

EJERCICIOS DE LABORATORIO

Título	Página
1. Estructura de la semilla	...68
2. Estimación de cosecha de semilla	...68
3. Secado del cono y extracción de la semilla	
Centroamérica	...69
India/Paquistán	...69
4. Requisitos de espacio para almacenamiento	...70
5. Muestreo	...70
6. Humedad, pureza y peso	...71
7. Calibración de los medidores eléctricos de humedad	...72
8. Pruebas de germinación	...72
9. Escarificación	...73
10. Prueba rápida: Tinción con tetrazolio	...74
11. Pruebas rápidas: Corte y extirpación del embrión	...74
12. Pruebas de salud de la semilla	...75

Ejercicio 1 — Estructura de la semilla

Objetivo:

Aprender las estructuras fundamentales de las semillas y su función en los tipos de semilla importantes.

Métodos:

1. Preremoje las muestras de semilla en agua de la llave a temperatura ambiente (o a 27 °C) de 15 a 24 horas. La imbibición suavizará los tejidos y facilitará la disección.
2. Con un cuchillo, cortaúñas o una navaja y según el tipo de semillas, córtelas cuidadosamente en una de dos formas:
 - a. A lo ancho (transversal).
 - b. A lo largo (longitudinal).Quizá sean necesarios varios cortes para exponer el embrión y otros tejidos internos.
3. Estudie los tejidos expuestos por los cortes y etiquételos en bosquejos manuales del material cortado. Determine qué tejidos son para la protección del embrión, el almacenamiento de reservas alimenticias, etc. Busque estructuras anormales, daño por insectos, etc.
4. En al menos una semilla de cada especie, trate de retirar el embrión sin dañarlo, haga un bosquejo y etiquete las partes.

Materiales:

Cortaúñas (o cuchillos), navajas, agujas de disección, una pequeña lupa, lápiz y papel, y muestras de cinco especies de semillas de árboles.

Ejercicio 2 — Estimación de cosecha de semilla

Objetivo:

Predecir la cosecha de semilla antes de la recolección al estimar el número de:

1. Semillas buenas por fruto.
2. Frutos por árbol.

Métodos:

1. Semillas buenas por fruto
 - a. Elegir frutos de semillas múltiples y recolectar 15 antes de la madurez.
 - b. Cortar los frutos a lo largo por la mitad y contar las semillas buenas visibles en cada mitad.
 - c. Secar las mitades en un horno (40 a 50 °C) para extraer las semillas y obtener un conteo real de las semillas buenas.
 - d. Calcular las ecuaciones de regresión para predecir el total de semillas a partir de los conteos de las mitades del fruto.
2. Frutos por árbol—Visitar los árboles cercanos y estimar la cosecha de semilla a partir de:
 - a. El conteo total.
 - b. Conteo de un cuarto de la copa.
 - c. Conteo de una rama muestra.
 - d. Cualquier otra forma conocida.
3. Combinar los resultados de ambos métodos para estimar el tamaño de cosecha de semilla.

Materiales:

Cortadores de conos o navajas filosas, un horno, recipientes para secado y binoculares.

Ejercicio 3a — Secado de cono y extracción de semilla (Centroamérica)

Objetivo:

Aprender cómo calcular las necesidades de semilla y fruto para un programa de plantación.

Suposiciones:

Área a plantar — 2,000 hectáreas (ha) a 1,700 árboles por hectárea.

Especie — *Pinus caribaea*

1. Todo contenido de humedad es un porcentaje del peso húmedo.
2. Existen 800 conos cerrados por hectolitro (hl) (40 kg).
3. El contenido de humedad de conos cerrados es 40 por ciento.
4. Los conos duplican su tamaño al abrirse.
5. El rendimiento tiene un promedio de 400 gramos (g) de semillas puras por hectolitro de conos cerrados.
6. Existen 68,200 semillas por kilogramo (kg).
7. La germinación en el laboratorio es del 80 por ciento; 50 por ciento de las semillas germinadas producen plántulas que pueden plantarse.
8. Los conos se colocan en el horno cuando alcanzan un contenido de humedad de 25 por ciento.
9. Las charolas de secado tienen una capacidad de 0.5 hl de conos cerrados; cada pila de ocho charolas de secado tiene 4.0 hl; pueden meterse al horno ocho pilas al mismo tiempo.
10. Toma 12 horas secar una carga completa al 10 por ciento de humedad del cono necesario para que se abran completamente.
11. Se requieren 700 kilocalorías (kcal) para calentar 1 hl de conos durante 1 hora.
12. El valor de combustible para la madera de *Casuarina equisetifolia* es 4,950 kcal por kilogramo; para los conos de *P. caribaea* 4,500.
13. Los conos abiertos de *P. caribaea* pesan 104 g por litro (l).

Preguntas:

1. ¿Cuántos conos deben recolectarse para cumplir con la meta de plantación?
2. ¿Cuánta humedad total debe perderse en el presecado (antes de entrar al horno)?
3. ¿Cuántas pilas de secado se necesitan para presecar todo al mismo tiempo?
4. ¿Cuántas cargas al horno se necesitarán?
5. ¿Cuánto tiempo tomará para que abran todos los conos?
6. ¿Cuánto combustible se necesitará con madera de *C. equisetifolia*? ¿con conos de *P. caribaea*?
7. ¿Se han recolectado suficientes conos para calentar el horno?

Ejercicio 3b — Secado de cono y extracción de semilla (India/Paquistán)

Suposiciones:

Área a plantar — 2,000 ha a 1,700 árboles por hectárea.

Especie — *Pinus roxburghii*

1. Todo contenido de humedad se expresa como porcentaje del peso húmedo.
2. Existen 400 conos cerrados por hectolitro (hl) (40 kg).
3. El contenido de humedad de conos cerrados es 40 por ciento.
4. Los conos duplican su tamaño al abrirse.
5. El rendimiento tiene un promedio de 1.2 kilogramos (kg) de semillas puras por hectolitro de conos cerrados.
6. Existen 12,000 semillas por kilogramo.
7. La germinación en el laboratorio es del 80 por ciento; 50 por ciento de las semillas germinadas producen plántulas que pueden plantarse.
8. Los conos se colocan en el horno cuando alcanzan un contenido de humedad de 25 por ciento.
9. Las charolas de secado tienen una capacidad de 0.5 hl de conos cerrados; cada pila de ocho charolas de secado tiene 4.0 hl; pueden meterse al horno ocho pilas al mismo tiempo.

10. Toma 12 horas secar una carga completa al 10 por ciento de humedad del cono necesario para que se abran completamente.
11. Se requieren 700 kilocalorías (kcal) para calentar 1 hl de conos durante 1 hora.
12. El valor de combustible para la madera de *Casuarina equisetifolia* es 4,950 kcal por kilogramo; para los conos de *P. caribaea* 4,500.
13. Los conos abiertos de *P. roxburghii* pesan 104 g por litro (l).

Preguntas:

1. ¿Cuántos conos deben recolectarse para cumplir con la meta de plantación?
2. ¿Cuánta humedad total debe perderse en el presecado (antes de entrar al horno)?
3. ¿Cuántas pilas de secado se necesitan para presecar todo al mismo tiempo?
4. ¿Cuántas cargas al horno se necesitarán?
5. ¿Cuánto tiempo tomará para que abran todos los conos?
6. ¿Cuánto combustible se necesitará con madera de *C. equisetifolia*? ¿con conos de *P. roxburghii*?
7. ¿Se han recolectado suficientes conos para calentar el horno?

Ejercicio 4 — Requisitos de espacio para almacenamiento

Objetivos:

Una vez que se conocen las necesidades anuales de semilla, deben calcularse los requisitos de espacio para almacenamiento en frío. También debe decidirse cuántos años de suministro de semilla se mantendrán como margen de seguridad: ¿1 año? ¿3 años?

Suposiciones:

1. Debe cultivar 2 millones de plántulas de *Acacia nilotica* y 3 millones de plántulas de *Pinus wallichiana* al año.
2. Se almacenará el suministro de tres años de semillas.
3. El número de semillas por kilogramo (kg) es de 7,000 para *A. nilotica* y 26,000 para *P. wallichiana*.
4. Para cada tres semillas sembradas, sólo dos producirán una plántula que pueda plantarse.
5. Las semillas se almacenarán en botellas plásticas grandes de 10 kg cada una. Las botellas miden 80 centímetros (cm) de alto y 40 cm de diámetro.
6. El diez por ciento del espacio para almacenamiento en frío son pasillos, etc.

Calcular:

1. ¿Cuántos kilogramos de cada especie se van a almacenar?
2. ¿Cuántas botellas y metros cúbicos de espacio de almacenamiento se necesitarán?
3. Repetir el cálculo no.2 si el almacenamiento es en cajas de 40 por 40 por 40 cm. A cada caja le caben 6.5 kg de semillas.
4. ¿Cuáles son las dimensiones de almacenamiento en frío mínimas necesarias para almacenar semillas en los cálculos anteriores 2 y 3?

Ejercicio 5 — Muestreo

Objetivo:

Aprender los métodos básicos para muestrear lotes a granel y algunos usos especiales de las semillas de los árboles.

Métodos:

1. Mezclar cada lote rigurosamente ya sea con una mezcladora mecánica o a mano. Para hacer esto último, esparcir las semillas en una superficie lisa y mezclar puños de lado a lado. Después vierta de un recipiente a otro.
2. Determine el tamaño adecuado de la muestra presentada (el doble de la muestra de trabajo).

3. Saque muestras usando los siguientes equipos/métodos:
 - a. Muestreador de semillas.
 - b. Separador mecánico.
 - c. División.
 - d. Extensión de mano.
4. Pese cada muestra al gramo más cercano, colóquela en una bolsa plástica y etiquete.
5. Guarde las muestras embolsadas para medir pureza, peso y humedad después.

Materiales:

Muestreador de semillas, separador mecánico, espátula, cuchara, bolsas plásticas (15 por 15 cm), marcadores y balanzas de laboratorio.

Ejercicio 6 — Humedad, pureza y peso

Objetivo:

Realizar los pasos fundamentales al medir la humedad, la pureza y el peso de una muestra presentada.

Métodos:

1. Humedad

- a. Utilizar las muestras presentadas obtenidas en el ejercicio de muestreo.
- b. Utilizar una cuchara o una espátula para sacar dos submuestras de 4 a 5 g cada una. Colocar las muestras en latas de secado. Seguir los lineamientos de Bonner (1981b).
- c. Pesar al 0.01 g más cercano y secar en hornos a 103 °C durante 17 horas.
- d. Enfriar en desecantes y volver a pesar. Si no hay desecantes disponibles, utilizar las técnicas de peso rápido para obtener el peso seco.
- e. Calcular la humedad como porcentaje del peso seco:

$$\text{porcentaje de humedad} = \frac{\text{peso húm.} - \text{peso seco}}{\text{peso húm.}} (100)$$

2. Pureza

- a. Reducir el resto de la muestra presentada al tamaño adecuado de muestra de trabajo. Para determinar el tamaño adecuado, tome al menos 2,500 semillas a un máximo de 1,000 g.
- b. Pese la muestra de trabajo (ver 3.5.1.A. en ISTA 1985).
- c. Divida la muestra en los siguientes componentes:
 - (1) Semillas puras.
 - (2) Otras semillas (otras especies).
 - (3) Materia inerte (incluye partes de semillas).
- d. Pese cada componente y expréselo como porcentaje del peso de la muestra de trabajo:

$$\text{porcentaje de semillas puras} = \frac{\text{peso de las semillas puras}}{\text{peso de toda la muestra}} (100)$$

3. Peso

- a. Use el componente de semillas puras de la prueba de pureza.
- b. Ya sea que pese y cuente todo el componente de semillas puras o use repeticiones de menor tamaño (el método de costumbre).
- c. Repita el método:
 - (1) Cuente al azar 8 repeticiones de 100 semillas cada una.
 - (2) Pese cada repetición al mismo número de decimales utilizado en la determinación de la pureza.
 - (3) Obtenga el promedio del peso de 100 semillas y multiplique por 10 para el peso de 1,000 semillas.
 - (4) Convierta a semillas puras por kilogramo de la siguiente manera:

$$\frac{1,000,000}{\text{peso de 1,000 semillas}} = \text{semillas por kg}$$
- d. En pruebas oficiales, la variación debe estimarse de la siguiente manera:

$$(1) \text{ Varianza} = \frac{n \sum (x^2) - (\sum x)^2}{n(n-1)}$$

$$(2) \text{ Desviación estándar } (o) = \sqrt{\frac{\text{varianza}}{(Q)}}$$

$$(3) \text{ Coeficiente de variación (CV)} = \frac{o}{x} (100)$$

(x = peso promedio de 100 semillas, ver 3.c. anterior)

(4) Si CV es igual o menor a 4.0, la respuesta en el “3.c.” anterior es aceptable. Si CV es mayor a 4.0., tome 8 repeticiones más y vuelva a realizar el proceso, usando las 16 repeticiones en los cálculos.

Materiales:

Una espátula, una cuchara, balanzas de laboratorio, un horno, latas de secado, desecantes, fórceps y lápiz y papel.

Ejercicio 7 — Calibración de los medidores eléctricos de humedad

Objetivo:

Demostrar un método sencillo para elaborar tablas de calibración para medidores eléctricos de humedad. Estos métodos funcionan bien con cualquier tipo de medidor.

Métodos:

1. Obtener de 4 a 5 kg de semillas de un lote de la especie deseada; mezclar bien.
2. Separar en 10 muestras al azar de unos 400 g cada una.
3. Ajustar la humedad de las muestras para que abarque el rango de contenido de humedad que se encontrará (aproximadamente 5 a 20 por ciento). Hacer esto secando varias muestras (variar las condiciones de secado) y añadiendo agua a otras (variar la cantidad de agua).
4. Colocar cada muestra en una bolsa plástica y colocar la bolsa en un refrigerador durante 1 semana para permitir que la humedad se equilibre.
5. Después de 1 semana, retire las muestras y déjelas a temperatura ambiente (2 a 3 horas).
6. Tome la lectura del medidor en el lote más seco de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Registre el valor e inmediatamente saque dos submuestras de 5 g para determinaciones de contenido de humedad en el horno. Siga las instrucciones anteriores.
7. Repita el paso no. 6 con las otras muestras en el orden ascendente de contenido de humedad.
8. Trace los datos en una gráfica: porcentaje de humedad del horno vs. lectura del medidor. Utilice esta curva para relacionar las futuras lecturas del medidor al contenido real de humedad para esta especie en particular.
9. Para una calibración más precisa, elabore una curva de regresión (porcentaje de humedad del horno en las lecturas del medidor) y calcule los valores para la tabla de calibración. Para una regresión debe haber más de 10 observaciones disponibles, de modo que deben obtenerse otras 10 muestras para repetir todo el proceso.
10. Este procedimiento debe realizarse por separado para cada especie a analizar.

Materiales:

Un medidor eléctrico, una cuchara, balanzas de laboratorio, un horno, recipientes para pesar, desecantes, bolsas plásticas y papel para graficar.

Ejercicio 8 — Pruebas de germinación

Objetivo:

Aprender los pasos fundamentales en la prueba de germinación y a realizar pruebas sencillas en algunas especies importantes. Debido a la duración de este curso, puede que no sea posible una prueba completa. Al empezar con algunas muestras antes de hablar de pruebas extensas, debe surgir cierta germinación y estar disponible para evaluación.

Métodos:

1. Preremoje las muestras de semilla en agua de la llave a temperatura ambiente (27 °C) de 15 a 24 horas.
2. Divida las muestras en 2 reproducciones de 20 a 50 semillas cada una, según la especie. Si se utilizan semillas de *Eucalyptus* sp., pese dos reproducciones de acuerdo con las reglas de la ISTA (1985).
3. La mitad del grupo esterilizará la superficie de sus muestras con una solución de blanqueador de cloro al 10 por ciento, y la otra mitad no. El tratamiento consiste en un remojo de 5 a 10 minutos, seguido de un enjuague bajo el chorro de agua de la llave.
4. Las especies con semillas duras (p. ej., *Acacia*) se escarificarán con un cuchillo, navaja o papel de lija en el extremo de la radícula como se determinó en el Ejercicio 1.
5. Coloque las reproducciones en platos de vidrio o de plástico sobre papel filtro húmedo o en otro medio adecuado. El papel debe estar húmedo, pero no tan mojado que deje agua en la depresión cuando se aplasta con el dedo. Coloque tapas a los platos; si no hay tapas use envoltura plástica.
6. Etiquete todos los platos y colóquelos en el germinador o bien a temperatura ambiente constante. Si no se tienen disponibles las instalaciones, coloque los platos en una mesa bajo focos al centro de la habitación. Si no se tienen focos disponibles, colóquelos cerca de ventanas que brinden una buena luz natural.
7. Revise la humedad de los platos todos los días; añada agua si están secos. La germinación es evidente en unos 7 días. Registre la germinación normal, la germinación anormal y los indicios de problemas de insectos o enfermedades.

Materiales:

Un cuchillo, una lima pequeña, papel de lija para escarificación, blanqueador de cloro, papel secante para germinación, platos (10 por estudiante), marcador para vidrio y balanzas de laboratorio. Es deseable un germinador o temperatura ambiente constante pero no necesario.

Sugerencia de especies:

Pinus, *Acacia* o otra leguminosa, *Eucalyptus*, y dos especies autóctonas.

Ejercicio 9 — Escarificación

Objetivo:

Demonstrar la efectividad relativa de las técnicas sencillas de escarificación que pueden utilizarse en las pruebas de semillas.

Métodos:

1. Contar 120 semillas de una especie con semillas duras y dividir las en 8 submuestras de 15 semillas cada una.
2. Escarificar 2 reproducciones de 15 con cada uno de los siguientes procedimientos:
 - a. Limar a lo ancho de la cubierta de la semilla lo suficiente como para hacer una muesca en la misma.
 - b. Usar cortaúñas, tijeras o un cuchillo para cortar la cubierta de la semilla por un lado.
 - c. Lijar la semilla lo suficiente como para cortar la cubierta de la semilla del extremo de la radícula.
 - d. Las otras dos muestras serán controles sin tratamiento.
3. Colocar las muestras escarificadas en papel secante húmedo en platos y cubrirlas al igual que en la prueba de germinación. Si hay espacio, coloque todos los platos en el germinador. Si no, colóquelos en una mesa con buena luz y déjelos para observación durante el resto del curso.
4. Cuente periódicamente el número de semillas que germinan y el número de semillas hinchadas. La segunda condición confirma que se ha absorbido agua, pero que algo más está obstruyendo la germinación. Reporte ambas condiciones como porcentaje del número total de semillas en la prueba.

Materiales:

Cuatro platos de vidrio o plástico, papel secante para germinación, lima, cortaúñas o tijeras, papel de lija grueso y marcadores.

Ejercicio 10 — Prueba rápida: Tinción con tetrazolio

Objetivo:

Aprender las técnicas básicas de la prueba de tinción con tetrazolio (TZ) para viabilidad.

Métodos:

1. Obtener dos muestras de 50 semillas a partir de las semillas que han estado remojando en agua de la llave durante 24 horas.
2. Preparar una solución de TZ al 1 por ciento disolviendo 10 g de sales TZ (cloruro o bromuro) en 1,000 ml de agua destilada (pH 6.5 a 7.0). Si el pH del agua se encuentra fuera de este rango, debe prepararse una solución amortiguadora de la siguiente manera:
 - a. Preparar dos soluciones:
 - (1) Solución 1 — Disolver 9.078 g KH_2HPO_4 en 1,000 ml de agua.
 - (2) Solución 2 — Disolver 11.876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1,000 ml de agua.
 - b. Mezclar dos partes de solución 1 con tres partes de solución 2.
 - c. Disolver 10 g de sales TZ en 1,000 de la solución amortiguadora para hacer una solución al 1 por ciento.
3. Abrir cuidadosamente las semillas embebidas para exponer el embrión por completo. El embrión puede retirarse completamente, como en el ejercicio de la prueba de embrión.
4. Inmersa los embriones completamente en la solución TZ e incube a 30 °C, en la oscuridad, de 15 a 24 horas (dependiendo de la especie y la condición de las semillas).
5. Para la evaluación, decante la solución TZ, enjuague las semillas en agua y estudie los embriones en una superficie húmeda. La tinción moderada de rojo señala tejidos viables, una fuerte tinción de rojo indica tejidos dañados, y la ausencia de cualquier tinción indica tejidos no viables. Las interpretaciones de las tinciones pueden variar con la especie. Como orientación, consultar la ISTA (1985).
6. Compare los resultados con los resultados de otras pruebas rápidas o los resultados de la prueba de germinación.

Materiales:

Equipo de disección, platos, sales de tetrazolio, amortiguadores (en caso necesario) y una incubadora oscura de temperatura constante.

Ejercicio 11 — Pruebas rápidas: Corte y extirpación del embrión

Objetivo:

Aprender las técnicas de la prueba de corte para estimación de la viabilidad y extirpación del embrión para la prueba del mismo nombre.

Métodos:

1. Prueba de corte
 - a. Obtener muestras de 50 semillas de varios lotes de semilla y dividirlos en sublotés de 25 cada una.
 - b. Cortar las semillas por la mitad, usando un corte transversal por el centro de las semillas. Clasificarlas como viables, dañadas por insectos o enfermedades, o huecas. Promediar los resultados de los sublotés.
2. Prueba de extirpación del embrión
 - a. Obtener muestras de 50 semillas de varios lotes de semilla que han estado remojando en agua de la llave de 24 a 48 horas a temperatura ambiente, y dividirlos en sublotés de 25 como antes.
 - b. Con una navaja o bisturí, corte cuidadosamente a través de la cubierta y el endospermo (si lo hay) y exponga el embrión.

- c. Desprenda cuidadosamente al embrión de los tejidos que le rodean con las agujas de disección u otros instrumentos puntiagudos. Evite dañar al embrión.
- d. Coloque cuidadosamente el embrión extirpado en papel filtro húmedo en un recipiente con tapa, como en una caja petri. Mantenga a 20 °C bajo luz hasta que pueda hacerse una evaluación (por lo general en 14 días).
- e. Los embriones enfermos o dañados no deben colocarse en recipientes. Las semillas huecas deben clasificarse como tales y no reemplazarse en la prueba.
- f. Debe desinfectarse la superficie de trabajo y todos los instrumentos para reducir las infecciones por moho con una solución de etanol al 50 por ciento. Los instrumentos deben sumergirse entre cada disección.
- g. Los embriones deben clasificarse en 14 días de la siguiente manera:
 - (1) Viables
 - (a) Embriones que germinan.
 - (b) Embriones con uno o más cotiledones que muestran crecimiento o verdor.
 - (c) Embriones que permanecen firmes, ligeramente agrandados, y ya sea de color blanco o amarillo según la especie.
 - (2) No viables
 - (a) Embriones que rápidamente desarrollan moho, se deterioran y pudren.
 - (b) Embriones degenerados.
 - (c) Embriones que muestran una decoloración café o negra, un color grisáceo, o una apariencia blanca acuosa.
 - (d) Semillas en las que el embrión está muerto, no existe o está deforme.
- h. Compare sus resultados con los resultados de la prueba de corte.

Materiales:

Navajas, bisturí, agujas de disección, cajas petri, papel filtro y etanol.

Ejercicio 12 — Pruebas de salud de la semilla

Objetivo:

Aprender las técnicas básicas de las pruebas de salud de la semilla.

Antecedentes:

Las pruebas de salud de las semillas son importantes por tres razones:

1. El inóculo de la semilla puede ocasionar enfermedades en el campo.
2. Los lotes de semilla importados pueden introducir nuevas enfermedades, de modo que pueden requerirse pruebas para cumplir con las reglamentaciones de cuarentena.
3. Las pruebas de salud de la semilla pueden ayudar en la evaluación de las plántulas y también a determinar las causas de una mala germinación o el establecimiento en el campo. Complementa las pruebas de germinación.

La **salud de la semilla** se refiere principalmente a la presencia o ausencia de organismos que ocasionan enfermedades (p. ej., hongos, bacterias y virus) y plagas de animales (p. ej., gusanos e insectos). Sin embargo, las condiciones fisiológicas tales como la deficiencia de elementos trazas también pueden presentar complicaciones. La **incubación** mantiene a las semillas en un medio ambiente favorable para el desarrollo de patógenos o de síntomas.

El pretratamiento es cualquier tratamiento físico o químico de laboratorio de la muestra de trabajo antes de la incubación, que se realiza con el único fin de facilitar la realización de pruebas.

Muestra:

1. La muestra presentada completa puede ser la muestra de trabajo, dependiendo de la prueba.
2. La muestra de trabajo normalmente es de 400 semillas puras o su equivalente en peso.
3. Se siguen las reglas de muestreo.
4. Las repeticiones que contienen un número específico de semillas, en caso necesario, se toman al azar de la

submuestra después de mezclarla rigurosamente.

Indicaciones generales:

1. Utilice diferentes métodos de prueba según los factores como patógenos o las condiciones a investigar, la especie de las semillas y los propósitos de la prueba. Consultar la ISTA (1966, 1985).
2. Estudie la muestra de trabajo con incubación o sin ella.
 - a. Estudie sin incubación. (Este método no proporciona ningún indicio de la viabilidad del patógeno).
 - (1) Estudie la muestra con un estereomicroscopio para indicios generales de enfermedades o plagas.
 - (2) Estudie las semillas embebidas. Inmersa la muestra de trabajo para que los cuerpos fructíferos, los síntomas o las plagas sean más fáciles de ver y para fomentar la liberación de esporas. Observe con el estereomicroscopio después de la imbibición.
 - (3) Estudie los organismos que se eliminan en el lavado. Sumerja la muestra de trabajo en agua con un agente humectante o en alcohol, agite para eliminar las esporas, hifas, nematodos, etc. Estudie el exceso de líquido con un microscopio compuesto.
 - b. Estudie después de la incubación.
 - (1) Después de un período específico de incubación, inspeccione la muestra de trabajo. Advierta la presencia de organismos de enfermedades o plagas en las semillas o las plántulas. Use papel secante, arena o agar como medio de incubación.
 - (2) Use el papel secante cuando sea necesario para cultivar los patógenos de las semillas o para estudiar las plántulas. Las semillas pueden o no haber sido penetradas. Espacie mucho para evitar una segunda diseminación de organismos. Utilice luz conforme sea necesario para estimular la esporulación. Observe bajo el microscopio.
 - (3) La arena o el abono artificial puede utilizarse para ciertos patógenos. Por lo general las semillas no están pretratadas, pero se espacian mucho en el medio. La incubación es favorable para la expresión de los síntomas.
 - (4) Use placas de agar para obtener un crecimiento identificable de organismos a partir de las semillas.
 - (a) La esterilidad es necesaria; normalmente se pretratan y espacian las semillas.
 - (b) Identifique las colonias características y las esporas con el microscopio.
 - (c) Utilice inhibidores de luz y germinación.
3. Estudie las plantas en crecimiento. Cultive plantas de semillas y estúdielas buscando síntomas de enfermedades para determinar la presencia de bacterias, hongos o virus. Use el inóculo del lote de semillas de prueba para hacer pruebas de infección en las plántulas saludables.

Cálculos y expresiones de los resultados:

1. Expresé los resultados como porcentaje de las semillas afectadas o como número de organismos en el peso de la muestra estudiada.
2. Reporte los resultados en el certificado ISTA.
 - a. Reporte el método de prueba.
 - b. Reporte los pretratamientos.
 - c. La ausencia de una prueba de salud no implica una condición de salud satisfactoria.

Ejemplo de prueba específica — Hongo que causa el cancro:

1. Adaptado de Anderson (1986b).
2. Método de papel secante, muestra de 400 semillas.
 - a. Caldo de pentacloronitrobenzoceno (PCNB)

Combine peptona, 15 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g; KH_2PO_4 , 1 g; terraclor, 1 g con 1 l de H_2O destilada. Mezclar bien utilizando un agitador magnético. Esterilice en autoclave durante 15 minutos. Después de esterilizar, coloque el matraz en el agitador magnético y mezcle lentamente hasta que la solución se enfríe a temperatura ambiente o ligeramente tibia. Añada 1 g de sulfato de estreptomina y de 1 a 2 g de sulfato de neomicina en condiciones estériles y mezcle.
 - b. Coloque 25 semillas en papel secante azul en contenedores plásticos. Aplaste las semillas con un pedazo de plástico esterilizado cortado al tamaño de la abertura de la caja plástica. Rocíe las semillas y el papel secante con

el caldo PCNB.

- c. Incube 14 días a 20 °C o hasta que las colonias tengan un diámetro de 2 cm.
 - d. Inspecciones todas las semillas buscando colonias de lento crecimiento, granulares blancas. Revise cada colonia sospechosa con un microscopio de luz a un aumento de 100 a 400 buscando microconidias y polifialides. Seleccione hongos de la superficie de la semilla, no de la superficie del papel. Divida las semillas en 4 grupos de 100 para propósitos del reporte.
3. Método de agar.
- a. Prepare agar fresco de dextrosa y papa (PDA) (rinde 1 l).
 - (1) Limpie y corte en cuadritos una papa de tamaño medio.
 - (2) Coloque la papa en cuadritos en un vaso de precipitado con 500 ml de H₂O destilada. Esterilice en autoclave.
 - (3) En un matraz, agregue 20 g de dextrosa y 17 g de agar a 500 ml de H₂O destilada.
 - (4) Coloque la solución de dextrosa/agar en el agitador magnético y a calor bajo.
 - (5) Filtre las papas cocidas a través de dos capas de tela de estopilla para obtener al menos 200 ml de compuesto acuoso.
 - (6) Anote la cantidad de compuesto acuoso y viértala en el matraz con la solución de dextrosa/agar.
 - (7) Añada suficiente H₂O destilada para que la cantidad de la solución sea 500 ml (p. ej., si hay 200 ml de compuesto acuoso, añada 300 ml de H₂O destilada).
 - (8) Coloque la solución en el autoclave y esterilice durante 15 minutos. Para acidificar el medio, añada 20 gotas de ácido láctico al 50 por ciento para obtener un pH de 4.7.
 - b. Aísle los hongos externos de la semilla, muestra de 25 semillas.
 - (1) Coloque todas las semillas en el PDA acidificado (pH 4.7).
 - (2) Incube 14 días a 20 °C.
 - (3) De ser posible, observe el crecimiento de hongos diariamente e identifíquelos.
 - c. Aísle los hongos internos de la semilla, muestra de 25 semillas.
 - (1) Esterilice la superficie de semillas enteras en etanol al 70 por ciento durante 10 minutos. Mezcle las semillas cada 2 minutos.
 - (2) Bajo condiciones estériles, corte y abra cada semilla y elimine la mitad del material del centro.
 - (3) Coloque la mitad (material del centro) en el PDA acidificado (pH 4.7) usando la técnica estéril.
 - (4) Incube 14 días a 20 °C.
 - (5) De ser posible, observe el crecimiento de hongos diariamente e identifíquelos.