 1994, al final de este protocolo).

Cada mesada trabajará con 2 lotes de semillas. Se contarán 25 semillas de soja por tratamiento realizando 4 repeticiones.

Para determinar el porcentaje de viabilidad de cada lote registre en la planilla adjunta al final de este protocolo la observación correspondiente para cada semilla de cada repetición, de acuerdo con la escala de 1 a 15. Calcule el promedio de viabilidad de cada lote de semillas, compare y saque conclusiones.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA) (2000). Tetrazolium testing handbook.

Contribution n° 29 to the *Handbook on Seed Testing*. Peters, J. edit. USA, 303 p.

CRAVIOTTO, R.; M. ARANGO y otros (2006). Cuantificación del daño ambiental por la prueba de tetrazolio en semillas de soja (*Glycine max* L. Merrill). MERCOSOJA 2006 - 3° Congreso de Soja del Mercosur- Rosario, Santa Fe.

DELOUCHE, J.; M. WAYNE; M. RASPET & M. LIENHARD (1971). *Prueba de viabilidad de la semilla con tetrazol*. AID. Centro de Ayuda Técnica, México. MX. 1.ª ed. 71 p.

GALLO, C. (2006). Calidad de semillas en soja versus ambiente y chinches. *Revista Agromensaje* n° 19 de la FCA, UNR-ISSN 1669-8584

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (1996). *International Rules for Seed Testing. Seed Science & Technology*. Vol. 24, supplement.

PERETTI, A. (1994). *Manual para análisis de semillas*. INTA, Hemisferio Sur, pp. 109-113 y 127-130.

SÍVORI, E.; E. MONTALDI y O. CASO (1981). *Fisiología vegetal*. Hemisferio Sur, 613-628 p.

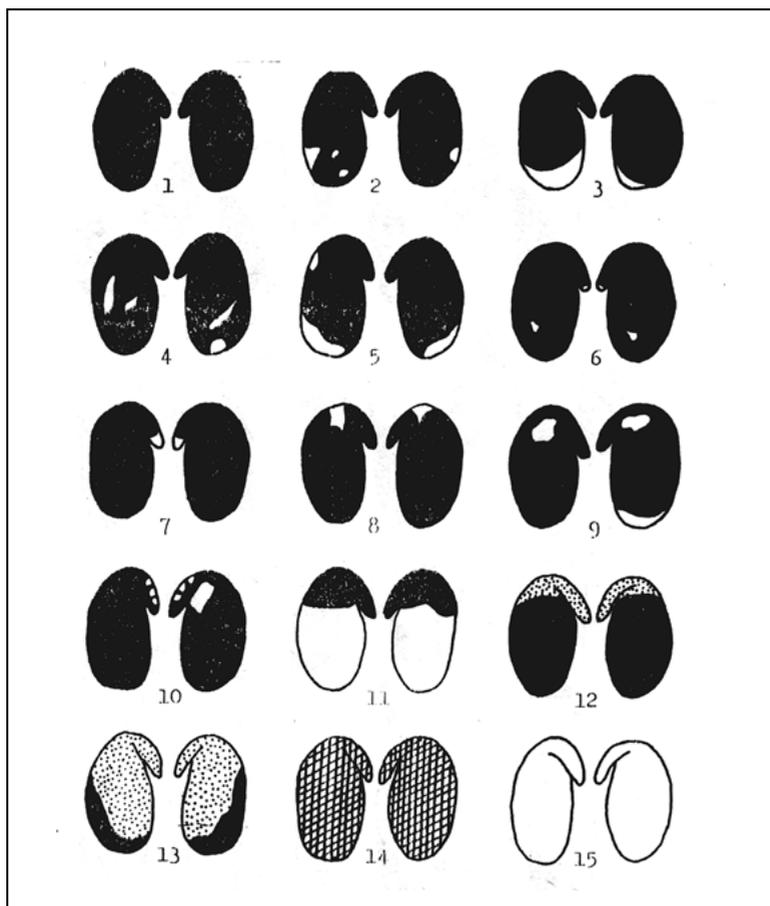


TABLA 1. Criterios para la interpretación de resultados de la prueba topográfica de tetrazolio en soja (tomada de Delouche *et al.*, 1971; Peretti, 1994)

Nº	DESCRIPCIÓN	ESTADO
1	Semilla completamente coloreada. La mancha no es demasiado intensa.	Germinable
2-5	Pequeñas áreas sin coloración en los cotiledones	Germinable
6	La punta extrema de la radícula no se mancha; pequeñas áreas sin coloración en los cotiledones.	Germinable
7	Algo más que el extremo de la punta no presenta coloración.	No germinable
8	La unión eje radícula-hipocotiledón con los cotiledones no tiene coloración.	No germinable
9	Área sin coloración sobre la parte superior del eje radícula-hipocotiledón.	No germinable
10	Serie de áreas sin coloración sobre la parte superior del eje radícula -hipocotiledón.	No germinable
11	Más de la mitad de la porción superior de los cotiledones no da color.	No germinable
12	La porción basal de los cotiledones y el eje radícula-hipocotiledón son de color rojo nebuloso o rojo lechoso, la mancha se extiende a través de toda el área de la sección transversal de los cotiledones.	No germinable
13	Igual a nº12 pero las áreas en rojo lechoso son más extensas.	No germinable
14	La semilla toma color rojo purpúreo intenso; la mancha se extiende a través de toda el área de la sección transversal de los cotiledones.	No germinable
15	La semilla no presenta coloración alguna.	No germinable



Planilla para el análisis de viabilidad de dos lotes de semilla de soja, según criterios para interpretación de resultados (Escala de Delouche *et al.*, 1971; Peretti, 1994)

Semilla	LOTE A			LOTE B		
	Viable	No viable	Observación	Viable	No viable	Observación
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

C. LATENCIA DE YEMAS Y SEMILLAS

INTRODUCCIÓN

En muchas especies el crecimiento no es continuo sino que puede interrumpirse durante períodos más o menos largos, en distintos momentos del desarrollo y del crecimiento. Así por ejemplo, las yemas, los tubérculos y semillas pueden presentar una detención temporal del crecimiento, aun bajo aquellas condiciones del medio en las que pudiera esperarse su continuación.

Dicha supresión del crecimiento en las plantas, órganos o tejidos sanos que disponen de todos los requisitos químicos y físicos considerados necesarios para su desarrollo, recibe el nombre de período de **reposo, letargo, latencia o dormición**. Esta latencia o dormición puede tener distintas causas, estructurales o fisiológicas. En semillas por ejemplo, debido a tegumentos impermeables al agua o al oxígeno (*Lotus tenuis*, *Medicago sativa*, *Trifolium* sp., etc.), embriones inmaduros, presencia de inhibidores, etc.

La dormición de las yemas de árboles o tubérculos en general se debe a un balance hormonal determinado, inducido por condiciones ambientales específicas. La relación entre giberelinas y citocininas que disminuyen por un lado y el ácido abscísico que aumenta por el otro determinan la entrada en reposo o dormición. Obviamente el proceso inverso rompe la latencia o dormición.

C.1. INTERRUPCIÓN DE LA LATENCIA EN YEMAS

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies vegetales pasan durante un período de tiempo en estado de latencia o dormición. Durante este período el crecimiento de una planta completa o de un determinado órgano vegetal queda temporalmente interrumpido. En las plantas superiores, distintos órganos pueden entrar en estado durmiente: semillas, yemas, tubérculos, rizomas o bulbos.

Por lo general, el estudio de latencia suele coincidir con los períodos más desfavorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas: bajas o altas temperaturas, períodos de sequía, fotoperíodos no apropiados, etc. Las plantas permanecen en ese período hasta que se vuelvan a dar las condiciones adecuadas para reanudar su desarrollo.

En muchos casos es de interés promover el desarrollo de los brotes en los tubérculos, bulbos o ramas de árboles que están en estado de latencia. Este estado puede interrumpirse por medio de productos químicos sintéticos del tipo de los derivados halogenados, del etanol y compuestos con azufre entre otros.

C.2. INHIBICIÓN DE LA BROTAÇÃO

En otros casos el desarrollo de brotes en las papas es un problema importante en algunas regiones, en las que comercialmente interesa un almacenamiento largo. La brotación produce un consumo de sustancias de reserva, pérdida de agua, disminución de peso y volumen y arrugamiento de la epidermis. Estas desventajas se evitan en parte por el almacenamiento a bajas temperaturas (por debajo de 5 °C). Esto, además de encarecer notablemente el producto da lugar a un aumento de los azúcares, que hacen perder a las papas sus cualidades culinarias.

Uno de los productos usados a escala comercial es el alfa-naftalenacetato de metilo (NAME), cuyos vapores inhiben la brotación de los tubérculos almacenados. Se ha encontrado que el compuesto sintético fenil carbamato isopropilo o isopropilo fenil carbamato (IPC) es mucho más práctico que el NAME. Este compuesto (IPC) al 3 %, con un polvo inerte como vehículo, aplicado en la cantidad de 1.100 g por tonelada de papa inhibe la brotación de los tubérculos.

C.3. RUPTURA DE LATENCIA EN SEMILLAS

INTRODUCCIÓN

En los casos de latencia de semillas debido a la interferencia de las cubiertas seminales duras, la acción del suelo y los microorganismos, las fluctuaciones de temperatura y humedad, el pasaje a través del tracto digestivo de aves u otros animales, por las propias labranzas, por fenómenos naturales, vientos fuertes, lluvias copiosas, rompen esa latencia. El efecto de una o varias de estas condiciones «ablanda» las llamadas semillas «duras».

Existen métodos artificiales para interrumpir o romper esta dormición en semillas mediante escarificado mecánico o tratamientos químicos con ácidos fuertes como el sulfúrico, agua caliente, etc.

Se utilizan escarificadores especiales cuando se trabaja a gran escala o con semillas pequeñas. Las semillas pueden hacerse girar en tambores equipados con discos forrados con papel lija, montados sobre un eje y encerrados en un cilindro de metal. El tercio inferior del cilindro se llena con semillas y los discos se hacen girar a velocidad de 500 a 900 rpm. Para cada lote y tipo de semillas se debe establecer la duración de tratamiento. También pueden usarse mezcladoras con arena gruesa o grava mezcladas con las semillas. Para facilitar la separación posterior, la arena o grava deben ser de tamaño diferente.

Las semillas de ciertas familias (Leguminosas, Malváceas, Liliáceas) poseen tegumentos duros, tal es el caso de *Enterolobium contortisilicum* («oreja de negro»), y/o impermeables al agua o al intercambio gaseoso (CO_2 y O_2) debido a la presencia de tegumentos endurecidos y a un desarrollo considerable de capas de células en empalizada. Permanecen en el suelo hasta que la actividad microbiana y las diversas influencias térmicas comienzan a erosionar o ablandar las cubiertas duras, haciéndolas permeables al agua. Este proceso puede acelerarse mediante el raspado o punteado de las semillas, el uso de ácidos, agua caliente, congelación, presiones altas, o con solventes orgánicos (acetona, alcohol) que disuelven los materiales cerosos que bloquean la entrada de agua. Al realizar el tratamiento se debe tener en cuenta el no dañar las partes esenciales de la semilla.



C.3. RUPTURA DE LATENCIA EN SEMILLAS

El objetivo de este trabajo práctico es determinar el método más apropiado para interrumpir la latencia de semillas de *Entorolobium contortisilicum* por medio del escarificado mecánico y químico.

TÉCNICA OPERATORIA

El ensayo constará de 4 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, la unidad experimental será cada semilla de *Enterolobium contortisilicum*.

Previo a cada tratamiento lavar con hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos y escurrir.

Tratamiento 1: testigo

Humedecer el papel de germinación en agua destilada. Sobre la mitad del mismo colocar 10 semillas y taparlas con la otra mitad del papel. Luego enrollar formando un tubo y colocarlo en el vaso de germinación ubicándolo en una bolsa de plástico transparente para evitar la evaporación. Llevar a la cámara de germinación a 25 °C.

Tratamiento 2: escarificado mecánico

a. Lijar los lados planos (la parte más angosta) de 10 semillas, hasta la aparición de un color claro en la zona raspada, cuidando no dañar los tejidos del endosperma y del embrión.

b. Humedecer el papel de germinación, colocar entre papel las semillas lijadas, enrollar y colocarlas en el vaso de germinación ubicándolo en una bolsa de plástico transparente y llevar a la cámara de germinación a 25 °C.

Tratamiento 3: escarificado químico con ácido sulfúrico al 98 % (15 minutos)

a. Colocar 10 semillas en un vaso de precipitado de 100 mL, agregar 5 cc de ácido sulfúrico.

b. Inclinar el recipiente y con suave movimiento circular permitir que todas las semillas se mojen completamente por espacio de 15 minutos.

c. Verter las semillas en un embudo Buchner y lavarlas con agua corriente y bicarbonato de sodio durante 3 minutos. Colocarlas en un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada. Cuando decanten las semillas dejar escurrir la mayor cantidad de solución posible. Luego pasar al segundo lavado con 25 mL de agua destilada y así hasta el 4° ó 6° lavado. Se verificará la ausencia de ácido sulfúrico con el empleo del papel tornasol.

d. Pasado este tiempo dejar que el agua escurra y poner las semillas entre papel previamente humedecido con agua destilada, enrollar y colocarlas en el vaso de germinación ubicándolo en una bolsa transparente y llevar a cámara de germinación a 25 °C.

Tratamiento 4: Ídem al tratamiento 3, pero la inmersión en ácido sulfúrico será de 40 minutos.

Es importante tener en cuenta que en el tratamiento químico se utiliza una parte de semilla y dos de ácido. La cantidad de semilla que se trate no debe pasar los 10 g para evitar un calentamiento incontrolable. Los recipientes a usar deben ser de vidrio, cerámica o madera, no de metal, ni de plástico. Debe mezclarse con cuidado ya que la agitación tiende a elevar la temperatura.

Se realizarán observaciones a los 3 y 7 días. Se contarán las semillas germinadas, se medirá la longitud de la radícula y el desarrollo de las primeras hojas y su número, registrando los datos en la planilla adjunta al final del protocolo.

Observar y comparar los distintos tratamientos, graficar, sacar conclusiones y redactar el informe final.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. xxvii. McGraw-Hill Interamericana. 522 p.
- BARCELO COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. 33, p. 543-580. Pirámide, 662 p.
- BURKART YRIS DÍAZ, J. VIERA y A. ESCOBAR (1994). Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre la germinación en semillas de *Pachecoa venezuelensis*. *Agronomía trop.* 45 (4): 561-570.
- DORAN, J. C.; BOLAND, D. J.; TURNBULL, J. W. y GUNN, B. V. (1983). *Manual sobre las semillas de acacias de zonas secas: una guía para la cosecha, extracción, limpieza, almacenamiento de la semilla y para el tratamiento que estimule la germinación de las acacias de la zona seca*. FAO. 114p.
- HARTMANN, H. T. y D. E. KESTER (1999). *Propagación de las plantas*. México: CECSA, 760 p.
- International Seed Testing Association (1985). International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. & Technol.*, 13 :299-355.
- LALLANA, V. H.; ELIZALDE, J. H. I. y F. GARCÍA (2005). Germinación y latencia de semillas y yemas. *Ayuda Didáctica U.T. n° 11*. Cátedra Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, 21 p.
- POMINO, S.; M. VACCA MOLINA (1999). *Guía de trabajos prácticos Fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, 41 p.
- VILLIERS, T. (1979). *Reposo y supervivencia de las plantas*. Barcelona: Omega, 78 p.



**Planilla para toma de datos
de ruptura de latencia en semillas**

SG	T1		T2		T3		T4	
	LR (mm)	Nº hojas	LR (mm)	Nº hojas	LR (mm)	Nº hojas	LR (mm)	Nº hojas
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

SG: Semillas germinadas; LR: longitud radicular (mm)

