

III. ENSAYO DE GERMINACION

A) OBJETO O DEFINICIÓN.

El objeto de un ensayo de germinación es determinar el porcentaje de semillas puras de una muestra dada, capaces de producir gérmenes normales; es decir, gérmenes susceptibles de proseguir normalmente su desarrollo en plena tierra y en condiciones favorables. No basta, pues, determinar el número total de gérmenes obtenidos en el laboratorio por el método más favorable. No se deben considerar como germinadas sino las semillas que hayan producido gérmenes normalmente desarrollados, sanos y vigorosos.

El porcentaje de estas semillas normalmente germinadas se llama "fácultad germinativa".

B) INSTRUCCIONES PARA LOS ENSAYOS DE GERMINACIÓN.

1. *Instrucciones generales.*

Todo ensayo de germinación debe hacerse con semillas puras, apartadas en el análisis de pureza. Si la muestra va a examinarse únicamente desde el punto de vista de la germinación, no está permitido tomar directamente de la muestra recibida la semilla necesaria para el ensayo. Es preciso formar primero una muestra media, en cantidad suficiente, de la que se toma el número de granos puros necesarios, después de separados de las impurezas.

En todos los casos, el ensayo de germinación recaerá sobre 400 granos, por lo menos, de una muestra bien mezclada, contados sin escogerlos. Las semillas se ensayan por series de 100, para que se pueda controlar la uniformidad de las condiciones de germinación.

Debe cuidarse de que las semillas queden igualmente repartidas sobre substrátum y de que tengan bastante holgura, para que no queden en contacto durante el proceso germinativo.

Los ensayos de germinación serán efectuados según el método que mejor convenga a las semillas sometidas al análisis. Los medios seguidos para procurar las condiciones favorables a la germinación pueden variar con las circunstancias locales,

pero no hay que perder nunca de vista las condiciones generales necesarias para este proceso germinativo. No parece oportuno dar reglas rigurosas e inmutables para los ensayos.

La humedad, la aireación, la temperatura y la luz son, para la mayor parte de las semillas, los factores esenciales de la germinación. La naturaleza del substrátum o del germinador que deba emplearse queda a la conveniencia de cada uno; pero siempre deberá poderse modificar o regular el grado de humedad, de aireación, de temperatura y de luz.

La finalidad del ensayo de germinación, según hemos señalado anteriormente, es determinar el porcentaje de semillas capaces de dar gérmenes que, en plena tierra y condiciones favorables, sean susceptibles de proseguir normalmente su desarrollo. El envejecimiento de las semillas, las defectuosas condiciones de conservación, etc., producen frecuentemente una disminución del vigor de las semillas al germinar en tierra. En el laboratorio, la germinación de estas mismas semillas es, en general, lenta e irregular. También, en tales casos, el ensayo de germinación debe ser repetido y complementado por un ensayo de germinación en tierra o por la determinación del vigor de los gérmenes (ver apartado III, números 9 *a*) y 9 *b*). Para las muestras que germinen normalmente, el ensayo de germinación en tierra o la determinación del vigor de los gérmenes no se realizan sino a petición del remitente.

2. *Conteo de gérmenes.*

En los ensayos de laboratorio, las semillas germinadas deben contarse y retirarse de los germinadores en fechas determinadas. Los días señalados para el primero y último conteo son indicados en la tabla primera. La energía germinativa (número de semillas germinadas al realizar el primer conteo) y la facultad germinativa de las semillas deben expresarse en forma de porcentaje y por números enteros.

Cuando en el día fijado para la determinación de la energía germinativa los germinadores dan un porcentaje elevado de semillas, con sólo la radícula visible (en totalidad o en parte) y cuyos cotiledones están todavía recubiertos por el tegumento, se puede, excepcionalmente, diferir el conteo un día o dos como

máximo, indicando en el registro de germinación este aplazamiento, al tiempo que el porcentaje de granos germinados.

Para especies de germinación lenta, si al terminar el ensayo quedan semillas por germinar que parezcan frescas, luego de un examen atento del embrión, el número de dichas semillas debe mencionarse en el boletín de análisis como semillas posibles no germinadas. Si la germinación se retrasa por la incompleta madurez de las semillas, se recurre a un enfriamiento previo o a cualquier otro tratamiento apropiado, según se dice más adelante. Este tratamiento debe mencionarse en el boletín de análisis.

La exactitud de semillas germinadas se comprobará mediante el conteo de las que quedan en las germinadoras. El total de ambas cifras debe dar el número inicial de semillas.

Para las semillas de remolacha se determina el porcentaje de glomérulos que produjeron gérmenes normales. Atendiendo a petición especial se determina también y se indica en el boletín de análisis el número de gérmenes por cien glomérulos o por kilo de mercancía.

3. *Apreciación de los gérmenes.*

La apreciación exacta del valor de los gérmenes supone un perfecto conocimiento de los obtenidos, de una parte, en las condiciones artificiales del laboratorio, y de otra, en tierras; conocimiento que sólo se adquiere por un profundo estudio comparativo de los gérmenes.

Las indicaciones que siguen deben servir de directrices o normas para la apreciación de los gérmenes obtenidos en las condiciones artificiales del laboratorio.

Se debe considerar como:

A. *Gérmenes normales.*—Todos los gérmenes que parezcan susceptibles de producir plantas normales en un ensayo en tierra, a saber:

a) Gérmenes cuyos cotiledones y radícula estén normalmente desarrollados y bien unidos.

b) Gérmenes en los que, sólo en pequeñas proporciones, uno de los cotiledones o ambos están rotos o heridos.

B. *Gérmenes sin valor.*—Todos los gérmenes que parezcan

incapaces de producir plantas normales en un ensayo en tierra. Esta categoría comprende:

a) Gérmenes rotos:

1. Gérmenes en que ambos cotiledones están partidos.
2. Gérmenes en que una parte de la radícula está rota (se hayan desarrollado o no eventualmente raíces adventicias al término del ensayo).
3. Gérmenes cuya radícula presenta una marcada estrangulación.

b) Gérmenes atacados, aunque sea parcialmente, de podredumbre, si la radícula o los cotiledones son alterados hasta el punto de no poder cumplir sus funciones vegetativas normales (a menos que sea evidente que la podredumbre ha sido aportada por la proximidad o vecindad de una semilla podrida).

c) Gérmenes anormales. Se entienden por tales:

1. Gérmenes en los que, al final del ensayo de germinación, no se observe ningún desarrollo, aunque el tegumento de la semilla esté desgarrado y los cotiledones estén o no netamente coloreados en verde.

2. Gérmenes donde la gémula o la radícula son de apariencia débil y enfermiza.

3. Gérmenes de desarrollo anormal a consecuencia de enfermedades propagadas por semillas, a excepción de gérmenes de remolacha, atacados por el "Phoma", y presentando manchas oscuras, o por falta de vitalidad.

En particular, son consideradas como anormales:

- I. Las semillas de crucíferas ("Brassica", "Raphanus", sp., etcétera), cuando:

- 1.º Los gérmenes enteramente desarrollados estén podridos o enmohecidos.

- 2.º Los gérmenes están enteramente desarrollados, pero la radícula se encuentra podrida en parte y desprovista de pelos absorbentes. En ciertos casos la parte podrida ha casi desaparecido, quedando únicamente visible la extremidad, a veces hinchada, de aquélla.

- 3.º Los gérmenes están enteramente desarrollados, pero la raíz es anormalmente filiforme en su totalidad o en parte.

- 4.º Los gérmenes están enteramente desarrollados, pero tienen aspecto translúcido, total o parcialmente.

5.º Los gérmenes están enteramente desarrollados, pero presentan gran número de manchas oscuras.

6.º Los gérmenes están enteramente desarrollados, pero los cotiledones son de tamaño anormal y la radícula es muy pequeña.

7.º Los gérmenes presentan la radícula total o parcialmente desprendida del tegumento del grano, pero aquélla está podrida en toda su parte visible.

8.º Los gérmenes presentan anomalías de todas clases, que es imposible definir de una manera precisa (por ejemplo, los cotiledones enrollados sobre sí mismos, el tallo hipocotileo en la misma disposición, etc.).

II. Los gérmenes de cebolla, para los que la extremidad de la raíz aparezca truncada o filiforme (atacada o no de podredumbre bacteriana) y desprovista de pelos absorbentes.

III. Los gérmenes de lechuga en que la extremidad de la raíz esté coloreada de oscuro o que muestren manchas moreno-oscuras en los cotiledones o en el eje hipocotileo.

4. *Substrato: Germinadores.*

Los medios de germinación que a continuación se indican son los más corrientemente empleados.

A) Para las semillas pequeñas:

a) Papel secante (papel filtro o celulosa) de buena capilaridad, libre de sustancias químicas tóxicas y de principios colorantes solubles; las semillas muy pequeñas pueden colocarse simplemente sobre papel filtro; las más gruesas, dentro de sobres o bolsas de papel filtro, doblado de distintas maneras.

b) Pocillos o recipientes de porcelana porosa o de tierra cocida, rodeados de agua o puestos sobre arena húmeda. La ventaja de este método sobre la mayoría de los ensayos efectuados con papel filtro estriba en que el grado de humedad puede mantenerse más constante, sin que intervenga frecuentemente el analizador. No obstante, el éxito de este método depende en mucho del grado de porosidad de los germinadores.

B) Para las semillas gruesas:

Tiras anchas de papel secante, dobladas sobre sí parcialmente para cubrir a las semillas. Las semillas gruesas necesitan más humedad y, merced a la mayor rigidez del substrato, tienen con la superficie húmeda un mayor contacto.

C) Para guisantes, alubias, cereales y semillas análogas:

Ofrece con frecuencia ventajas emplear en el laboratorio arena o tierra, situada en platos de loza o recipientes análogos, porque en este "substrato" la humedad está uniformemente repartida y el desarrollo de los hongos se reduce notablemente. Debe emplearse arena pura o una tierra arenosa esterilizada que embeba una cantidad de agua igual a las 70 centésimas partes de su capacidad máxima de absorción.

5. *Humedad y aireación.*

Hay que cuidar de que la humedad no sea excesiva, porque se haría muy difícil el acceso de aire a las semillas. El substrato estará siempre suficientemente húmedo para atender a la necesidad de agua de las semillas, pero esta humedad no debe ser nunca tal que aquéllas se bañen en el agua. Algunas especies ("Beta" y "Capsicum", por ejemplo) son muy sensibles a un exceso de humedad, y tratándose de ellas no debe nunca aparecer el agua en la superficie del papel que las cubre cuando éste se oprime con el dedo.

La cantidad de humedad necesaria para el comienzo de la germinación depende de la naturaleza y condiciones del germinador utilizado. Luego el analista, siempre que lo estime preciso, humedecerá de nuevo los germinadores.

La velocidad de evaporación del agua de los germinadores depende, en su mayor parte, de la humedad de la atmósfera en que se realiza el ensayo. Para evitar una desecación muy rápida del substrato se recomienda colocar, en la parte inferior de ciertos termostatos, platos o depósitos grandes llenos de agua.

6. *Temperatura y luz.*

Disponer de las temperaturas convenientes es para numerosas especies uno de los factores más importantes para el éxito de los ensayos de germinación. No es preciso sostener una temperatura rigurosamente fija en las condiciones artificiales en que se hacen los ensayos (la temperatura varía bastante en las circunstancias naturales), pero ciertas condiciones generales de temperatura deben quedar satisfechas. Por dicha causa es necesario observar y comprobar siempre la temperatura. Las cin-

co temperaturas que se indican a continuación son adecuadas para la mayor parte de los ensayos.

A) Una temperatura casi constante de 15 a 18-20° C. (o sea la temperatura aproximada de la habitación) para aquellas semillas cuya germinación se retrasa para temperaturas superiores a 20° C.

B) Una temperatura baja, de unos 10-12° C., o menos aún, para todas las semillas cuya germinación pueda retrasarse con una temperatura más elevada.

C) Una temperatura elevada, de unos 30° C., para semillas cuya germinación la exige.

D) Temperaturas alternadas.

a) Una temperatura de 18-20° C. durante unas dieciocho horas, y otra de 30° C. durante otras seis horas aproximadamente.

b) Una variación de unos 12° C. a 35° C., aproximadamente, en la temperatura del agua en el aparato de Copenhague, para las semillas que germinan mejor con límites amplios de temperatura.

Estas variaciones de temperatura pueden realizarse por los métodos siguientes:

a) Variación brusca de temperatura, cambiando los germinadores de termostato o de habitación, pero permaneciendo el termostato o el local a sus temperaturas respectivas, o bien:

b) Variación lenta de la temperatura por modificación de la que tenía la sala o el termostato.

Los ensayos defectuosos de germinación, imputables a temperaturas desfavorables, se deben casi siempre a que aquéllas son demasiado elevadas. Esto se observa, sobre todo, para las semillas de cereales, de lupulino, de cebolla, de perejil y de lechuga.

Numerosas especies germinan más de prisa y en proporción más elevada cuando están expuestas a la luz. La germinación puede realizarse a insolación directa, a la luz difusa (termostato colocado a la luz del día) o por alumbrado artificial. En todos los casos es muy importante que tengan las semillas, durante su exposición a la luz, las condiciones de temperatura convenientes.

7. *Tratamientos especiales.*

Es ventajoso a veces activar el proceso de germinación por uno de los tratamientos siguientes:

a) *Baño previo:*

Las semillas de algunas especies necesitan para germinar tal cantidad de agua que el substrato no puede proporcionarles toda la necesaria. En tal caso se recomienda poner previamente a remojo las semillas, debiendo cuidar de que el tiempo de la inmersión no sea perjudicial al proceso germinativo, y asimismo de que la temperatura del agua no pase de la habitual del ensayo. A veces el estado sanitario de las semillas no hace aconsejable tal remojado.

b) *Enfriamiento previo:*

Para ciertas semillas de cosecha reciente puede ser ventajoso someterlas, los primeros días del ensayo de germinación, a una temperatura aproximada de 10° C., terminando aquél a la temperatura habitual. Para que germinen las semillas de algunas especies es indispensable someterlas secas a la temperatura de cero grados durante varios días antes de ponerlas en el termostato. Este tratamiento debe indicarse en el boletín internacional de análisis.

c) *Desección:*

La madurez de las semillas recientemente recolectadas se acelera frecuentemente de modo apreciable por su desección. Se recomienda a este efecto una temperatura que no pase de 40° C., coincidente con una buena aireación. Una desección intensa durante cinco a siete días es suficiente, en general, para que desaparezcan las causas de retraso de la germinación. De este tratamiento se hará referencia en el boletín internacional de análisis.

d) *Incisión:*

Para activar la germinación de semillas recientemente recolectadas y que no estén completamente maduras se admite (y es práctica muy extendida) hacerles una pequeña incisión. La operación consiste en seccionar o pinchar la extremidad de la semilla opuesta al embrión. El tratamiento debe mencionarse en el boletín internacional de análisis.

e) *Tratamientos químicos:*

No se autorizan tratamientos químicos para acelerar la germinación de las semillas, pero se permite someterlas a la acción de los desinfectantes empleados corrientemente en agricultura para prevenir determinadas enfermedades. Debe mencionarse en el boletín internacional de análisis el procedimiento utilizado en

cualquier desinfección de semillas e indicar siempre la facultad germinativa de las semillas no tratadas.

8. Aparatos especiales.

a) *Germinadores con campana de vidrio:*

El dispositivo de campanas de vidrio es muy corrientemente empleado. Este aparato, en su forma actual, se compone de una cubeta de cinc cubierta de placas metálicas inoxidables o de vidrio algo grueso. Unas y otras están agujereadas y sobre ellas se coloca un substrato apropiado, que recibe las semillas y se mantiene húmedo por medio de una mecha que se sumerge en el agua de la cubeta.

Estos pequeños germinadores, que componen, a veces en crecido número, el aparato germinador, consisten en un como cristallizador de vidrio, taladrado en su centro y cubierto en su fondo de dos o tres rodajas de papel celulosa, sobre el que se colocan las semillas. Dicho substrato se mantiene húmedo mediante una mecha que entra por su extremo inferior en el agua de la cubeta y que se une por el otro extremo con una rodaja, hecha con hilo de algodón, que encaje en el fondo del cristallizador, y encima de la cual se superponen las rodajas de papel celulosa. Las semillas, depositadas con el debido espaciamento sobre dicho papel, van cubiertas por una campanita de vidrio, que reposa sobre el borde del substrato, provista de un orificio para la aireación, y cuyo objeto es evitar una evaporación excesiva. Existen diferentes modificaciones del aparato original Jacobsen, o dispositivo de campanas de vidrio, por ejemplo, el aparato Copenhague antes descrito.

b) *Estufas de germinación: termostatos.*

Otro tipo de aparato, muy empleado para las germinaciones en la oscuridad o a la luz difusa, es el termostato cerrado o estufa de germinación. Dicho aparato está constituido por una caja espaciosa de dobles paredes protegida contra las variaciones de temperatura por capas de aire interpuesto, tabiques a base de amianto, corcho impregnado de algún producto aislante o una cubierta de madera. Para germinaciones a baja temperatura puede colocarse en la parte alta de la estufa un recipiente conteniendo trozos de hielo o un aparato refrigerador que produzca el

frío deseado, sea directamente o bien indirectamente, por medio de una instalación frigorífica.

c) *Aparato de Rodewald:*

Es un depósito de cinc cubierto de vidrio y expuesto a la luz directa; su fondo está lleno de arena húmeda o de agua, y en ésta o sobre aquélla se colocan unos pequeños recipientes de porcelana porosa destinados a las semillas. El aparato se calienta por gas o por electricidad.

9. *Ensayo de germinación en tierra (en invernadero o en estufa) y determinación del vigor de los gérmenes por el método del ladrillo triturado.*

a) *Ensayos de germinación en tierra:*

Como los ensayos de germinación se realizan en las condiciones artificiales de los laboratorios, es útil a veces, en los casos dudosos, efectuar ensayos complementarios en tierra, para comprobación de aquéllos. (Es el caso, por ejemplo, de muestras cuyos resultados de germinación en el laboratorio presentan diferencias marcadas, debidas a la presencia de buen número de gérmenes más o menos anormales).

No es preciso emplear un tipo de tierra determinado siempre que se satisfagan las condiciones de humedad, aireación y temperatura favorables para la germinación de las semillas. Se elegirá una tierra capaz de almacenar en cantidad suficiente el agua que precisen aquéllas, que permita la circulación y que no se endurezca. Una mezcla, a partes iguales de buena tierra húmifera de jardín (prácticamente sin semillas de malas hierbas) y de arena pura de granos angulosos constituye un suelo conveniente. En todos los casos deberá comprobarse la reacción de la tierra escogida, utilizando únicamente las de reacción neutra o débilmente alcalina.

Se debe cuidar muy especialmente de dar a la tierra un grado conveniente de humedad. El agua debe añadirse a tierra desecada al aire, siendo después íntimamente mezclada con aquélla. Se puede comprobar que se ha conseguido un grado de humedad conveniente apretando fuertemente con la mano un puñado de tierra. Si la tierra aparece apelonada cuando se abre la mano y, sin embargo, se desmorona fácilmente cuando se aprieta, la humedad puede considerarse satisfactoria. La tierra, debi-

damente humedecida, se pasa a continuación por una criba, introduciéndola después, sin comprimirla, en los recipientes destinados al ensayo de germinación. Las semillas se disponen entonces regularmente en la superficie de las terrinas y se recubren de un espesor de tierra conveniente, en condiciones semejantes a las de cultivo. El ensayo de germinación en tierra se realiza a la temperatura ordinaria del laboratorio, es decir, entre 15-20° C., aproximadamente.

b) *Determinación del vigor de los gérmenes por el método del ladrillo triturado:*

Contrariamente a lo que tiene lugar para un ensayo ordinario de germinación, se colocan las semillas cuyo vigor de gérmenes quiere determinarse en condiciones particularmente desfavorables. La determinación del vigor de los gérmenes se realiza según el método llamado "del ladrillo triturado". Los gérmenes de especies de grano pequeño (trébol, alfalfa, gramíneas, etc.) deben asomar a través de una capa de ladrillo triturado de un centímetro de espesor; los de especies de semillas gruesas (cereales, judías, remolachas, etc.), a través de una capa de tres a cuatro centímetros. El ensayo puede servir al mismo tiempo para la determinación del estado sanitario de las semillas.

10. *Límites admitidos entre los resultados de ensayos de germinación efectuados comparativamente en el laboratorio.*

Se debe presumir una falta de uniformidad en las condiciones de germinación y realizar un nuevo análisis cuando, en un ensayo, la diferencia entre los tipos máximo y mínimo de germinación es superior al:

10 por 100, para los lotes que presentan una germinación media de 90 por 100 como mínimo.

12 por 100, para los lotes que presentan una germinación media de 80 a 89 por 100.

16 por 100, para los lotes que presentan una germinación media de 79 por 100 como máximo.

IV. DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS

Las determinaciones complementarias, tales como la determinación de la identidad y de la pureza de variedad (con o sin ensa-