



Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8

Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma

N. Kameswara Rao, Jean Hanson, M. Ehsan Dulloo, Kakoli Ghosh,
David Nowell y Michael Larinde



NORGEN

NPGS

ILRI



Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma

**N. Kameswara Rao¹, Jean Hanson², M. Ehsan Dulloo¹, Kakoli Ghosh³,
David Nowell³ y Michael Larinde³**

¹ **Bioversity International**
Via del Tre Denari 472a, 00057 Maccarese, Roma, Italia

² **International Livestock Research Institute (ILRI)**
P.O. Box 5689, Addis Abeba, Etiopía

³ **Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
y la Agricultura (FAO)**
Via delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia

Bioversity International es una organización internacional independiente, de carácter científico, que busca contribuir al bienestar actual y futuro de la humanidad mejorando la conservación y el aprovechamiento de la agrobiodiversidad en fincas y bosques. Es uno de los 15 Centros que auspicia el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCI AI), una asociación de miembros del sector público y privado que apoya la ciencia para disminuir el hambre y la pobreza, mejorar la alimentación y la salud humana, y proteger el medio ambiente. Bioversity tiene su sede principal en Maccarese, cerca de Roma, Italia, y oficinas en más de 20 países. La organización opera a través de cuatro programas: Diversidad al Servicio de las Comunidades; Comprensión y Manejo de la Biodiversidad; Asociaciones Colaborativas de Carácter Mundial; y Cultivos para Mejorar Medios de Vida.

El carácter de organismo internacional de Bioversity lo confiere el Convenio de Creación de la organización, que a agosto de 2006 había sido ratificado por los gobiernos de los siguientes países: Argelia, Australia, Bélgica, Benin, Bolivia, Brasil, Burkina Faso, Camerún, Chile, China, Congo, Costa Rica, Costa de Marfil, Chipre, Dinamarca, Ecuador, Egipto, Eslovaquia, Etiopía, Ghana, Grecia, Guinea, Hungría, India, Indonesia, Irán, Israel, Italia, Jordania, Kenia, Malasia, Malí, Mauritania, Marruecos, Noruega, Pakistán, Panamá, Perú, Polonia, Portugal, República Checa, Rumania, Rusia, Senegal, Sudán, Suiza, Siria, Túnez, Turquía, Ucrania y Uganda.

Los programas de investigación de Bioversity reciben apoyo financiero de más de 150 donantes, incluyendo gobiernos, fundaciones privadas y organismos internacionales. Información adicional sobre los donantes y las actividades de investigación de Bioversity aparece en los Informes Anuales de la organización, disponibles en forma electrónica en la dirección www.bioversityinternational.org, o en forma impresa en la dirección bioversity-publications@cgiar.org.

Las designaciones geográficas empleadas en esta publicación al igual que la presentación del material no expresan en modo alguno opinión de Bioversity o del GCI AI sobre el estatus legal de ningún país, territorio, ciudad o región, ni acerca de sus autoridades o de la delimitación de sus fronteras. Asimismo, las opiniones expresadas son las de los autores y no necesariamente reflejan los puntos de vista de estas organizaciones.

La mención de alguna marca registrada se suministra con fines informativos únicamente, no de apoyo al producto.

Cita: Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia.

Publicado inicialmente como:

Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell and M. Larinde. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy.

ISBN 978-92-9043-757-4 (para la versión en español)

ISBN 978-92-9043-740-6 (para la versión original en inglés)

Bioversity International
Via dei Tre Denari, 472/a
00057 Maccarese
Roma, Italia

© Bioversity International, 2007

CONTENIDO

Agradecimientos	vi
A nuestros lectores	vii
Socios colaboradores en esta publicación	vii
Revisores del manuscrito original	x
Prólogo	xi
Prefacio	xiii
1. Introducción	1
2. Adquisición y registro del germoplasma	5
2.1 Adquisición del germoplasma	5
2.2 Registro del germoplasma	14
3. Limpieza de las semillas	22
4. Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas	31
4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas	31
4.2 Secado de las semillas	40
5. Determinación de la calidad de las semillas	56
5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas	56
5.2 Pruebas de sanidad de las semillas	85
5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas	91
6. Empaque y almacenamiento de las semillas	95
6.1 Empaque de las semillas	95
6.2 Almacenamiento de las semillas	100
7. Distribución del germoplasma	107
8. Monitoreo y regeneración del germoplasma	115
8.1 Monitoreo del germoplasma	115
8.2 Regeneración del germoplasma	121
Anexo I: Políticas internacionales y marcos de trabajo que afectan el acceso al germoplasma y el intercambio de germoplasma	132
Anexo II: Métodos serológicos para la detección de patógenos vegetales	135
Anexo III: Glosario	137
Anexo IV: Equipo especializado para bancos de germoplasma de semillas	146
Anexo V: Acrónimos	164

DIAGRAMAS DE FLUJO

Diagrama de Flujo 1.1. Secuencia general de las operaciones de un banco de germoplasma de semillas	3
Diagrama de Flujo 2.1. Registro del germoplasma	15
Diagrama de Flujo 3.1. Limpieza de las semillas	23
Diagrama de Flujo 4.1. Determinación del contenido de humedad de las semillas	32
Diagrama de Flujo 4.2. Secado de las semillas	41
Diagrama de Flujo 4.3. Protocolo para determinar el comportamiento de las semillas en almacenamiento	47
Diagrama de Flujo 5.1. Pruebas de germinación	58
Diagrama de Flujo 6.1. Empaque de las semillas	96
Diagrama de Flujo 7.1. Distribución del germoplasma	108
Diagrama de Flujo 8.1. Monitoreo de la viabilidad	117

CUADROS

Cuadro 4.1. Método recomendado para determinar la humedad de cultivos y especies forrajeras importantes (ISTA, 2005)	34
Cuadro 4.2. Especies que requieren maceración (ISTA, 2005)	35
Cuadro 4.3. Registro y determinación del contenido de humedad de las semillas	36
Cuadro 4.4. Contenidos de humedad en equilibrio (aproximados) de algunas semillas de cultivos comunes, a 25°C	43
Cuadro 5.1. Normas para realizar pruebas de germinación en las especies cultivadas más comunes	60
Cuadro 5.2. Modelo de hoja de datos para registrar los resultados de la germinación	78
Cuadro 5.3. Concentración, temperaturas y período de tinción con solución de tetrazolio	83
Cuadro 6.1. Modelo de cuadro para registrar información sobre el empaque de las semillas	99
Cuadro 6.2. Temperatura de almacenamiento y contenido de humedad sugeridos para colecciones activas	102
Cuadro 8.1. Intervalo sugerido para monitorear la germinación de colecciones base o activas de semillas oleaginosas y no oleaginosas	118
Cuadro 8.2. Umbral de porcentajes de germinación para la regeneración de accesiones	118
Cuadro 8.3. Plan de prueba de germinación secuencial para una regeneración estándar de 85%, cuando se evalúan semillas para germinación en grupos de 40	119
Cuadro 8.4. Comportamiento reproductivo y mecanismos de control de la polinización para la regeneración de cultivos importantes	130

FIGURAS

Figura 2.1. Extracción de las semillas de frutos carnosos	9
Figura 4.1. Isotermas de humedad	44
Figura 4.2. Predicción del tiempo de secado	45
Figura 5.1. Prueba de germinación sobre papel absorbente, en cajas Petri	67
Figura 5.2. Prueba de germinación de semillas mediante el método entre papel	69
Figura 5.3. Prueba de germinación de semillas en arena	71
Figura 5.4. Anormalidades de plántula en arveja	74
Figura 5.5. Anormalidades de plántula en maní forrajero	75
Figura 5.6. Anormalidades de plántula en trigo	76
Figura 5.7. Anormalidades de plántula en cebolla	77
Figura 5.8. Escarificación manual de la testa de las semillas	79
Figura 5.9. Patrón de tinción después de la prueba con tetrazolio en semillas dicotiledóneas	84
Figura 5.10. Patrón de tinción después de la prueba con tetrazolio en semillas monocotiledóneas	85

RECUADROS

Recuadro 2.1. Unidad base para el registro	18
Recuadro 4.1. Alternativas para el secado inicial	50
Recuadro 5.1. Humidificación de semillas secas	59
Recuadro 5.2. Defectos de plántulas clasificadas como anormales	73

AGRADECIMIENTOS

Para la versión original en inglés

Agradecemos de manera especial a T. van Hintum, L. de Groot, L. Boukema, A. Borner, S. Linington, C. N. Nkhoma, L. M. Engle, N. C. Altoveros, M. Mackey, A. W. Ebert, Xiaorong Hu, M. Wetzel, V. Mahalakshmi, H. Kamau y W. Marandu por su valiosa revisión del primer borrador del manuscrito. Expresamos nuestro reconocimiento por la ayuda de Teodoro Calles en la elaboración de los diagramas de flujo. De manera especial agradecemos el auspicio del Centro Técnico de Cooperación Agrícola y Rural (CTA) y el apoyo de los Países Bajos en la publicación de este manual. Hacemos también extensivos nuestros agradecimientos a Tran Hong de la Universidad de Reading por su experta asesoría en algunos temas técnicos de esta guía. También agradecemos a todo el personal de Bioversity International, en especial a Annie Huie, por su colaboración en la preparación de este manual, y a Hope Traficanti, por la edición de idioma de la versión en inglés. Asimismo, agradecemos a Nicolás Muema por las ilustraciones, y a Elizabeth Goldberg, Jefe de la Unidad de Apoyo e Investigación en Desarrollo de Capacidades de Bioversity International, por su orientación en el desarrollo del manual y del módulo de autoaprendizaje. Igualmente, agradecemos a Paul Neate y a su grupo de trabajo, en particular a Patrizia Tazza y Frances Ferraiuolo, por el diseño y la diagramación de esta publicación.

Para la versión en español

La versión en español de este Manual fue posible gracias al aporte económico del Fondo Mundial para la Diversidad de los Cultivos, la Red de Recursos Genéticos de América del Norte (NORGEN) y el National Plant Germplasm System (NPGS) de los Estados Unidos.

Se agradece a Marleni Ramírez, Directora Regional de Bioversity International para las Américas, por su gestión en la consecución de los fondos; a Victoria Eugenia Rengifo, Asistente de Programa de Bioversity International, por el apoyo en la traducción de los textos al español; y a Nelly Manosalva, editora independiente, por la revisión inicial del manuscrito. Margarita Baena, Especialista de Bioversity International en Desarrollo de Capacidades e Información Pública, revisó y editó los textos en español y coordinó la producción del manual en este idioma y del módulo de autoaprendizaje que lo acompaña.

A NUESTROS LECTORES

Los Manuales para Bancos de Germoplasma publicados por Bioversity International tienen por objeto proporcionar información práctica a los curadores y al personal que labora en bancos de germoplasma. Con el fin de facilitar su utilización, el argollado permite mantenerlos abiertos sobre una mesa; de igual manera, las márgenes amplias brindan a los lectores un espacio para escribir sus comentarios o anotaciones sobre el texto.

Bioversity agradece a sus lectores enviar comentarios sobre el contenido y el formato del manual, que servirán de base para futuras revisiones.

SOCIOS COLABORADORES EN ESTA PUBLICACIÓN

Para la versión en inglés

El **International Livestock Research Institute (ILRI)** trabaja donde se entrelazan los temas pecuarios y la pobreza, aportando ciencia de alta calidad y creando capacidad institucional para disminuir la pobreza y hacer el desarrollo sostenible. El ILRI es una organización sin ánimo de lucro con sede en Nairobi, Kenia, que realiza investigaciones en África, Asia, América Latina y el Caribe, y tiene oficinas en el sur, oriente y occidente de África; en el sur y el suroeste de Asia; en China y en América Central. Como uno de los 15 Centros del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCIAI), la estrategia del ILRI se centra en tres actividades del área pecuaria para combatir la pobreza: (1) proteger los bienes de la población de escasos recursos, (2) mejorar la productividad de los sistemas pecuarios y (3) incrementar las oportunidades de mercado ante las cambiantes demandas y canales de un mercado que evoluciona rápidamente. El portafolio de investigaciones del ILRI comprende temas orientados hacia cuatro problemáticas: reconocer las oportunidades de desarrollo e investigación; incrementar las oportunidades de mercado; utilizar la biotecnología para proteger los bienes pecuarios; y población, ganadería y medio ambiente.

La **Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)** lidera esfuerzos internacionales para combatir el hambre. Prestando su apoyo a países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, la FAO se constituye en un foro neutro en el cual todas las naciones se reúnen en igualdad de condiciones para negociar acuerdos y debatir políticas. La FAO es también una fuente

de conocimiento y de información. La FAO ayuda a los países en desarrollo y en transición a modernizar y mejorar las prácticas agrícolas, forestales y pisciculturales, y a asegurar una buena alimentación para todos. Desde su constitución en 1945, la FAO ha brindado especial atención al desarrollo de las zonas rurales, que albergan el 70% de la población mundial agobiada por el hambre y la pobreza. Las actividades de la FAO comprenden cuatro áreas principales: hacer accesible la información; compartir conocimientos especializados en políticas; proveer un lugar de encuentro para las naciones; y llevar conocimiento al campo.

El **Centro Técnico de Cooperación Agrícola y Rural (CTA)** se estableció en 1983 bajo la Convención de Lomé entre el Grupo de Países de África, el Caribe y el Pacífico y los países miembros de la Unión Europea. Desde 2000, ha operado en el marco del Acuerdo ACP-EC de Cotonou. El CTA desarrolla y proporciona servicios para mejorar el acceso a información sobre agricultura y desarrollo rural, y fortalece la capacidad de los países de África, el Caribe y el Pacífico para producir, adquirir, intercambiar y utilizar información en esta área. Los programas del CTA están diseñados para proporcionar un amplio rango de productos y servicios de información y elevar el nivel de conciencia sobre fuentes de información relevantes; promover el uso integrado de canales de comunicación apropiados e intensificar los contactos y el intercambio de información (particularmente entre los países de África, el Caribe y el Pacífico); y desarrollar en estos países capacidad para generar y manejar información agrícola y formular estrategias de manejo de información y comunicación, incluyendo aquellas relevantes para la ciencia y la tecnología. El trabajo del CTA incorpora nuevos desarrollos en metodologías y aspectos de alcance transversal como el género y el capital social.

Para la versión en español

El **Fondo Mundial para la Diversidad de los Cultivos** tiene la misión de asegurar la conservación y disponibilidad de la diversidad de los cultivos en el mundo para lograr la seguridad alimentaria. Aunque la diversidad de los cultivos es fundamental para luchar contra el hambre y para el futuro de la agricultura, el financiamiento es incierto y la diversidad se está perdiendo. El Fondo es un organismo internacional independiente, establecido mediante una asociación entre la FAO y Bioversity International, a nombre del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCIAl). El Fondo es el único organismo a nivel mundial que trabaja para resolver este problema. Para mayor información, visite el sitio www.croptrust.org

NORGEN es la Red Subregional de Recursos Fitogenéticos, que incluye Canadá, los Estados Unidos y México, y opera en coordinación y bajo el auspicio del Programa de Cooperación Técnica del Instituto Interamericano de Cooperación en Agricultura (IICA) para la Región Norte (PROCINORTE). NORGEN promueve la comunicación y colaboración entre el personal involucrado en el manejo de los sistemas nacionales de recursos fitogenéticos, identifica necesidades de capacitación y educación, promueve la integración con otras redes de recursos fitogenéticos de América y del mundo para buscar elementos comunes, desarrolla proyectos sobre recursos fitogenéticos de interés de los tres países, y promueve la participación recíproca de expertos nacionales de cada país y de los comités de operación y asesoría.

El Agricultural Research Service (ARS) es la agencia de investigación científica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. La investigación del ARS soluciona problemas relacionados con la agricultura, la nutrición humana, la seguridad alimentaria, los recursos naturales y el medio ambiente. El **National Plant Germplasm System (NPGS)** es una red de bancos de germoplasma y estaciones de campo coordinada por el ARS, cuya principal responsabilidad es conservar, caracterizar y distribuir recursos genéticos vegetales de importancia agrícola y alimentaria. El NPGS mantiene una variedad de colecciones de germoplasma con más de 475,000 accesiones de materiales vegetales que cubren prácticamente todas las especies cultivadas y sus parientes silvestres. El NPGS es uno de los centros de conservación y distribución de germoplasma más grandes del mundo. El NPGS participa en actividades de colecta e intercambio de germoplasma y distribución de beneficios, coordinadas por la Oficina de Intercambio Vegetal (ARS Plant Exchange Office) de Beltsville, Maryland. La colección base de germoplasma del NPGS está ubicada en el National Center for Genetic Resources Preservation, en Fort Collins, Colorado. Este centro mantiene más de 700,000 muestras de semillas, realiza más de 20,000 pruebas de germinación, y apoya el uso y la transferencia de técnicas adecuadas para la germinación, el almacenamiento y el manejo de las semillas.

REVISORES DEL MANUSCRITO ORIGINAL

T. van Hintum, L. Groot y
L. Boukema
Centre for Genetic Resources
(CGN)
PO Box 16, 6700 AA
Wageningen
Países Bajos

N.C. Altoveros
Deputy Director and Researcher
Institute of Plant Breeding
University of the Philippines
Los Baños
College 4031, Laguna
Filipinas

A. Borner
Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung
Corrensstraße 3
D-06466 Gatersleben
Alemania

M. Mackey
Australian Centre for
International Agricultural
Research (ACIAR)
GPO Box 1571
Canberra ACT 2601
Australia

S. Linington
Millennium Seed Bank Project
Wakehurst Place
Ardingly
Haywards Heath
West Sussex RH17 6TN
Reino Unido

A.W. Ebert
Coordinador
Recursos Fitogénéticos y
Biotecnología
CATIE
7170 Turrialba
Costa Rica

C.N. Nkhoma
SADC Plant Genetic Resources
Centre (SPGRC)
Private Bag CH6
Lusaka
Zambia

Xiaorong Hu
ICGR, CAAS
12 Zhong Guan Cun South Street
Beijing, 100081
China

L.M. Engle
Geneticist and Head
Genetic Resources and Seed
Unit
AVRDC – The World Vegetable
Center
60 Yi-Ming Liao 74151
Shanhua, Tainan 741
Taiwán

PRÓLOGO

Los bancos de germoplasma son depósitos de recursos fitogenéticos que proporcionan la materia prima para el mejoramiento de los cultivos. Estos recursos cumplen una función vital en el desarrollo sostenible de la agricultura en tanto ayudan a aumentar la producción de alimentos y a combatir el hambre y la pobreza. En los cultivos, se puede producir una resistencia a las plagas y enfermedades de manera que se reduzca la necesidad de usar químicos que puedan tener efectos deletéreos en los agricultores y en el medio ambiente. Las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma son un recurso vital e irremplazable, una herencia que se debe conservar para proveer opciones a la agricultura en el futuro, en un mundo que afronta el cambio climático y otros desafíos. La conservación sostenible de los recursos genéticos depende del trabajo eficaz del personal de los bancos de germoplasma, cuyo papel es crítico para garantizar que el germoplasma se conserve de manera efectiva y eficiente. Este personal debe aplicar procedimientos adecuados al manejo de las semillas para garantizar que éstas sobrevivan y estén disponibles para las generaciones actuales y futuras.

El manual práctico sobre Procedimientos para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma (Hanson, 1985), publicado por el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR, hoy *Bioversity International*), ha ayudado a los curadores y técnicos de bancos de germoplasma en su labor de conservar las semillas. Los trabajos de investigación realizados en décadas pasadas han producido avances en el conocimiento sobre la fisiología de las semillas y su comportamiento en condiciones de almacenamiento. El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) en 1992, el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFGAA) en 2004, y otros acuerdos relacionados han cambiado el contexto mundial en lo referente a la propiedad del germoplasma y la distribución de sus beneficios. El desarrollo de organismos modificados genéticamente (OMG) y las controversias asociadas tienen implicaciones importantes en la manera en que los bancos manejan el germoplasma, particularmente en cuanto a evitar la introducción involuntaria de genes exóticos, incluyendo los transgenes. Todas estas nuevas oportunidades y desafíos llevaron a reconocer la necesidad de actualizar el manual para bancos de germoplasma publicado en 1985. La versión actual aborda los cambios recientes en el manejo de las semillas en bancos de germoplasma y busca dar los elementos para cumplir los estándares actuales. Está complementado por un módulo interactivo de autoaprendizaje, en CD-ROM, adjunto a esta publicación. Tanto

el manual como el módulo de aprendizaje buscan también ayudar a enfrentar el desafío que supone la escasez y frecuente rotación de personal calificado en los bancos de germoplasma, particularmente en los países en desarrollo.

El manual y el módulo de autoaprendizaje ofrecen lecciones e instrucciones sobre la conservación de semillas y el manejo de un banco de germoplasma al personal que no tiene la oportunidad de asistir a una capacitación formal sobre estos temas. A través de ellos, el personal de los bancos de germoplasma puede aprender sobre las actividades que se realizan en ellos, y disponer de una herramienta de referencia rápida sobre los principales procedimientos. Esperamos que esta publicación ayude al personal de los bancos a mantener el germoplasma bajo su cuidado en los más altos estándares de supervivencia y calidad.

Laura Snook

*Directora de Programa
Comprensión y Manejo de la Biodiversidad
Bioversity International*

PREFACIO

Seguir los procedimientos adecuados en el manejo de las semillas en un banco de germoplasma es fundamental para conservar los recursos fitogenéticos a largo plazo y de manera eficiente y efectiva en costos. Estos procedimientos garantizan que las semillas almacenadas sean de la más alta calidad y alcancen la máxima longevidad. El objetivo de un banco de germoplasma es mantener accesiones de alta viabilidad durante períodos prolongados. Los avances en la biología de las semillas durante las últimas décadas han permitido comprender mejor la fisiología de las semillas y su comportamiento en almacenamiento, haciendo de ellas el medio más fácil y conveniente de conservación a largo plazo. Esto ha llevado al desarrollo de técnicas para manejar adecuadamente las semillas y prepararlas para el almacenamiento.

En la década de 1980, el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR), predecesor de *Bioversity International*, publicó una serie de manuales para bancos de germoplasma, entre ellos 'Manuales Prácticos para Bancos de Germoplasma No. 1: Procedimientos para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma' de Jean Hanson (1985), para ayudar a los curadores y a los técnicos de los bancos en la conservación de semillas. Este manual, cuya edición ya se agotó, es aún una referencia estándar para el trabajo de los bancos y se mantiene como una de las pocas fuentes de información práctica para curadores y técnicos de bancos de germoplasma. En años recientes, se han publicado muy pocos libros sobre el tema. Las pocas publicaciones científicas consideradas excelentes sobre el mismo tema son, con frecuencia, demasiado complejas para ser utilizadas por un técnico promedio, en especial en países en desarrollo. Este manual es una actualización del manual práctico anterior para el personal nuevo de los bancos de germoplasma que no ha recibido capacitación formal. Su contenido se beneficia de los avances en la tecnología de semillas, de almacenamiento de semillas y de técnicas de manejo de las semillas ocurridos en las últimas dos décadas. Se utiliza tecnología moderna de comunicación para hacer que este manual sea ampliamente accesible.

La necesidad de este producto se hizo evidente en una reciente evaluación sobre capacitación y necesidades de formación de los programas nacionales de recursos fitogenéticos, realizada por *Bioversity International* y la FAO. Como lo expresaron algunos socios durante varias reuniones y talleres, la falta de personal capacitado es un obstáculo importante para que muchos bancos conserven el germoplasma de manera efectiva y eficiente. Para muchos bancos

de germoplasma de países en desarrollo, el personal encargado de las operaciones de rutina carece de fundamentos en fisiología de semillas y de buenas prácticas de manejo del germoplasma; otro agravante es la frecuente rotación del personal. Este manual, sencillo y práctico, ayudará al personal de los bancos de germoplasma a realizar sus labores cotidianas.

Esta publicación trata solamente el tema del almacenamiento de semillas ortodoxas, es decir, aquellas que se pueden secar hasta alcanzar un contenido de humedad bajo y mantener a temperaturas bajo cero en bancos de germoplasma. Las principales actividades y procedimientos del funcionamiento de los bancos de germoplasma de semillas son, en general, los mismos para todos los bancos, a pesar de que pueden variar en contenido y alcance.

Desde la primera edición del manual práctico en 1985, se han dado nuevos desarrollos que plantean la necesidad de revisar los procedimientos de los bancos de germoplasma. La entrada en vigencia del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) en 1992 y del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFGAA) en 2004 han cambiado la percepción en el mundo sobre la propiedad del germoplasma y la distribución de sus beneficios. Estos acuerdos proporcionan nuevos principios para orientar la adquisición, conservación y utilización de la biodiversidad, e influyen en el funcionamiento de los bancos de germoplasma. En el CDB y en el Tratado Internacional sobre los RFGAA se reconoce que la biodiversidad es un derecho soberano de las naciones, que la colecta de germoplasma se debe hacer con consentimiento fundamentado previo, y que la adquisición del germoplasma está sujeta a términos mutuamente acordados y a la suscripción de acuerdos de transferencia, bilaterales o multilaterales.

Adicionalmente, se creó el Fondo Mundial para la Diversidad de los Cultivos, para apoyar el desarrollo y el financiamiento de la conservación de la diversidad cultivada en todo el mundo. Este Fondo ayuda a mantener las colecciones críticas para la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible. Para recibir apoyo del Fondo, los bancos de germoplasma deben cumplir con una serie de criterios de elegibilidad, uno de los cuales es que tengan el recurso humano y los sistemas de manejo requeridos para mantener los recursos fitogenéticos, y puedan comprobar que sus estándares técnicos y científicos de manejo son los aceptados. Por ello, se requieren normas para ayudar a los bancos a mantener estándares altos de manejo.

Un nuevo y controversial desarrollo que probablemente afecta el manejo del germoplasma es el de los organismos modificados genéticamente (OMG). En la actualidad, se espera que los bancos de germoplasma tomen iniciativas para evitar la introgresión involuntaria de genes exóticos, incluyendo los transgenes, que aún no se encuentran presentes en las muestras conservadas en los bancos. Por esta razón, el Comité de Políticas para los Recursos Genéticos (GRPC) del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCAI) ha desarrollado principios orientadores que cubren los riesgos de introducir transgenes en las colecciones, particularmente en puntos críticos de los procedimientos de los bancos de germoplasma. Estos principios y los cambios que se requieren en el protocolo para implementarlos se explican en forma detallada en esta nueva edición.

La publicación de este manual es una iniciativa conjunta de *Bioversity International* (antes IPGRI), el International Livestock Research Institute (ILRI) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), auspiciados en parte por el Centro Técnico para la Cooperación Agrícola y Rural (CTA). El manual está dirigido al personal de bancos de germoplasma, en especial a los técnicos que manejan semillas ortodoxas, y tiene por objeto explicar de manera sencilla los procedimientos para el manejo cotidiano de las semillas en los bancos. Con el fin de elevar el valor de este manual para la capacitación y el desarrollo de capacidades, los autores lo han adaptado para crear un módulo interactivo de autoaprendizaje; este módulo es una herramienta complementaria al manual y ha sido publicado en CD-ROM y en internet, por Bioversity International, con el auspicio del CTA.

Cabe anotar que este manual está enfocado exclusivamente en los procedimientos inherentes al manejo de las semillas y no cubre en detalle los procesos de documentación, colecta o caracterización, en tanto son temas que ya se han cubierto en otras publicaciones. Los lectores podrían consultar la literatura disponible para comprender mejor estas importantes actividades de los bancos de germoplasma.

Kameswara Rao
Jean Hanson
Ehsan Dulloo
Kakoli Ghosh
David Nowell
Michael Larinde

1. **Introducción**
2. **Adquisición y registro del germoplasma**
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. **Limpieza de las semillas**
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de los recursos fitogenéticos, el comportamiento fisiológico en almacenamiento de las semillas de una especie y su longevidad determinan cómo conservarlas para el uso. Por tratarse de un método práctico y económico, el almacenamiento en forma de semilla es el preferido para conservar el 90% de los seis millones de accesiones mantenidos en colecciones *ex situ* en todo el mundo. Éste es el principal método de conservación de las especies que producen semillas ortodoxas, es decir, que resisten la desecación a contenidos de humedad bajos y el almacenamiento a temperaturas muy bajas. La mayoría de las especies cultivables y forrajeras, y muchas especies arbóreas producen este tipo de semilla. Las técnicas para conservar semillas ortodoxas se han venido perfeccionando durante varias décadas e incluyen el secado de las semillas hasta lograr un contenido de humedad bajo (3-7% de peso fresco, dependiendo de la especie) y el almacenamiento en recipientes herméticos, a bajas temperaturas, preferiblemente a -18°C o menos (FAO/IPGRI, 1994).

Muchas especies importantes de árboles tropicales y subtropicales producen semillas que no sobreviven la desecación ni toleran temperaturas bajas. Por esta razón, estas semillas, conocidas como recalcitrantes, no son fáciles de almacenar. Si bien existen técnicas para almacenar algunas semillas recalcitrantes, éstas por lo general son de corta vida y cada especie requiere su propio método. Se ha reconocido una tercera categoría de semillas que muestran un comportamiento intermedio, es decir, que toleran combinaciones de desecación y bajas temperaturas. De hecho, existe un gradiente de ortodoxa a recalcitrante, sin límites muy marcados entre las categorías. Sin embargo, a pesar de las investigaciones para superar los problemas asociados con la conservación de las semillas, poco se ha avanzado, más allá del corto plazo, en el almacenamiento de las semillas no ortodoxas.

Esta publicación trata del almacenamiento de las semillas ortodoxas en bancos de germoplasma. Las operaciones básicas de un banco de germoplasma de semillas incluyen la colecta,

el procesamiento, la conservación, la regeneración y la distribución del germoplasma. Las principales actividades y procedimientos para el funcionamiento de un banco de germoplasma son prácticamente los mismos en todos los bancos, aunque pueden variar de alguna manera. Los bancos de germoplasma de semillas pueden ser muy especializados; por ejemplo, el Banco Internacional de Germoplasma de Arroz en Los Baños, Filipinas, únicamente conserva arroz y sus parientes silvestres. Sin embargo, la mayoría de los bancos nacionales de germoplasma de semillas almacenan semillas de todo tipo de cultivos. El mantenimiento de la viabilidad y de la integridad genética de las semillas continúa siendo el principio básico en el manejo de los bancos. La calidad y sostenibilidad de cualquier esfuerzo de conservación de recursos genéticos depende de cómo se procesan y conservan las semillas. Manejar las semillas con procedimientos inapropiados acelera el deterioro de éstas y hace más costosa la conservación.

El funcionamiento de un banco de germoplasma involucra una serie de actividades complejas e interdependientes (ver Diagrama de Flujo 1.1). El primer paso hacia la conservación *ex situ* de la diversidad cultivada es la recolección del germoplasma en áreas de conocida diversidad genética o mediante donaciones de otros centros. Una vez se reciben las muestras en el banco de germoplasma, las semillas se registran y se incorporan a la colección, siempre y cuando cumplan con los estándares requeridos de cantidad y calidad, y con la información asociada a ellas. El procedimiento para integrar una accesión a un banco de germoplasma implica limpiar, determinar el contenido de humedad, secar, evaluar la viabilidad y empaquetar. Las accesiones de germoplasma se deben mantener con una alta proporción de semillas viables, lo cual implica almacenarlas en condiciones adecuadas, monitorearlas periódicamente la viabilidad y regenerarlas cuando la situación lo amerite. La regeneración se debe hacer en condiciones óptimas para mantener la integridad genética y maximizar la longevidad. Para reducir al mínimo la deriva genética, se debe sembrar un número adecuado de plantas y muestrearlas. Además, se debe mantener la integridad genética de los cultivos de polinización cruzada mediante el aislamiento o la polinización controlada. Las semillas se deben cosechar después de que hayan alcanzado el punto de madurez fisiológica, y acondicionarse y 'procesarse' en condiciones óptimas para asegurar una alta viabilidad y disponibilidad para el almacenamiento. Para que las semillas tengan buena calidad en el momento de la cosecha son también vitales unas condiciones climáticas favorables durante los períodos de precosecha y postmaduración: el clima seco acelera el secado de las semillas en las plantas a un contenido de humedad favorable para el manejo, mientras que el clima húmedo (con humedad relativa alta) retrasa el proceso de secado de las semillas en las plantas, produciendo un deterioro de éstas incluso antes de la cosecha.

La mayoría de los bancos de germoplasma tiene el mandato de distribuir germoplasma a los usuarios. Por lo general, las accesiones de germoplasma se distribuyen utilizando acuerdos de transferencia de materiales (ATM), que definen los términos y condiciones de uso, y las provisiones para compartir los beneficios que surjan del uso del germoplasma. En la primera reunión del Órgano Rector del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, en junio del 2006, se formalizó un acuerdo estándar de transferencia de materiales (ATM estándar), que constituye un contrato uniforme para todos los intercambios de germoplasma de las especies incluidas en el Anexo I del Tratado. Éste incluye términos específicos que rigen el acceso y la distribución de beneficios, facilitando el intercambio de germoplasma en todo el mundo.

El trabajo con recursos genéticos implica manejar una gran cantidad de información que se debe documentar y almacenar en sistemas de manejo de información. El manejo de la información no se trata en este manual, pero se recomienda al lector consultar la guía para documentación de los recursos genéticos de Painting *et al.* (1993).

El manejo de un banco de germoplasma requiere capacidad para tomar decisiones de manera creativa y adaptativa. Dada la creciente presión a que se ven sometidos los bancos de germoplasma para mejorar la eficiencia en costos y la efectividad de sus operaciones, se hace necesario desarrollar estrategias de manejo coherentes. En una reciente publicación de Engels y Visser (2003), se analizan elementos importantes de manejo tanto a nivel de bancos de germoplasma como de colecciones, y se discuten opciones para un manejo más eficiente y efectivo en cuanto a los costos.

Lectura complementaria

Engels, J.M. y Visser, L. (eds.). 2003. Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. IPGRI Manual para Bancos de Germoplasma No. 6. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en la página www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=899.

FAO/IPGRI. 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO y el IPGRI, Roma, Italia. Disponible en http://www.biodiversityinternational.org/publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.

Painting, K.A., Perry, M.C., Denning, R.A. y Ayad, W.G. 1993. Guía para la documentación de recursos genéticos: Un enfoque autodidáctico para la comprensión, análisis y desarrollo de la documentación de los recursos genéticos. IBPGR, Roma, Italia. Disponible en la página www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=507.

1. Introducción
2. **Adquisición y registro del germoplasma**
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. Limpieza de las semillas
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**

2. ADQUISICIÓN Y REGISTRO DEL GERMOPLASMA

2.1 Adquisición del germoplasma

¿En qué consiste la adquisición de germoplasma?

Adquirir germoplasma consiste en obtener material genético de una especie cuya conservación es mandato de un banco de germoplasma. Es el paso inicial en la conservación de los recursos genéticos.

¿Por qué se hace?

La principal razón para adquirir germoplasma es garantizar suficiente disponibilidad de diversidad para suplir necesidades actuales y futuras. Las razones que justifican la adquisición incluyen:

- prevenir la erosión genética: cuando la amenaza de pérdida de la diversidad genética está presente en una determinada zona y no se puede conservar *in situ*;
- llenar vacíos en una colección: cuando en una colección hace falta diversidad o ésta está insuficientemente representada en ella;
- satisfacer necesidades: cuando se necesita germoplasma para el mejoramiento, la investigación o el desarrollo; y
- aprovechar una oportunidad: cuando se presenta la oportunidad de hacer una colecta fortuita, no planeada de especies definidas como ‘no objetivo’.

¿Cómo se hace?

El germoplasma se adquiere:

- a. colectando en campos de agricultores, hábitats silvestres o mercados, especialmente en centros de diversidad conocidos; y
- b. consiguiendo materiales de interés a través de correspondencia e intercambio con otros centros de introducción de plantas, bancos de germoplasma, científicos, agricultores, compañías productoras de semilla u otros proveedores de germoplasma.

Políticas sobre la adquisición de germoplasma

Los bancos de germoplasma deben tener políticas claras sobre la adquisición de manera que el volumen de material adquirido se encuentre dentro de los límites de capacidad de manejo de cada banco. Cuando el espacio de almacenamiento o los recursos para mantener las colecciones son limitados, el germoplasma se debe adquirir con base en una prioridad.

Establecimiento de prioridades

La adquisición de germoplasma debe basarse en su valor o en la amenaza de extinción. El valor se puede estimar como la utilidad de las características y la adaptación a ambientes únicos. Los cultivos, las variedades nativas y las especies silvestres y arvenses compañeras deben recibir alta prioridad de adquisición, seguidos por las reservas genéticas, el material élite de mejoramiento y las variedades modernas y obsoletas. Antes de adquirir material silvestre, hay que considerar si hay recursos disponibles para manejarlo.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) y el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFGAA) constituyen el marco de trabajo para la adquisición y utilización del germoplasma. La colecta está regida por el CDB, que cubre el acceso con consentimiento fundamentado previo, de mutuo acuerdo y con participación en los beneficios. El Tratado Internacional sobre los RFGAA se refiere específicamente a las especies cultivadas que aparecen en la lista del Anexo I del Tratado, identificadas por los países participantes como importantes para ser incluidas en un sistema multilateral de acceso. El acceso al germoplasma bajo estos dos instrumentos internacionales está regido hoy en día mediante el Acuerdo Estándar de Transferencia de Materiales (ATM estándar), adoptado por el Órgano Rector del Tratado. Los términos del ATM estándar cubren tanto el acceso al material genético como los beneficios derivados de él, y se deben tener en cuenta durante la colecta y el intercambio.

A. Adquisición de germoplasma mediante la colecta

Las publicaciones de Guarino *et al.* (1995) y Smith *et al.* (2003) han cubierto en profundidad la planificación y la realización de una colecta de germoplasma. Para información adicional, el personal de los bancos de germoplasma se puede referir a estas publicaciones.

Cuándo coleccionar las semillas

Idealmente, las semillas se deben coleccionar cuando alcanzan la madurez óptima, es decir, cuando su vigor, tolerancia a la desecación y longevidad se encuentran en los niveles más altos. Como es difícil monitorear estas características en el campo, se pueden usar indi-

cadorez visuales para realizar valoraciones preliminares de la madurez óptima de las semillas, como los cambios en el color del fruto, el color de la semilla o la formación de capas negras (en los cereales). Estos cambios se correlacionan bien con el logro de la madurez, aunque no necesariamente con la máxima longevidad. A pesar de ello, estos cambios son indicadores útiles para los colectores de germoplasma. La dispersión de las semillas también es un buen indicio práctico de la madurez de éstas.

Color del fruto

En los frutos carnosos, la madurez viene acompañada de cambios de color –generalmente de verde a amarillo, café o rojo.

- En el tomate, el color rojo del fruto indica que la mayoría de las semillas está en su máxima longevidad. Las semillas de los frutos verdes, rosados-amarillos o muy maduros probablemente no han madurado o se han pasado de madurez y son de mala calidad.
- En *Cucurbita moschata*, un cambio en el color del fruto de verde a amarillo-café y un pedúnculo de color paja indican un alto vigor en las semillas.
- En *Capsicum annum*, el vigor de las semillas mejora en la medida en que el color del fruto cambia de verde a rojo con unas pocas listas verdes y luego a rojo intenso.
- En *Brassica oleracea*, el color del fruto (silicua) cambia de verde a amarillo, y en la soya y muchas otras leguminosas, de verde a amarillo-café y luego a café, a medida que la semilla madura.

Color de las semillas

En muchos frutos secos, el color de las semillas cambia de verde a amarillo o café a medida que las semillas maduran:

- En la soya, el color de la semilla cambia de verde a amarillo-verde y luego a amarillo.
- En *Sesbania bispinosa*, el color de la testa de la semilla cambia de amarillo a verde oliva y luego a un café verdoso.

Formación de capas negras

En los cereales, como el maíz y el sorgo, la madurez coincide con la formación de una capa de abscisión café o negra, conocida como 'capa negra'. La sequedad de la cáscara y de las hojas inferiores es también un indicador de madurez.

- La capa negra está localizada en la base del grano, en el punto de unión a la mazorca en el lado opuesto del embrión (maíz), o en la punta del grano (sorgo y millo).
- La capa negra se puede encontrar pelando con cuidado la testa de la semilla para exponer la capa de abscisión.

Variación en la madurez de las semillas

Los colectores de germoplasma encuentran con frecuencia una variación en la madurez de las semillas por diferencias en el tiempo de floración, tanto entre plantas como dentro de la inflorescencia de una misma planta. Esto se puede superar colectando frutos de madurez uniforme –siempre y cuando haya disponibilidad de algunos marcadores y tiempo suficiente.

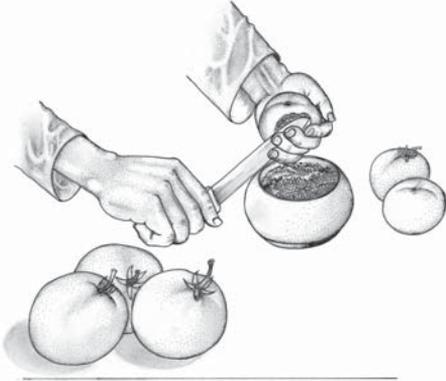
Recipientes para recolectar muestras

- Utilice bolsas de papel para coleccionar las semillas.
- Utilice bolsas de tela que permitan la circulación del aire (como bolsas de muselina) para coleccionar panículas o frutos secos.
- Utilice recipientes abiertos, como cestas hechas de alambre o bambú o cubetas, para coleccionar frutos carnosos.
- Asegúrese de que los frutos no se aplasten.
- Durante el transporte, no permita que los frutos se calienten demasiado y se fermenten.
- Las bolsas con malla de nylon son también muy útiles para coleccionar muestras pues permiten la circulación libre del aire. Además de servir para coleccionar semillas, vainas y frutos, se pueden utilizar para extraer las semillas y para secarlas. Estas bolsas se encuentran disponibles en malla de distintos tamaños.

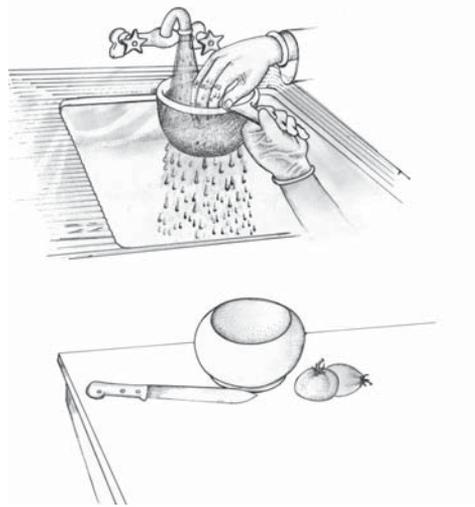
Procesamiento de las semillas en el campo

A menudo, las semillas recientemente coleccionadas tienen un contenido de humedad alto (10-20%) y son susceptibles de contaminarse con hongos o bacterias. Los frutos y las semillas húmedos tienen altas tasas de respiración, y si el oxígeno se reduce debido a una aireación inadecuada, se fermentan. Tanto la respiración como la fermentación crean calor, lo cual deteriora el material coleccionado. Cuando las misiones de colecta son prolongadas, es necesario hacer un lavado previo de las semillas en el campo, y extraerlas y secarlas para reducir el volumen y el peso durante el transporte, eliminar los contaminantes y llevar el contenido de humedad a un nivel seguro.

- Emplee únicamente métodos manuales para limpiar y extraer las semillas con el fin de conservar la viabilidad.
- Si las semillas se coleccionan con humedad superficial, séquelas primero a la sombra o en un cuarto con buena ventilación, dispersándolas sobre papel periódico o papel secante antes de transferirlas a bolsas de papel o tela.
- Las semillas de frutos dehiscentes secos (como la oca, la colza y el ajonjolí) se pueden extraer dispersando los frutos sobre una lona, a la sombra.
- Los frutos maduros se abren y liberan las semillas mientras se



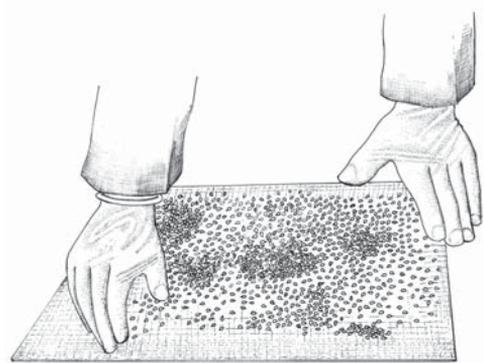
1



2



3



4

Figura 2.1. Extracción de las semillas de frutos carnosos

secan. Algunas veces necesitan un impacto adicional como rastrillarlos o sacudirlos.

- Elimine los frutos vacíos y los desechos, y traslade las semillas a bolsas de algodón, malla de nylon o papel.
- Con los frutos pulposos (como el tomate y el pepino), extraiga las semillas cuidadosamente con la mano, lávelas bajo un chorro de agua corriente para retirar la pulpa y el mucílago, dispérselas formando una capa delgada para maximizar la aireación y deje que se sequen a la sombra (ver Figura 2.1).
- Siempre mantenga las semillas en recipientes permeables a la humedad como bolsas de algodón o papel, y asegúrese de que el aire circule libremente entre ellas y a través de ellas.
- Cuando el clima es caliente y húmedo y las misiones de colecta prolongadas, seque las semillas aún más utilizando desecantes como el gel de sílice (la proporción recomendada de semillas por gel de sílice es de 3:2 a 1:1).
- Para reducir el contenido de humedad de las semillas, ponga en un recipiente hermético grande capas alternadas de gel de sílice empacado y de semillas empacadas.
- Con los frutos pequeños y carnosos de muchas semillas (como el kiwi y la fresa), si las misiones de colecta son cortas y la logística viable, la opción más práctica es mantener las semillas dentro de los frutos.
- Si los frutos requieren maduración posterior o si las semillas son delicadas o recalcitrantes, se debe evitar extraerlas.



Contrate los servicios de una compañía de mensajería para que acompañe al equipo de colecta cuando realice expediciones prolongadas en áreas remotas, y envíe el material perecedero o las semillas con viabilidad limitada al banco de germoplasma lo más pronto posible.

Traslado del material colectado al banco de germoplasma

El equipo de colecta debe garantizar la seguridad del material colectado hasta el momento en que termine la expedición y éste se transporte al banco de germoplasma. Exponer las semillas a condiciones ambientales desfavorables durante el traslado puede ser muy dañino.

- Hay que mantener el material a una temperatura óptima y a un contenido de humedad seguro aun cuando la distancia del traslado sea corta.
- Asegúrese de que el recipiente que contiene las muestras de las semillas sea acolchado, y que las semillas o frutos no sufran ningún daño durante el traslado.

B. Adquisición de germoplasma por correspondencia e intercambio

Cuando se sabe que ya se han hecho colectas en el área de interés, se pueden obtener muestras por correspondencia. Los bancos de germoplasma pueden requerir documentación de los países o de entidades independientes para certificar que el material está libre de organismos modificados genéticamente (OMG).

Identificación de muestras únicas para adquisición

Mantener muestras en un banco de germoplasma es costoso; antes de adquirir germoplasma, los bancos deben verificar que las muestras no formen parte de sus colecciones. Debido a que cada banco adopta su propio sistema de numeración, es posible que la misma accesión se registre dos veces con una identificación diferente. La mejor forma de identificar duplicados en una colección es comparar campos relevantes en las bases de datos de pasaporte de otros bancos que reciben o donan germoplasma.

Adquisición de germoplasma único

Obtenga información completa de pasaporte, incluyendo nombres alternos o números de identificación, pedigrí y fuente de origen.

- Prepare una lista final de las accesiones que se van a adquirir.
- Envíe la lista final de accesiones identificadas para adquisición al consignatario para facilitar la transferencia de las semillas.
- Si el material se recibe del exterior, verifique los requerimientos de las autoridades fitosanitarias del país receptor y siga los procedimientos para la importación de semillas descritos más adelante.

Las accesiones de germoplasma que han sido seleccionadas y ‘depuradas’ debido a características deseables, y las mutantes identificadas en cultivos de germoplasma, sirven como materia prima importante para el mejoramiento de los cultivos. Éstas incluyen fuentes de resistencia a problemas bióticos y abióticos, líneas androestériles, enanas y otras reservas genéticas. Los bancos de germoplasma deben adquirir este material junto con la información completa de pedigrí.

Los bancos también pueden adquirir germoplasma élite en programas de mejoramiento con características específicas o con rendimiento alto comprobado. Durante la adquisición, asegúrese de que el material venga con información detallada de pedigrí y datos de caracterización morfológica.

Introducción de germoplasma y cuarentena posterior al ingreso

Con frecuencia, los bancos de germoplasma adquieren germoplasma de áreas en donde han coevolucionado plagas, patógenos y especies hospederas. La siguiente clasificación ayudará a que el personal de los bancos de germoplasma evalúe el estado potencial de las enfermedades del material que se va a adquirir.

El riesgo de introducir nuevas plagas y patógenos es:

1. *bajo* para el germoplasma que ha sido colectado o producido



La mayoría de los errores se cometen durante el ingreso de los datos, particularmente en lo referente a espacios, guiones, minúsculas, mayúsculas y ortografía, lo cual requiere una cuidadosa verificación cuando se comparan bases de datos para identificar accesiones duplicadas.

- en el área o país en donde el banco de germoplasma está ubicado;
2. *medio* para el germoplasma colectado o producido en la misma región geográfica o continente en donde está ubicado el país receptor; y
 3. *alto* para el germoplasma colectado o producido en otros continentes y para material vegetativo.

Para reducir el riesgo de introducir plagas, patógenos y malezas, algunos países tienen leyes que regulan el ingreso de material exótico de propagación, incluyendo semillas. Antes de importar cualquier tipo de semilla, el importador se debe asegurar de cumplir con todos los requerimientos fitosanitarios del país de destino.

Las características generales de las regulaciones de importación pueden incluir provisiones como las siguientes:

- Puede ser necesario importar los envíos de vegetales y semillas a través de puntos específicos de entrada, según lo determine la autoridad nacional de protección vegetal del país importador.
- Se puede requerir que las semillas y el material de siembra se cultiven en aislamiento, o se mantengan en una instalación certificada de cuarentena, durante un período de tiempo específico después del ingreso, o que cumplan ciertas condiciones.
- Para envíos de plantas o productos vegetales, pueden existir provisiones adicionales.
- En general, está prohibida la importación de material de siembra, suelo, tierra, arena, abono y desechos vegetales que acompañen las semillas.

Los envíos probablemente serán inspeccionados y, si es necesario, desinfectados por personal fitosanitario autorizado antes de liberarlos, siempre y cuando se hayan cumplido todos los demás requerimientos del país importador. El incumplimiento de estos requerimientos puede ocasionar demoras innecesarias y puede causar la destrucción de material.

El material que requiera aislamiento se puede sembrar bajo cristal a prueba de plagas, en invernaderos o en parcelas de campo. El personal fitosanitario lleva a cabo inspecciones periódicas durante el período de crecimiento en el cual las plantas afectadas por plagas asociadas a las semillas se destruyen, mientras que las semillas colectadas de plantas sanas se liberan y entregan a los bancos de germoplasma.

Procedimiento para la importación de semillas

En la fase de planificación de la adquisición, preste atención a las plagas que se encuentran en las especies objetivo y a los requerimientos fitosanitarios para introducir el germoplasma.

1. Reúna información sobre las plagas que posiblemente se encuentren en el país o en el área de producción o de colecta de las semillas.
2. Determine en qué partes de la planta se encuentran estas plagas.
3. Verifique los requerimientos para la importación de semillas con la autoridad nacional fitosanitaria. Si es necesario, obtenga un *permiso de importación*¹ de plantas de la autoridad competente y envíelo al remitente antes de la importación. Todas las solicitudes fitosanitarias se deben presentar ante la autoridad nacional fitosanitaria del país anfitrión para aprobación.
4. Si se requiere cuarentena después del ingreso, siembre cada nueva accesión en condiciones de aislamiento.
5. Las plantas se deben observar periódicamente y aquellas que se sospecha están infectadas por plagas asociadas con las semillas se deben incinerar.
6. Todas las plantas asintomáticas se deben evaluar para verificar la presencia de infecciones latentes debidas a virus de conocida existencia en el lugar de origen y en el país de mantenimiento; las plantas infectadas se deben incinerar.
7. Las semillas se deben coleccionar de plantas sanas únicamente.

Organismos modificados genéticamente (OMG)

Los bancos de germoplasma deben estar conscientes de los peligros inherentes a la introducción inadvertida de transgénicos o cultivos modificados genéticamente durante la consecución de germoplasma, y deben tomar medidas para minimizar estas introducciones (ver Anexo I y también Sección 5.3 de este manual). Cuando se planea coleccionar o adquirir nuevas accesiones por otros medios, los bancos de germoplasma deben realizar un análisis de riesgo para determinar:

1. si es probable que haya un evento transgénico (comercial y de investigación) en los materiales de los taxa relevantes en el área de colecta o adquisición;
2. la distancia entre el sitio de colecta y las áreas en donde están situados los eventos transgénicos; y
3. si los proveedores del germoplasma pueden suministrar documentación pertinente sobre sus prácticas de manejo con respecto al material en cuestión.

¹ Un permiso de importación es una autorización escrita expedida por los servicios nacionales de protección vegetal para importar productos regulados, incluyendo plantas y productos vegetales.

Lectura complementaria

Ebbels, D.L. 2003. Principles of plant health and quarantine. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

FAO (2006). Third Session of the Intergovernmental Technical Working Group on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Roma, Italia, octubre 26 – 28 de 2005 <http://www.fao.org/waicent/FaoInfo/Agricult/AGP/AGPS/pgpr/ITWG3rd/docsp1.htm> (dirección vigente a octubre 18 de 2007).

Guarino, L., Rao, V.R. y Reid, R. (eds). 1995. Collecting plant genetic diversity. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Hay, F.R. y Smith, R.D. 2003. Seed maturity: when to collect seeds from wild plants. Pp. 97-133 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.

Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. FAO, Roma, Italia. http://www.planttreaty.org/index_es.htm.

2.2 Registro del germoplasma

¿Qué es el registro?

El registro es la asignación de un número de identificación único llamado *número de accesión* que permite ubicar cada muestra de semilla recibida en un banco de germoplasma y distinguirla de las demás.

¿Por qué se hace?

El registro se lleva a cabo con el fin de permitir que los bancos de germoplasma mantengan registros precisos de las muestras y preparen listas de inventario para conservación, distribución y otros aspectos de manejo del germoplasma.

¿Cuándo se hace?

El registro se hace cuando la muestra ingresa por primera vez al banco de germoplasma. Para un uso y manejo eficiente de las colecciones, registre las muestras si cumplen con las condiciones que se describen más adelante.

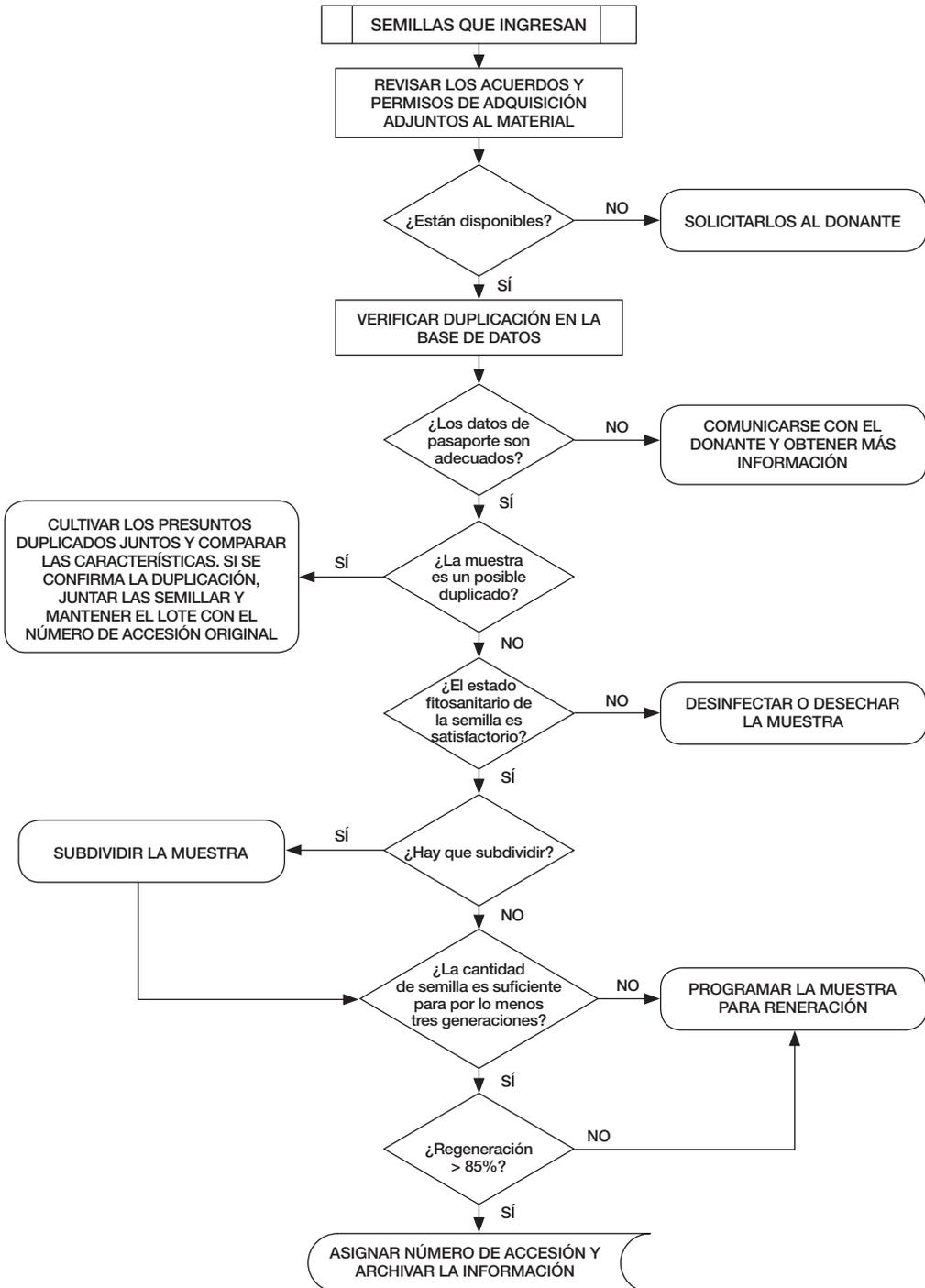
¿Cómo se hace?

El registro se lleva a cabo en varios pasos (ver Diagrama de Flujo 2.1).

Paso 1: Antes del registro

Antes de aceptar y registrar las muestras, el banco debe verificar en qué estado están para asegurar que cumplan las siguientes condiciones.

Diagrama de Flujo 2.1. Registro del germoplasma



Acuerdos y permisos de adquisición

Las muestras se deben haber adquirido de colectores, bancos de germoplasma u otras fuentes, con acuerdos y permisos apropiados de transferencia o adquisición de materiales, de acuerdo con las regulaciones nacionales e internacionales sobre conservación, distribución y uso (ver Anexo I para mayor información).

Datos de pasaporte

Las muestras deben estar acompañadas por una adecuada información de pasaporte, especialmente nombre del cultivar, número del colector y pedigrí (para reservas genéticas y material mejorado) para verificar que las muestras no forman ya parte del banco de germoplasma. Los datos mínimos de pasaporte requeridos pueden incluir los siguientes:

A. Muestras provenientes de misiones de colecta:

- Nombre común del cultivo, género y especie
- Número de colecta
- Ubicación del sitio de colecta
- País de origen
- Fecha de colecta
- Fenología
- Fuente de colecta
- Número de plantas muestreadas

B. Muestras recibidas como donación:

- Nombre común del cultivo, género y especie
- Nombre de la accesión u otra identificación asociada con la muestra
- Información del pedigrí y datos del instituto de mejoramiento (para las líneas de mejoramiento)
- Fenología
- Fuente de adquisición
- País de origen
- Número de accesión del donante (si corresponde)

Diferenciación genética

Las nuevas muestras deben ser genéticamente distintas de cualquier otra accesión ya registrada en el banco de germoplasma. Dos muestras pueden tener nombres idénticos o muy parecidos, e idénticas características de grano, pero pueden ser genéticamente muy diferentes; mientras que las muestras con nombres muy diferentes pueden ser genéticamente similares.

Para identificar duplicados, se pueden emplear métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares, dependiendo de las

facilidades y los recursos disponibles en el banco de germoplasma. Se pueden llevar a cabo las siguientes pruebas:

Morfológicas

- El material detectado como presunto duplicado se cultiva junto, en el campo o en un invernadero, y se comparan las diferencias entre características morfológicas como altura de la planta, tiempo de floración, tamaño de la flor y de las hojas, y forma y color de éstas.
- La accesión candidata se define como distinta cuando difiere de manera significativa en al menos una característica con respecto a las accesiones ya registradas en el banco.
- Las pruebas de diferenciación basadas en la morfología pueden ser similares al grupo de características específicas del cultivo que cumplen con las normas establecidas por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 1991). Si es necesario, estas características se pueden evaluar durante dos o tres ciclos de cultivo. Sin embargo, esto puede no resultar práctico en razas nativas con alta variabilidad dentro de la accesión.
- La prueba **t** es el procedimiento estadístico para evaluar la diferenciación.

Bioquímicas

Cuando la comparación fenotípica no arroja suficiente evidencia de diferenciación, se pueden emplear métodos bioquímicos como la electroforesis de las proteínas e isoenzimas de las semillas para comparar mejor los caracteres morfológicos y discriminar las muestras.

Moleculares

Los marcadores de ADN como los de AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), los de SSR (Repeticiones de secuencia simple) y los de SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido) ofrecen valiosas herramientas de discriminación y se pueden aplicar con éxito para verificar la relatividad genética entre muestras, siempre y cuando este enfoque sea factible y efectivo en costos. Para mayor información sobre los métodos moleculares, se sugiere consultar a de Vicente y Fulton (2003).

Si se confirma que las muestras comparadas son duplicados, se recomienda a los bancos de germoplasma hacer un solo lote con las semillas y tratarlas como una sola pieza. Si la muestra es idéntica a una accesión existente, consérvela bajo el número de la accesión original.

Sanidad de las semillas

- Cada muestra debe ir acompañada de un *certificado fitosanitario* y de declaraciones adicionales según se requiera de acuerdo con las regulaciones fitosanitarias del país anfitrión (ver Capítulo 7 para más detalles).
- Las muestras de semillas se deben inspeccionar mediante un examen visual bajo un microscopio estereoscópico. Éstas deben estar libres de patógenos, hongos, infecciones bacterianas y virales, e insectos.

Calidad y cantidad de las semillas

Las semillas deben ser de la más alta calidad y estar disponibles en una cantidad adecuada para el almacenamiento.

- En general, el porcentaje germinado no debe ser inferior al 85% en las especies cultivadas ni inferior a 75% en las especies silvestres (para mayor información sobre pruebas de germinación, ver Capítulo 5).
- La cantidad de semillas debe ser suficiente para hacer por lo menos tres regeneraciones. Esto garantizará que haya semillas disponibles para otra siembra incluso si el primer intento de regenerar fracasa (ver Recuadro 2.1).

¿Qué sucede si no se cumplen las condiciones mínimas?

Si la muestra no cumple las condiciones requeridas, asigne un *número temporal* hasta que la muestra esté lista para recibir un número de registro permanente. El número temporal se debe distinguir fácilmente de los números de otras accesiones.

Recuadro 2.1. Unidad base para el registro

El número mínimo de semillas para un registro (*unidad base*) se puede calcular a partir del tamaño de muestra estándar utilizado para regenerar y de la viabilidad de la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Número de semillas requeridas para registro = Población de plantas deseada para la regeneración x número mínimo de regeneraciones / (% de Germinación x Establecimiento de campo esperado 1)†*

Ejemplo:

Población de plantas deseada para cada regeneración = 100

Germinación = 95%

Establecimiento en campo esperado = 90%

Número mínimo de regeneraciones (factor de seguridad) = 3

Unidad base o número mínimo de semillas para el registro = $\frac{(100 \times 3)}{(0.95 \times 0.90)} = 351$ semillas

† La germinación y el establecimiento en campo se expresan en decimales; por ejemplo, 95% se expresa como 0.95. El establecimiento de la planta es generalmente 5% menos que el porcentaje de germinación en malas condiciones y 1% menos en buenas condiciones.

Acuerdos y permisos

Contacte al colector o donante para obtener los acuerdos necesarios que definan el estatus de las muestras con respecto a conservación y uso posterior.

Accesiones duplicadas

Confirme la duplicación y asigne las semillas como un nuevo lote bajo el número de la accesión original.

Datos de pasaporte incompletos

Escriba al colector o al donante del germoplasma para solicitar la información que falte.

Deficiencias en la sanidad de las semillas

Si las semillas contienen patógenos o insectos, envíe la muestra a un fitopatólogo o entomólogo para tratamiento. Si es posible adquirir una muestra para reemplazarla, inmediatamente incinere la muestra y registre la acción tomada y la justificación; solicite una nueva muestra al donante.

Cantidad y calidad inadecuada de las semillas

Regenere la muestra inmediatamente.

Reestructuración de las muestras

En cultivos de autopolinización, si una muestra consta de una mezcla física de dos o más especies o líneas diferentes, éstas se pueden subdividir y mantener como accesiones distintas. En este caso, la subdivisión de la muestra en sus componentes ayuda a mantener la integridad genética. Sin embargo, *no subdivida si la variación en la muestra original es continua, como ocurre en los cultivos de alta polinización cruzada.*

Paso 2: Procedimiento para el registro

Si la muestra cumple con las condiciones mínimas descritas anteriormente, se puede aceptar para registro y se le puede asignar un número de accesión utilizando el siguiente procedimiento:

1. Organice el material en orden alfabético por nombre de la variedad o en orden numérico por número de colecta, dependiendo de la identificación suministrada.
2. Revise todos los paquetes con el listado que acompaña las muestras.
3. Si no se ha entregado un listado o las semillas no corresponden a los datos, prepare un nuevo listado. Verifique de nuevo para confirmar que todos los paquetes se han incluido.
4. Revise el archivo de datos de pasaporte para determinar el último número de accesión asignado.



Si las muestras se registran sin los datos de pasaporte adecuados, su identidad y estado biológico seguirán siendo desconocidos, lo cual va a obstaculizar su uso. Si la regeneración arroja muestras con baja viabilidad o muy pocas semillas, la accesión se puede perder y quedará un vacío en el inventario.

5. Asigne el siguiente número de accesión, en orden ascendente, a la primera muestra en el listado y los números consecutivos a las muestras subsiguientes.
6. Con un marcador permanente escriba con claridad el número de la accesión en el paquete y en el listado de las nuevas muestras.
7. Ingrese la información en los archivos de datos de pasaporte del sistema de documentación del banco de germoplasma. Para cada accesión, registre todos los datos de pasaporte, los datos de pasaporte originales y la fecha de registro en los campos designados del archivo de datos de pasaporte.
8. Si faltan datos, deje el espacio en blanco y contacte al donante para que proporcione la información faltante.

Procedimientos de numeración para nuevos bancos de germoplasma

El sistema de numeración de un banco de germoplasma debe ser sencillo y práctico.

- Utilice un sistema estrictamente numérico, que sea secuencial (1, 2, 3). A los números asignados, por lo general los precede un acrónimo (como BGK para Banco de Germoplasma de Kenia) para identificar cada muestra con su banco de germoplasma registrado. La información adicional, como año de adquisición y código de cultivo, no se debe incorporar al número de una accesión.
- Cuando se mantienen grandes colecciones de germoplasma se puede asignar a cada cultivo una numeración de accesión aparte, pero secuencial. Este método no se recomienda si el banco es pequeño o tiene muchos cultivos.
- Cuando utilice un solo sistema de numeración, evite asignar números ‘reservados’ a cultivos específicos (por ejemplo, 1 a 500 para maíz, 501 a 1000 para caupí) o a especies silvestres.

Documentación

Un aspecto importante del proceso de registro es documentar la información recibida con una muestra. La información documentada en el registro contiene los datos de pasaporte, es decir, la información básica que permite identificar y manejar las accesiones.

Gran parte de esta información se registra cuando la muestra se colecta, o viene con la muestra cuando ésta se recibe de otras fuentes. El uso de listas de descriptores internacionalmente aceptados para documentar los datos de pasaporte simplifica el intercambio de datos entre bancos de germoplasma. La Lista de Descriptores de Pasaporte para Cultivos Múltiples desarrollada por la FAO y el IPGRI está disponible en http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pdf/124_ES.pdf.

Lectura complementaria

de Vicente, C. y Fulton, T. 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje Vol. 1. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/publications/pubfile.asp?ID_PUB=1015.

Engels, J.M.M. y Visser, L. (eds.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbook for Genebanks No. 6. IPGRI, Roma, Italia. (próximamente disponible en español)

Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). 1991. Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. UPOV, Ginebra. Disponible en la dirección <http://www.upov.int/es/publications/conventions/1991/act1991.htm>.

1. **Introducción**
2. **Adquisición y registro del germoplasma**
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. **Limpieza de las semillas**
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**



Mantener accesiones en un banco de germoplasma es costoso. Conserve en almacenamiento sólo semillas limpias y de alta calidad.

3. LIMPIEZA DE LAS SEMILLAS

¿En qué consiste la limpieza de las semillas?

La limpieza de semillas es la eliminación de desechos, material inerte, semillas dañadas e infectadas, y semillas de otras especies con el fin de mejorar la calidad de las muestras para almacenamiento (ver Diagrama de Flujo 3.1).

¿Por qué limpiar las semillas?

Limpia las semillas:

- reduce el volumen durante el transporte porque se eliminan materiales extraños;
- mejora la pureza de la muestra porque se eliminan las semillas dañadas e inmaduras;
- optimiza el espacio de almacenamiento y reduce los costos.

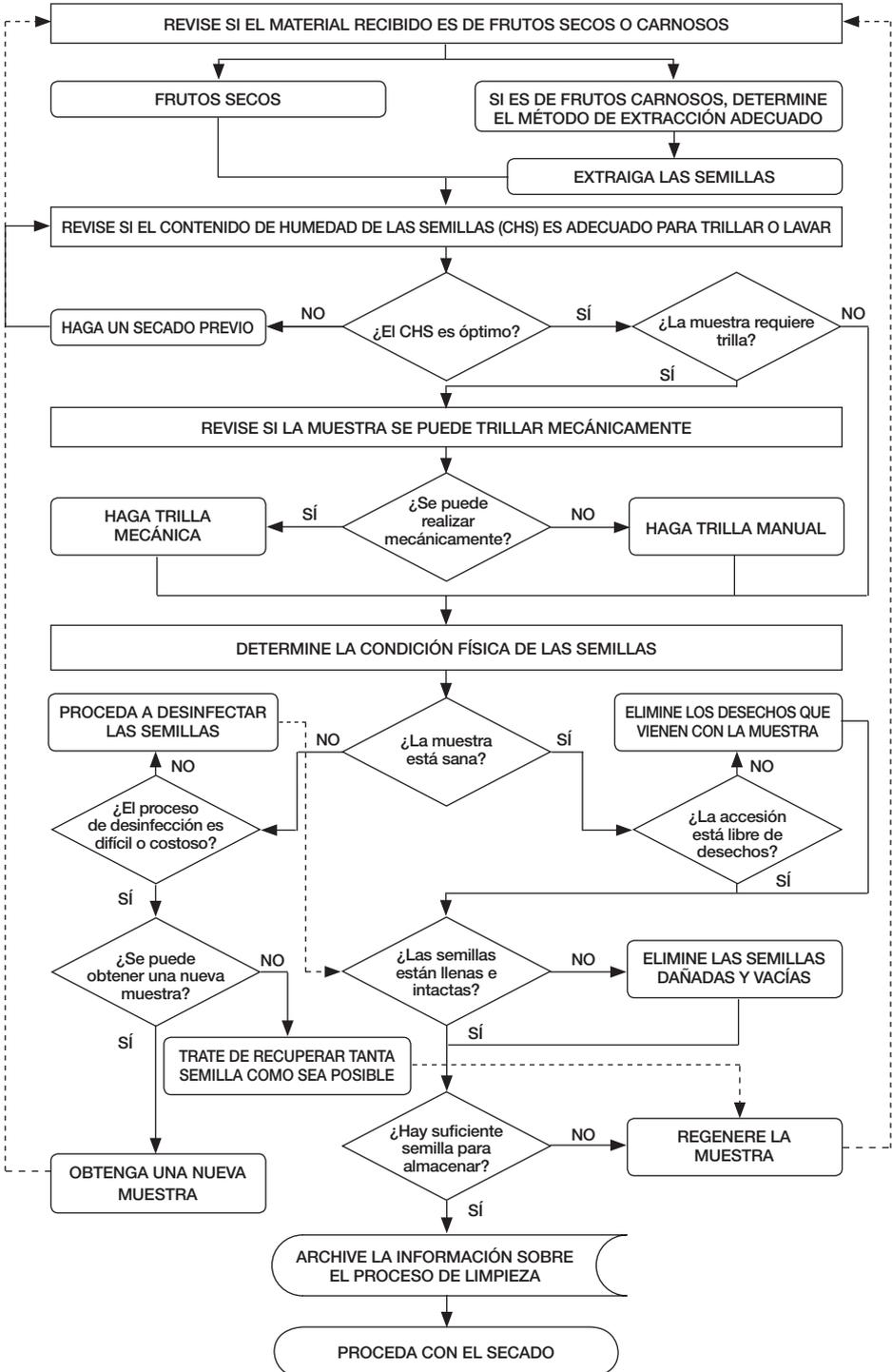
Los cultivos de frutos pueden requerir una limpieza previa para retirar las hojas y ramas, lo cual reduce el volumen y evita la posible dispersión de enfermedades y plagas.

¿Cuándo se deben limpiar las semillas?

Las semillas se deben limpiar inmediatamente después de colectarse o tan pronto lleguen al banco de germoplasma. Los frutos pueden ser suaves y carnosos, como las drupas cuya pulpa es carnosa, o duros y coriáceos como las vainas. Por lo tanto, el primer paso en la limpieza consiste en extraer las semillas.

Si las semillas no se pueden manipular de inmediato, los frutos se pueden almacenar por un período corto antes de extraer las semillas. Los frutos suaves se almacenan mejor a 10-15°C en condiciones de humedad suficientemente alta para evitar que se sequen. Los frutos duros o secos se almacenan mejor a la sombra, dispuestos en capas delgadas. Es esencial que el aire circule libremente entre los frutos húmedos. Para facilitar esto, los frutos se deben mantener en recipientes ventilados como bandejas con agujeros o mallas de alambre en el fondo, o en bolsas de malla de nylon.

Diagrama de Flujo 3.1. Limpieza de las semillas



Extracción de las semillas de los frutos

Las semillas deben estar maduras antes de la extracción. Si no lo están, los frutos se pueden poner a madurar con las semillas adentro dejándolos en un ambiente fresco, bien ventilado. Las condiciones de almacenamiento deben simular las de la planta madre. Los procedimientos para la extracción de semillas varían de acuerdo con el tipo de fruto.

Extracción de semillas de frutos secos dehiscentes

Generalmente, los bancos de germoplasma reciben semillas provenientes de frutos secos dehiscentes después de la trilla. En algunos casos, sin embargo, las reciben en frutos como cabezuelas o como inflorescencias que es necesario separar de la vegetación.

Muchos frutos secos dehiscentes (cápsulas, silicuas, folículos y vainas dehiscentes) se abren fácilmente durante el secado cuando están dispersos en una capa delgada con suficiente circulación de aire. La liberación física de las semillas de sus frutos varía según la especie. En algunas, un movimiento leve como rastrillarlas, sacudirlas o dejarlas caer es suficiente para que salgan todas. Las semillas de ciertas especies como algunas leguminosas mantienen una fuerte unión a través del funículo y las semillas pueden requerir extracción manual o trilla. La trilla también es necesaria cuando las semillas se reciben como cabezuelas (maíz, millo perla, etc.). Esto se debe hacer cuando el contenido de humedad de las semillas se encuentra entre el 12 y el 16% con el fin de minimizar el daño a las semillas.

Las semillas se pueden trillar ya sea en forma manual o mecánica.

- La trilla manual es el método preferido porque la probabilidad de dañar las semillas durante este proceso es menor. Las semillas se pueden trillar colocándolas en sacos o esparciéndolas sobre un piso de trilla y golpeándolas con palos. Otro método para extraer las semillas unidas fuertemente a las vainas es frotarlas con cuidado entre dos superficies ásperas, como caucho, lija o piedras, teniendo cuidado de no escarificarlas o aplastarlas.
- Cuando se usan trilladoras mecánicas, es esencial limpiar las máquinas con un cepillo o un soplador de aire entre lotes para:
 - evitar contaminación con semillas de accesiones previamente trilladas; y
 - prevenir la transmisión de enfermedades y plagas de una accesión a otra.

Extracción de semillas de frutos secos indehiscentes

La extracción de las semillas de algunos frutos indehiscentes puede requerir ruptura mecánica. Para facilitar que los frutos se tornen quebradizos y se puedan extraer las semillas, es necesario hacer un secado inicial.

- Las semillas de frutos más grandes (como el maní y los frijoles) se pueden extraer rompiendo cada fruto manualmente aplicando tratamiento mecánico sin dañar las semillas.
- Los frutos indehiscentes más pequeños (como el garbanzo y las brassicas) se pueden romper por medio de la trilla como ya se describió.
- Las vainas con material pegajoso (como *Prosopis cineraria*) necesitan varios ciclos intermitentes de trilla y secado.

Técnica de sudoración para las gramíneas forrajeras

La sudoración es una técnica útil para mejorar la madurez y facilitar la trilla y la limpieza de algunas semillas de gramíneas tropicales que se conservan muy juntas dentro de las glumas. La técnica consiste en apilar las cabezuelas recién cortadas, envolviéndolas en pasto o en lona para que se calienten o suden, y dejándolas a la sombra durante tres o cuatro días, evitando que se sequen. Pasado este tiempo, las semillas maduras se expulsan con facilidad sin necesidad de trilla. La pila se debe vigilar y voltear ocasionalmente para evitar que se caliente de más, puesto que las temperaturas muy altas durante la sudoración pueden deteriorar las semillas.

Extracción de semillas de frutos carnosos

El método de extracción de frutos carnosos varía según el tipo de fruto.

- La mejor forma de extraer las semillas es cortar el fruto en dos o cortar el extremo distal y exprimir el contenido en un recipiente.
- Las semillas pequeñas de frutos pulposos se pueden extraer macerando la pulpa y mezclándola con agua, dejando que las semillas se asienten en el fondo y vertiendo después la pulpa con cuidado.
- Las semillas grandes (como las de *Citrus* spp.) se pueden separar de la pulpa con fórceps. La pulpa también se puede retirar lavando las semillas en cribas, en agua corriente, o frotándolas contra una malla de alambre y enjuagándolas para retirar la pulpa. Para cantidades grandes de pulpa, se puede utilizar una licuadora, pero hay que tener cuidado de no sobrepasar el tiempo de licuado y arruinar las semillas. Licúe por períodos cortos y en forma intermitente, a velocidades bajas. Cubrir las cuchillas de la licuadora con un revestimiento de caucho puede también minimizar el daño. Para evitar daño físico a las semillas durante este proceso, es preferible el procesamiento manual.
- Después de lavar las semillas, séquelas a la sombra donde circule el aire y evitando el calor, dispuestas en capas delgadas sobre hojas de papel absorbente.

Semillas mucilaginosas

Si las semillas están recubiertas de mucílago (como en el tomate, el pepino y en algunos melones) y éste no se puede sacar con el lavado, existen varias opciones:

- Con la mano enguantada, frote con cuidado las semillas mojadas sobre una malla de alambre (el tamaño de la malla debe retener las semillas mientras que la pulpa pasa a través de ella).
- Frote con cuidado las semillas con arena gruesa limpia y lávelas posteriormente para retirarles la arena y el mucílago.
- También puede secar las semillas primero y frotarlas luego para retirar el mucílago seco. Asegúrese de que las semillas no se peguen a la superficie de secado y que estén bien separadas para evitar que se peguen entre sí durante el secado.
- Para remover el mucílago, también se utiliza la fermentación de la masa gelatinosa (a 20-25°C hasta por tres días); el tratamiento ácido (solución de ácido clorhídrico al 2-4% adicionada a la masa en una proporción de 1:1, durante una hora), la digestión enzimática (solución de pectinasa, 0.1% peso/volumen adicionada a la masa en una proporción de 1:40, durante 24 horas) y el bicarbonato de sodio (solución a 10% mezclada con la masa en una proporción de 1:1, durante 18-24 horas). Los tratamientos prolongados pueden dañar las semillas; por esta razón, se deben utilizar con cuidado.

Frutos con pulpa firmemente adherida

Los frutos en los que la pulpa está adherida firmemente a las semillas (como la almendra) se pueden procesar empleando los siguientes métodos:

- Sumerja los frutos en cubetas u otros recipientes adecuados hasta que estén suaves, pero no por mucho tiempo pues pueden empezar a fermentarse, como lo indicarían las burbujas y el olor. Separe las semillas de la pulpa de forma manual.
- Macere los frutos mojados para separar la pulpa de las semillas.

Después de retirar la pulpa, lave muy bien las semillas para eliminar cualquier rastro de pulpa. El mejor método es lavar bajo un chorro de agua.

Drupas (frutos de hueso)

A las drupas (como el melocotón, la ciruela y el albaricoque) se les puede retirar la pulpa en un procesador de alimentos (las cuchillas se deben proteger con caucho) para evitar el riesgo de dañar las semillas. Para pequeñas cantidades de semillas, también es conveniente retirar la pulpa manualmente con un cuchillo afilado. Después de despulpar, lave los huesos en agua corriente para eliminar cualquier rastro de pulpa y seque la superficie. Si se deben



No intente secar las semillas si sabe que son recalcitrantes y no pueden sobrevivir la desecación a un contenido de humedad bajo.

extraer las semillas para almacenamiento, seque los huesos y rompa cada endocarpio con unas tenazas, aplicando presión en el punto más ancho del eje longitudinal del hueso. Una alternativa es insertar una cuchilla resistente en la hendidura y girarla.

Es importante que las semillas ortodoxas que se han separado de los frutos se sequen rápidamente a temperaturas adecuadas para reducirles el contenido de humedad para almacenamiento a largo plazo.

Cómo limpiar las semillas

La limpieza no debe causar ni daño ni desperdicio alguno a las muestras. Se puede realizar de manera manual o con equipos aunque se recomienda a los bancos limpiar las accesiones manualmente por las siguientes razones:

- La limpieza mecánica puede resultar en un proceso de selección de accesiones genéticamente heterogéneas (debido a que el paso por aberturas mecánicas excluye las semillas muy pequeñas o muy grandes).
- Los equipos requieren una limpieza rigurosa y un ajuste cuidadoso entre tandas de accesiones.

Paso 1: Separación de los desechos

El primer paso en la limpieza de la semillas es eliminar todos los desechos (materiales que no son semillas) de la totalidad de la muestra.

- Utilice cribas manuales con diferente tamaño de malla para eliminar desechos grandes y muy finos. Al limpiar accesiones genéticamente heterogéneas, es importante devolver las semillas pequeñas al lote de la accesión.
- Separe las semillas vacías y cualquier otro material liviano como cascarilla que no haya sido separado en el cribado mediante cernido² o colocándolas en un soplador de semillas³.

Paso 2: Inspección de las semillas para detectar daño ocasionado por hongos o insectos

- Disperse las semillas sobre una superficie plana bien iluminada de color contrastante y observe cualquier señal visible de infestación. Utilice una mesa iluminada o una mesa de trabajo para determinación de pureza si se dispone de ellas.

² Las semillas se colocan en cestas planas y se arrojan al aire. El viento hace volar el material liviano como el polvo y los fragmentos de hojas mientras que las semillas caen de nuevo en la cesta por ser más pesadas.

³ Los lotes de semilla se colocan en el cilindro vertical conectado en la parte inferior a una corriente de aire impulsada por electricidad. La corriente de aire en movimiento ascendente desplaza todo el material liviano como cascarilla hacia la parte superior, mientras que las semillas se acumulan en la parte inferior por ser más pesadas.

- Si descubre que las semillas están mohosas o infestadas:
 - aisle la muestra afectada del resto del material;
 - seque las semillas hasta obtener un contenido de humedad bajo, en recipientes sellados con gel de sílice, para evitar mayor dispersión de hongos o insectos;
 - si sospecha que hay infestación, almacene las semillas a una temperatura bajo cero en un congelador, durante siete días, para matar los insectos antes de retirar las semillas infectadas y continuar con los procedimientos normales de empaque y almacenamiento.

Paso 3: Inspección de las semillas para detectar daño mecánico y semillas vacías

- Disperse las semillas sobre una superficie plana bien iluminada de color contrastante, como una mesa iluminada o una mesa de trabajo para determinación de pureza.
- Examine si existe daño físico o alguna semilla vacía.
- Manualmente separe y descarte cualquier semilla visualmente dañada o marchita.
- Separe las semillas vacías y el material liviano mediante una corriente de aire como se describió anteriormente.

Paso 4: Análisis de pureza

La pureza es una indicación de qué tan 'limpio' está el lote de semillas. La información sobre la composición real del lote de semillas es importante; el análisis de pureza sirve para determinar si es necesario hacer una limpieza adicional. Durante el análisis de pureza, cada fracción⁴ de semilla 'pura' de la muestra de trabajo se separa de la materia inerte y de otras semillas.

- Con una balanza electrónica, pese una muestra de trabajo de un determinado peso (por ejemplo 250 g) del total del lote de semillas, escogida al azar.
- Disperse la muestra sobre la mesa y separe manualmente, con pinzas, todas las semillas puras, o retire las impurezas con una corriente de aire, seleccionando o dejando que las semillas rueden por una superficie inclinada.



La pureza debe atribuirse a las muestras libres no sólo de semillas de malezas y otras especies cultivadas, desechos y material inerte, sino también de semillas vacías, inmaduras, dañadas e infectadas. Los bancos de germoplasma deben buscar la pureza absoluta –es importante establecer estándares tan altos como del 95% para la proporción de semillas puras en las accesiones. Si una accesión no cumple este estándar después de la limpieza inicial, debe volverse a limpiar tantas veces como sea necesario hasta obtener la pureza absoluta.

⁴ La International Seed Testing Association (ISTA, 2005) especifica que una fracción de semilla pura contiene: (i) semillas intactas de especies reales al igual que semillas muertas, marchitas, enfermas, inmaduras y pregerminadas; (ii) aquenios y frutos similares, como la sámara, con o sin perianto, sin importar si contienen o no semilla verdadera, a menos que sea evidente que no contienen ninguna; y (iii) fracciones de semillas partidas, aquenios, etc., que tienen más de la mitad del tamaño original. Los bancos de germoplasma deben atribuir pureza a las muestras no sólo libres de semillas de malezas y otras especies cultivadas, desechos y material inerte, sino de semillas vacías, inmaduras, dañadas e infectadas.

- Pese la fracción de semilla 'pura' y exprese la pureza como el porcentaje de peso de semilla pura sobre el peso total de la muestra de trabajo, como se indica a continuación.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Peso de las semillas puras (g)}}{\text{Peso total de la muestra de trabajo (g)}} \times 100$$

Ejemplo:

Peso total de la muestra de trabajo = 250 g

Peso de las semillas puras = 245.2 g

Materia inerte = 3.5 g

Otras semillas = 1.3 g

Pureza (%) = $\frac{245.2 \times 100}{250} = 98.08\%$

Paso 5: Verificación

Después de la limpieza:

- haga otra inspección visual de las muestras para verificar la pureza y la presencia de semillas dañadas.
- revise la muestra de referencia (ver Capítulo 6) o los datos de referencia para comparar el color y la forma de las semillas, si las muestras se han recibido después de una regeneración.
- destruya cuidadosamente el material de desecho para evitar la propagación de insectos y enfermedades a otro material.

Equipo útil

El siguiente equipo es útil en la limpieza de las semillas:

- Cribas: un juego de cribas graduadas y apilables como las que se usan para evaluación de suelos. Los tamaños más útiles son los números estándar 5, 10, 18, 35 y 60, correspondientes a orificios con un tamaño de 0.1574"/4 mm, 0.787"/2 mm, 0.394"/1 mm, 0.197"/0.5 mm y 0.0098"/25 mm. Se pueden utilizar también cedazos de cocina con diferentes tamaños de malla o un paño de tejido grueso
- Tazas medidoras de vidrio de una variedad de tamaños: tazas medidoras Pyrex de 1, 2 y 4 tazas
- Bandejas pequeñas, tazones para mezclar, coladores, escurridores y otros recipientes plásticos; también son útiles los utensilios de cocina comunes
- Utensilios para cortar: un cuchillo afilado, un cuchillo de sierra, cuchillas de afeitar o una navaja de afeitar con cuchillas desechables, tijeras podadoras de punta fina
- Tabla para picar
- Alicates tipo 'hombre solo'

- Limas, lijas, ralladores de alambre y otras herramientas abrasivas
- Filtros como los Melitta para el café, número 6, y papel de filtro
- Lámpara con lente, lupa para portar en la cabeza y lupas manuales con aumento de 7 a 14 veces
- Fórceps, pinzas, tenazas
- Secador de pelo manual, preferiblemente de varias velocidades con la unidad de calor deshabilitada
- Soplador de semillas –un aparato mecánico para cernir semillas para reducir la cantidad de desechos, especialmente en la semilla de las gramíneas (e.g., soplador de semillas South Dakota)
- Ventilador pequeño
- Licuadora con las cuchillas forradas en caucho
- Botellas con atomizador de perilla ajustable

Documentación

Muchos bancos de germoplasma tienden a no documentar los procesos de limpieza de las semillas, excepto la fecha en que ésta se ha efectuado. Dado que las colecciones de germoplasma con frecuencia contienen materiales de especies con características de semilla y fruto diversas, y considerando que los procedimientos de limpieza varían de acuerdo con el cultivo y las accesiones, es importante que todos los datos asociados se capturen y almacenen para referencia futura. Los siguientes descriptores se pueden utilizar para documentar información a nivel de accesión sobre la limpieza de las semillas:

- Tipo de muestra
- Método de extracción
- Método de trilla
- Método de limpieza
- Fecha de limpieza
- Proporción de semilla vacía, inmadura o dañada (%)
- Cantidad total o peso de las semillas después de la limpieza
- Pureza de las semillas (%)

Lectura complementaria

Ellis, R.H., Hong, T.D. y Roberts, E.H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volumen 1. Principles and methodology. IBPGR, Roma, Italia. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=433.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. Sitio de la ISTA en la dirección <http://www.seedtest.org>.

Schmidt, L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Dinamarca.

4. Contenido de humedad

1. Introducción
2. Adquisición y registro del germoplasma
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. Limpieza de las semillas
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**



En los bancos de germoplasma, el contenido de humedad normalmente se expresa con base en el peso fresco.

4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y SECADO DE LAS SEMILLAS

4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas

¿Qué es el contenido de humedad de las semillas?

El contenido de humedad de las semillas (CHS) es la cantidad de agua que hay en una semilla. El agua está presente tanto en forma libre como combinada con los compuestos químicos de las células, como los carbohidratos y las proteínas.

El CHS se expresa en términos del peso del agua contenida en una semilla como porcentaje del peso total de la semilla antes del secado, conocido como peso húmedo o como base de peso fresco (pf) (International Seed Testing Association [ISTA], 2005).

$$\text{CHS (\% pf)} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

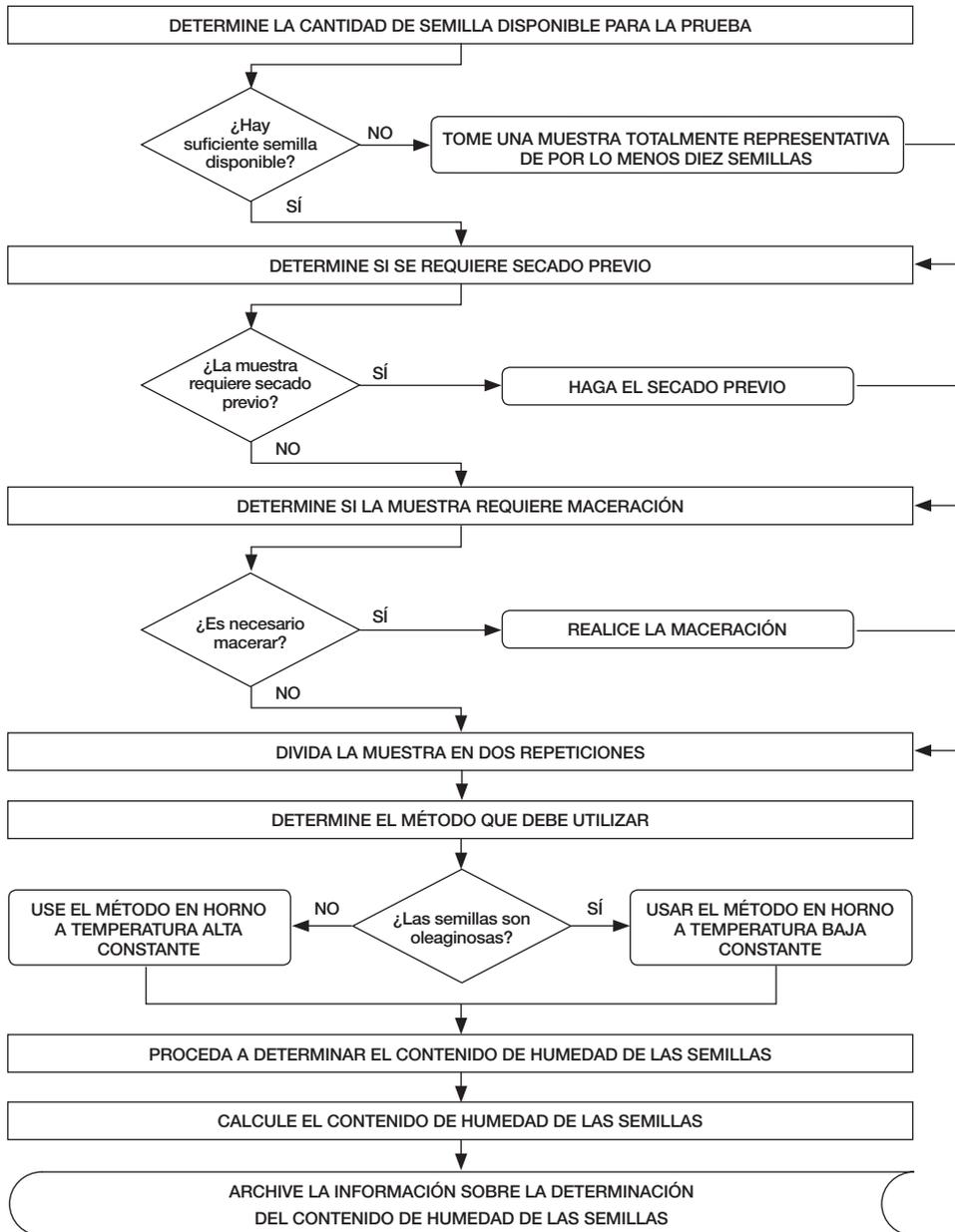
El contenido de humedad también se puede expresar con base en el peso seco (ps), es decir, la pérdida de peso como porcentaje del peso seco de las semillas.

$$\text{CHS (\% ps)} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100$$

¿Por qué es importante determinar el contenido de humedad de las semillas?

El contenido de humedad es el factor más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran, y tiene un impacto considerable en la longevidad de las semillas en almacenamiento en un banco de germoplasma. Incluso pequeños cambios en el contenido de humedad tienen un gran efecto en la vida en almacenamiento. Es importante determinar el contenido de humedad antes de almacenar las semillas para predecir con

Diagrama de Flujo 4.1. Determinación del contenido de humedad de las semillas



exactitud el potencial de vida en almacenamiento que tendrá cada accesión.

Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se puede determinar mediante dos métodos (ver Diagrama de Flujo 4.1):

- el método de secado en horno, descrito por la ISTA (2005); y
- los medidores de humedad.

Método de secado en horno

El método más preciso para determinar el contenido de humedad es el de secado en horno, por medio del cual se elimina el agua de las semillas por la acción del calor, en condiciones controladas. Este método destruye las semillas y sólo se debe realizar cuando sea imprescindible. Se recomienda hacer una determinación precisa con este método después del secado para determinar el contenido de humedad inicial de las semillas almacenadas.

La ISTA (2005) ha reglamentado dos métodos diferentes de secado en horno para determinar el contenido de humedad, con base en la composición química de las semillas:

- el método en horno a temperatura baja constante para semillas oleaginosas; y
- el método en horno a temperatura alta constante para semillas no oleaginosas.

El Cuadro 4.1 presenta el método recomendado para el secado de cultivos y especies forrajeras importantes.

Secado previo

El secado previo es obligatorio si las semillas están húmedas y se presume que su contenido de humedad está por encima del 17% (10% para soya y 13% para arroz). Se debe hacer antes de determinar el contenido de humedad mediante el secado en horno. Si tiene que hacer secado previo, proceda de la siguiente manera:

1. Pese dos submuestras de 4-5 g de semilla en sus recipientes.
2. Seque las muestras durante la noche en un lugar cálido y seco como un mesón de laboratorio.
3. Péselas de nuevo en sus recipientes y determine la pérdida de peso (pérdida de humedad) mediante una resta.
4. Calcule el contenido de humedad con base en el peso fresco.

Equipo

Para determinar el contenido de humedad por medio del secado en horno se necesita el siguiente equipo:

- un horno de convección mecánica (de tiro forzado) con un tiempo de recuperación de 15 minutos o menos, que pueda

mantener la temperatura requerida dentro de 1°C y adaptado con un termómetro de precisión hasta de 0.5°C;

- recipientes de secado no corrosivos (de metal o vidrio) con tapas bien ajustadas –el tamaño del recipiente debe permitir que la altura de la muestra distribuida de manera homogénea sea inferior a los 0.3 g cm⁻²;
- un molino con velocidades ajustables para obtener tamaños de partícula específicos (0.5-4.0 mm) –no debe calentarse de más mientras hace la maceración;
- una balanza analítica que pueda pesar hasta con 3-4 decimales (0.001-0.0001 g);
- un desecador que venga con una placa de cerámica o metal gruesa que promueva un enfriamiento rápido de los recipientes, y que tenga en el fondo un desecante como gel de sílice o cloruro de calcio; y
- pinzas o guantes para manipular recipientes calientes.

Cuadro 4.1. Método recomendado para determinar la humedad de cultivos y especies forrajeras importantes (ISTA, 2005)

Método en horno a temperatura baja constante

Ajonjolí (<i>Sesamum</i>)	Cebolla (<i>Allium</i>)	Ricino (<i>Ricinus</i>)*
Algodón (<i>Gossypium</i>)*	Lino (<i>Linum</i>)	Soya (<i>Glycine</i>)*
Berenjena (<i>Solanum</i>)	Maní forrajero (<i>Arachis</i>)	Todas las especies arbóreas
Brassicas	Pimentón (<i>Capsicum</i>)	
Camelina (<i>Camelina sativa</i>)	Rábano (<i>Raphanus</i>)*	

Método en horno a temperatura alta constante

Achicoria (<i>Cichorium</i>)	Frijol (<i>Phaseolus</i>)*	Perifollo (<i>Anthriscus</i>)
Aíra de cesped (<i>Deschampsia</i>)	Garbanzo (<i>Cicer</i>)*	Pipirigallo (<i>Onobrychis</i>)
Alcaravea (<i>Carum</i>)	Guisante (<i>Pisum</i>)*	Raigrás (<i>Lolium</i>)
Alfalfa (<i>Medicago</i>)	Heno blanco (<i>Holcus</i>)	Remolacha (<i>Beta</i>)
Alpiste (<i>Phalaris</i>)	Lechuga (<i>Lactuca</i>)	Sandía (<i>Citrullus</i>)*
Arroz (<i>Oryza</i>)*	Loto (<i>Lotus</i>)	Serradella (<i>Ornithopus</i>)
Arvejilla (<i>Vicia</i>)*	Lupino (<i>Lupinus</i>)*	Sorgo (<i>Sorghum</i>)*
Avena (<i>Avena</i>)*	Maíz (<i>Zea</i>)*	Tomate (<i>Lycopersicon</i>)
Avena alta (<i>Arrhenatherum</i>)	Millo (<i>Panicum</i>)	Trébol (<i>Trifolium</i>)
Berro (<i>Lepidium</i>)	Pasto azul (<i>Poa</i>)	Trébol de Santa María (<i>Melilotus</i>)
Bromo (<i>Bromus</i>)	Pasto bermuda (<i>Cynodon</i>)	Trigo (<i>Triticum</i>)*
Cebada (<i>Hordeum</i>)*	Pasto dalis (<i>Paspalum</i>)	Trigo sarraceno (<i>Fagopyrum</i>)*
Centeno (<i>Secale</i>)*	Pasto pata de gallo (<i>Dactylis</i>)	Zanahoria (<i>Daucus</i>)
Cola de perro (<i>Cynosurus</i>)	Pasto quila (<i>Agrostis</i>)	Zapallo (<i>Cucurbita</i>)
Cola de zorra (<i>Alopecurus</i>)	Pasto rhodes (<i>Chloris</i>)	
Comino (<i>Cuminum</i>)	Pasto timothy (<i>Phleum</i>)	
Espárrago (<i>Asparagus</i>)	Pepino (<i>Cucumis</i>)	
Festuca (<i>Festuca</i>)	Perejil (<i>Petroselinum</i>)	

*requiere maceración

Tamaño de muestra y muestreo

El método de secado en horno es destructivo; considerando que la cantidad de semilla en la mayoría de los bancos de germoplasma es limitada, se deben emplear pesos de muestra pequeños.

1. Dependiendo de la disponibilidad, use dos repeticiones independientes de 0.5-1.0 g de semilla o un mínimo de diez semillas para determinar la humedad.
2. La muestra debe ser representativa de toda la accesión. Asegúrese de que el lote de semillas esté bien mezclado y que la muestra se extraiga de porciones pequeñas en diferentes áreas del lote de semillas.
3. Una vez tomada la muestra, conserve las semillas en recipientes a prueba de humedad hasta que se sometan a la prueba, para evitar cambios en el contenido de humedad.



Recuerde que si el lote de semillas proviene de almacenamiento en frío, el agua se puede condensar en las semillas. Al hacer un muestreo, no abra los recipientes hasta que éstos hayan alcanzado la temperatura ambiente.

Maceración

Algunas semillas hay que macerarlas para obtener partículas más pequeñas y ayudar a que el secado sea uniforme y completo. El Cuadro 4.2 presenta una lista de las especies que requieren maceración.

Cuadro 4.2. Especies que requieren maceración (ISTA, 2005)

<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Gossypium</i> spp.	<i>Pisum sativum</i>
<i>Avena</i> spp.	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lathyrus</i> spp.	<i>Sorghum</i> spp.
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Lupinus</i> spp.	<i>Triticum</i> spp.
<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Vicia</i> spp.
<i>Glycine max</i>	<i>Phaseolus</i> spp.	<i>Zea mays</i>

Determinación del contenido de humedad

Método de temperatura alta constante para semillas no oleaginosas

El contenido de humedad se determina de la siguiente manera:

1. Seque los recipientes a 130°C durante una hora y déjelos enfriar en el desecador durante otra hora.
2. Rotule y pese cada recipiente, incluyendo la tapa, y registre el peso en la hoja de datos que aparece en el Cuadro 4.3 (columna P1). Para efectos de precisión en el cálculo de la humedad, el tamaño y el peso de los recipientes deben ser proporcionales al peso de la muestra utilizada.
3. Coloque dos submuestras de 0.5-1.0 g, seleccionadas al azar de cada muestra (secadas previamente y maceradas si es necesario), en dos recipientes aparte, que harán las veces de



Una vez que las muestras se han puesto en el horno y se ha cerrado la puerta de éste, el período de secado comienza cuando el horno alcanza la temperatura requerida.

- repeticiones. Vuelva a ponerles la tapa, péselos de nuevo y registre el peso en el Cuadro 4.3 (columna P2).
4. Coloque los recipientes sin la tapa en un horno que ha mantenido a 130-133°C.
 5. Seque las semillas durante una a cuatro horas, dependiendo de la especie (cuatro horas para *Zea mays*, dos horas para otros cereales y una hora para otras especies).
 6. Vuelva a colocar la tapa en cada recipiente al final del período de secado.
 7. Lleve los recipientes a un desecador y déjelos enfriar durante 45 minutos.
 8. Registre el peso de los recipientes con las muestras en el Cuadro 4.3 (columna P3).
 9. Calcule el contenido de humedad con base en el peso fresco y expréselo en un porcentaje hasta con un decimal, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100$$

en donde
 P1 = peso del recipiente con la tapa;
 P2 = peso del recipiente con la tapa y la muestra antes del secado; y
 P3 = peso del recipiente con la tapa y la muestra después del secado.
 10. Repita la prueba si el contenido de humedad entre las dos repeticiones difiere en más de 0.2%.

Cuadro 4.3. Registro y determinación del contenido de humedad de las semillas

No. de accesión	No. de repetición / recipiente	Peso del recipiente vacío con la tapa (g)	Peso del recipiente con la tapa y las semillas, antes del secado (g)	Peso del recipiente con la tapa y las semillas, después del secado (g)	Contenido de humedad % (peso fresco)	
		P1	P2	P3	(P2-P3)/ (P2-P1) × 100	Promedio (R I + R II)/2
	R I					
	R II					
	R I					
	R II					
	R I					
	R II					
	R I					
	R II					

Ejemplo:

No. de accesión	No. de repetición / recipiente	Peso del recipiente vacío con la tapa (g) (P1)	Peso del recipiente con la tapa y las semillas, antes del secado (g) (P2)	Peso del recipiente con la tapa y las semillas, después del secado (g) (P3)
	R 1	10.3245	14.8668	14.4356
	R 2	10.1442	14.9948	14.5365

Cálculo:

Repetición 1:

$$\% \text{ de contenido de humedad} = \frac{14.8668 - 14.4356}{14.8668 - 10.3245} \times 100 = 9.47$$

Repetición 2:

$$\% \text{ de contenido de humedad} = \frac{14.9948 - 14.5365}{14.9948 - 10.1442} \times 100 = 9.45$$

$$\text{Contenido de humedad (con base en el peso fresco)} = \frac{9.47 + 9.45}{2} = 9.46\%$$

Si las muestras se sometieron a secado previo, utilice la siguiente fórmula para determinar el contenido de humedad final.

$$\text{Contenido de humedad final (\%)} = \frac{(M1 + M2) - (M1 \times M2)}{100} \text{ en donde}$$

M1 = porcentaje de contenido de humedad a partir del secado de la primera fase (secado previo)

M2 = porcentaje de contenido de humedad a partir del secado de la segunda fase (secado en horno)



Quando se está determinando la humedad, se debe reducir al mínimo la exposición de la muestra al ambiente del laboratorio.

Método de temperatura baja constante para semillas oleaginosas

Para las semillas oleaginosas, emplee una temperatura más baja durante un período más prolongado de modo que sólo se elimine agua de las semillas. Siga el procedimiento descrito anteriormente, excepto los pasos 4 y 5, que se deben modificar así:

1. Coloque el recipiente sin la tapa en un horno mantenido a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Seque las semillas durante 17 ± 1 horas.

El uso de una temperatura más alta y de un período de secado más prolongado del que normalmente se recomienda ocasionará la pérdida de los componentes volátiles y del agua, particularmente en las semillas ricas en aceite, y dará como resultado una sobreestimación del contenido de humedad.

Balanzas de humedad

Las balanzas de humedad combinan tecnología de calentamiento de última generación con sistemas de peso muy precisos dando como resultado un método rápido y exacto para determinar la humedad. Utilizando el principio de pérdida de peso por secado –el estándar para la determinación de la humedad– la balanza automáticamente pesa una muestra, la seca, mide la pérdida de peso debida al secado y calcula el contenido de humedad de las semillas. El análisis terminará automáticamente cuando termine el ciclo de secado y se haya estabilizado el peso seco, o después de cierta cantidad de tiempo especificada por el operario. El resultado final aparece en una pantalla digital.

La principal desventaja de los métodos de secado en horno y de utilización de balanzas de humedad, en particular cuando se trabaja con accesiones para las que se tiene una cantidad limitada de semillas, es que las semillas mueren bajo las temperaturas empleadas para el secado. Además, estos métodos son dispendiosos. Varios bancos de germoplasma utilizan métodos rápidos, no destructivos para sortear estos problemas, aunque algunos de ellos son menos precisos que el secado en horno.

Métodos no destructivos para determinar la humedad

Medidores rápidos de humedad

El contenido de humedad de las semillas también se puede determinar utilizando medidores rápidos, que vienen en una diversidad de presentaciones. Estos equipos miden las propiedades eléctricas de la humedad en las semillas por conductividad⁵ o por capacitancia⁶. Cabe anotar que estos medidores requieren calibración utilizando el método estándar de secado en horno para cada cultivo con el que se esté trabajando, y que son más precisos para contenidos de humedad en un rango específico (6-25%), dependiendo del tipo de medidor de humedad utilizado. Son menos confiables por encima y por debajo de este rango. Se recomienda usar los medidores de humedad únicamente para obtener un cálculo aproximado del contenido de humedad antes del secado.

Calibración de los medidores rápidos de humedad

La relación exacta de una lectura de un medidor de humedad con la humedad real de la semilla, como lo determina el método del horno de la ISTA, se llama calibración. La calibración se debe basar en muchas

⁵ La conductividad es una medida de la resistencia eléctrica del material en las semillas.

⁶ La capacitancia es una medida de la capacidad de las semillas para almacenar carga eléctrica.

muestras de diferentes variedades, áreas y años, y debe incluir el rango de contenidos de humedad que se encuentra normalmente en las especies (6-25%). Las curvas de calibración se establecen trazando gráficos de las lecturas a partir del medidor de humedad contra las lecturas obtenidas mediante el método de secado en horno. Una vez que se establece una curva de calibración, cualquier lectura se puede convertir fácilmente al contenido real de humedad.

Para determinar el contenido de humedad utilizando un medidor de humedad calibrado, proceda de la siguiente manera:

1. Tome dos muestras seleccionadas al azar del lote de semillas que tengan el peso y el volumen requeridos para el medidor en cuestión.
2. Coloque la muestra en la cámara de semillas y registre la lectura.
3. El contenido de humedad (como porcentaje por peso) es igual al promedio de las lecturas de las dos muestras evaluadas.

Sensores de humedad digitales

Hoy en día, varios bancos de germoplasma emplean sensores de humedad digitales para calcular el contenido de humedad. Estos métodos se basan en el hecho de que las semillas ganan o pierden humedad rápidamente dependiendo de su entorno. Las semillas húmedas pierden humedad en condiciones de aire seco mientras que la ganan en un entorno de aire húmedo. Después de un período de tiempo suficiente, no existe mayor movimiento de humedad entre las semillas y el aire; en este momento, se dice que las semillas se encuentran en equilibrio.

Los sensores de humedad digitales miden la cantidad de vapor de agua en el aire en equilibrio con una muestra de semillas colocada en una cámara sellada. La lectura generalmente se expresa como humedad relativa en equilibrio (HRe), y se puede relacionar con el contenido de humedad convencional usando una curva de calibración que se ha hecho utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

Lectura complementaria

Ellis, R.H., Hong, T.D. y Roberts, E.H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volumen 1. Principles and methodology. IBPGR, Roma, Italia. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=433.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edición 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. Sitio de la ISTA: <http://www.seedtest.org>.

Probert, R.J., Manger, K.R. y Adams, J. 2003. Non-destructive measurement of seed moisture. Pp. 367-387 in Seed conservation: turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.

4.2 Secado de las semillas

¿Qué es el secado de las semillas?

Es la reducción del contenido de humedad de las semillas a los niveles recomendados para el almacenamiento, utilizando técnicas que no deterioran la viabilidad de las semillas (ver Diagrama de Flujo 4.2).

¿Por qué se secan las semillas?

Las semillas recién cosechadas pueden tener contenidos de humedad altos, lo cual contribuye a que respiren, a que los embriones crezcan y a que los insectos y hongos se desarrollen. Por ello, las semillas se deben secar para obtener un contenido de humedad seguro que evite el deterioro, el calentamiento y la infestación durante el almacenamiento.

¿Cuándo se secan las semillas?

El secado de una muestra de semillas debe empezar lo más pronto posible después de que llegan al banco de germoplasma, para evitar que se deterioren. Inmediatamente lleguen, hay que verificar que no queden en cobertizos, depósitos o pasillos, sino en un ambiente fresco y bien ventilado (con una humedad relativa baja). Si se las deja en un cuarto con humedad relativa alta, se requerirá un equipo deshumidificador para eliminar la humedad.

¿Hasta qué nivel de contenido de humedad se deben secar las semillas?

El contenido de humedad óptimo para el almacenamiento depende de la especie y del período durante el cual las semillas se van a almacenar. Es importante adoptar un régimen de secado adecuado, en el cual se regulen la humedad relativa y la temperatura del aire de secado para lograr el contenido de humedad objetivo.

- El contenido de humedad de las semillas que se van a almacenar en colecciones base (ver glosario) debe estar entre 3 y 7%, dependiendo de la especie⁷.
- El contenido de humedad de las semillas que se van a almacenar en colecciones activas (ver glosario) debe estar entre 3 y 8% si las semillas no tienen buenas características

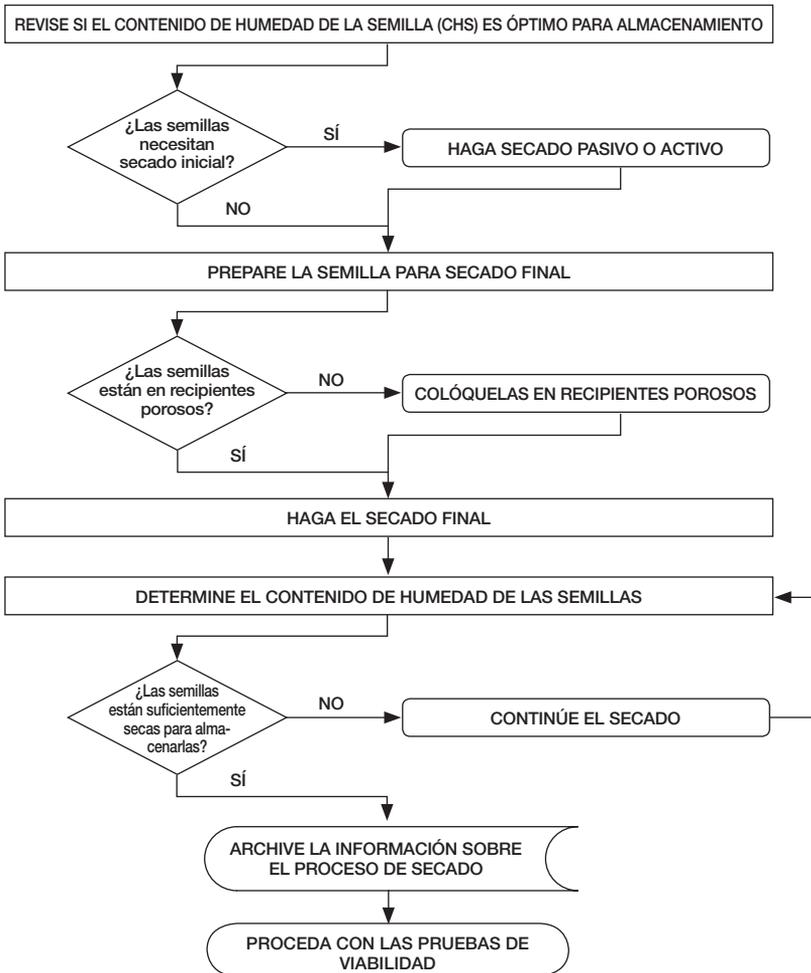
⁷ Para las colecciones base, se recomiendan contenidos de humedad en equilibrio de 10-15% de humedad relativa para el secado (ver *secado por deshumidificación* en esta sección). El contenido de humedad en equilibrio de la semilla depende del contenido de lípidos. Semillas con alto contenido de aceites tendrán un contenido de humedad más bajo que aquellas ricas en almidón, al mismo nivel de humedad relativa, pues el volumen de aceite en la semilla excluye el agua (ver Cuadro 4.4). Si se conoce el contenido de aceite de la semilla (D_o), Cromarty *et al.* (1992) proporcionan una ecuación para calcular el contenido de humedad en equilibrio de las semillas (M_e , base de peso seco) a una determinada humedad relativa (R como un decimal) y a una determinada temperatura (T en $^{\circ}\text{C}$).

$$M_e = (1-D_o) \times \sqrt[3]{-440 \times \ln(1-R)}$$

$$1.1 + (T/90)$$

de almacenamiento (como las oleaginosas) y entre 7 y 11% si tienen buenas características de almacenamiento (como los cereales), dependiendo de la temperatura utilizada para el almacenamiento (para información adicional, ver Cuadro 6.2 en el Capítulo 6).

Diagrama de Flujo 4.2. Secado de las semillas



Contenido de humedad crítico

El contenido de humedad crítico es el nivel por debajo del cual la reducción adicional en el contenido de humedad ya no aumentaría la longevidad de las semillas en almacenamiento hermético. Ellis, Hong y Roberts, quienes trabajan desde 1988 con más de 25 especies cultivadas, encontraron que el almacenamiento hermético a un nivel de contenido de humedad crítico proporciona máxima longevidad de las semillas a una determinada temperatura de almacenamiento. Los valores de contenido de humedad críticos varían según la especie, desde alrededor de 6% para el guisante (*Pisum sativum*) y el frijol mungo (*Vigna radiata*), que son ricos en proteína, hasta 4.5-5.0 para cereales como el arroz, el trigo y la cebada, que son ricos en almidón. Para las especies de semilla oleaginosa, los valores del contenido de humedad crítico son más bajos: 3.3% para la soya (*Glycine max*); 2.7% para el lino (*Linum usitatissimum*); 2.4% para el negrillo (*Guizotia abyssinica*); y 2% para el maní forrajero (*Arachis hypogaea*) y el girasol (*Helianthus annuus*). Estos valores se determinan almacenando las semillas a 65°C, después de equilibrarlas con 10-11% de humedad relativa (HR) a 20°C. Se ha reportado, sin embargo, que la temperatura afecta el contenido de humedad crítico y se debe tener precaución al extrapolar datos de estudios de envejecimiento acelerado en condiciones reales de almacenamiento de las semillas, porque las condiciones termodinámicas de los dos ambientes pueden ser bien diferentes (ver Vertucci y Roos, 1993). Para información más específica sobre el contenido de humedad crítico para diferentes especies, ver Ellis (1998), Ellis *et al.* (1989, 1990 y 1996) y Walters (1998 y 2003). El secado rápido de las semillas o la sobre-exposición al secado, pueden causar deterioro físico y ruptura de la testa de las semillas de algunas especies como la soya, el maní forrajero, el garbanzo y la especie *Sterculia foetida*. Para evitar este tipo de daño, las semillas de especies sensibles se deben secar con cuidado en una secuencia paso a paso, iniciando con un secado lento a una humedad relativa levemente más alta, y continuando con una segunda fase de secado.

Principios del secado de las semillas

Las semillas son higroscópicas y absorben o liberan humedad dependiendo de la humedad relativa del aire circundante y del gradiente de potencial de agua entre la semilla y el aire circundante. Si la presión de vapor de agua de la semilla es mayor que la del aire circundante, la semilla perderá humedad y se tornará más seca (desorción). Si la presión de vapor de agua de una semilla es menor que la del aire circundante, la semilla ganará humedad por absorción. La absorción o la desorción ocurren hasta que la presión de vapor de agua en la semilla y la del aire circundante se equilibren.

Contenido de humedad en equilibrio e isotermas de humedad

El contenido de agua de las semillas en equilibrio con la humedad relativa del aire circundante se conoce como contenido de humedad en equilibrio. Entender la relación entre el contenido de humedad de las semillas en equilibrio y la humedad relativa es importante para determinar el régimen de secado adecuado para las semillas.

Para una determinada especie, existe una relación definible entre la humedad relativa y el contenido de humedad de las semillas (ver Cuadro 4.4).

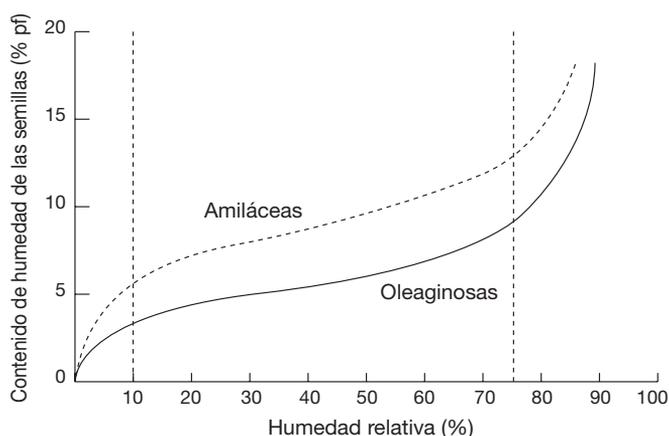
Cuadro 4.4. Contenidos de humedad en equilibrio (aproximados) de algunas semillas de cultivos comunes, a 25°C.

Especie	HR (%)							
	10	15	20	30	45	60	75	90
Arroz	4.6	5.6	6.5	7.9	9.8	11.8	14.0	17.6
Avena	-	5.7	-	8.0	9.6	11.8	13.8	18.5
Berenjena	3.1	-	4.9	6.3	8.0	9.8	11.9	-
Cebada	-	6.0	-	8.4	10.0	12.1	14.4	19.5
Cebolla	4.6	-	6.8	8.0	9.5	11.2	13.4	-
Frijol lima	4.6	-	6.6	7.7	9.2	11.0	13.8	-
Guisante	5.4	-	7.3	8.6	10.1	11.9	15.0	-
Lechuga	2.8	-	4.2	5.1	5.9	7.1	9.6	-
Lino	3.3	-	4.9	5.6	6.3	7.9	10.0	15.2
Maíz	3.8	-	5.8	8.4	10.2	12.7	14.4	18.8
Maní forrajero	3.0	-	3.9	4.2	5.6	-	9.8	13.0
Mostaza	1.8	-	3.2	4.6	6.3	7.8	9.4	-
Nabo	2.6	-	4.0	5.1	6.3	7.4	9.0	-
Ocra	3.8	-	7.2	8.3	10.0	11.2	13.1	-
Pepino	2.6	-	4.3	5.6	7.1	8.4	10.1	-
Rábano	2.6	-	3.8	5.1	6.8	8.3	10.2	-
Ray	-	7.0	-	8.7	10.5	12.2	14.8	20.6
Remolacha	2.1	-	4.0	5.8	7.6	9.4	11.2	-
Repollo	2.9	-	4.6	5.4	6.4	7.6	9.6	-
Sandía	3.0	-	4.8	6.1	7.6	8.8	9.0	-
Sorgo	-	6.4	-	8.6	10.5	12.0	15.2	18.8
Soya	4.1	-	5.5	6.5	7.4	9.3	13.1	18.8
Tomate	3.2	-	5.0	6.3	7.8	9.2	11.1	-
Trigo	5.5	-	7.0	8.5	10.4	12.1	14.6	19.8
Trigo sarraceno	-	6.7	-	9.1	10.8	12.7	15.0	19.1
Zanahoria	4.5	-	5.9	6.8	7.9	9.2	11.6	-
Zapallo	3.0	-	4.3	5.6	7.4	9.0	10.8	-

Compilado de: Roberts, E.H. (ed.). 1972. Seed Viability. Chapman and Hall, Londres; Harrington, J. F. 1972. Seed Biology, Vol III. Academic press, Nueva York: 145-245; y Justice O.L. y Bass L.N. 1978. Principles and practices of seed storage, Agriculture Handbook No. 506. USDA, Washington D.C, Estados Unidos.

Las semillas perderán o absorberán agua hasta que su contenido de humedad esté en equilibrio con la HR del aire circundante, a esa temperatura. La relación entre el contenido de humedad de las

semillas y la humedad relativa se expresa mediante una isoterma de sorción –que es sencillamente una gráfica del contenido de humedad de las semillas en relación con el porcentaje de humedad relativa (ver Figura 4.1). Las isotermas de humedad dependen de la composición química de las semillas y difieren entre especies, entre accesiones de las mismas especies e incluso entre semillas de una misma accesión cosechadas en diferentes fases de desarrollo. Las isotermas de humedad son muy útiles para calcular el contenido de humedad al cual se pueden secar las semillas en un determinado ambiente.



Fuente: Bradford, K.J. 2004. Seed storage and longevity. pp 76–84. In: Seed production and quality. UC Davis, Seed Biotechnology Center, USA.

Figura 4.1. Isotermas de humedad

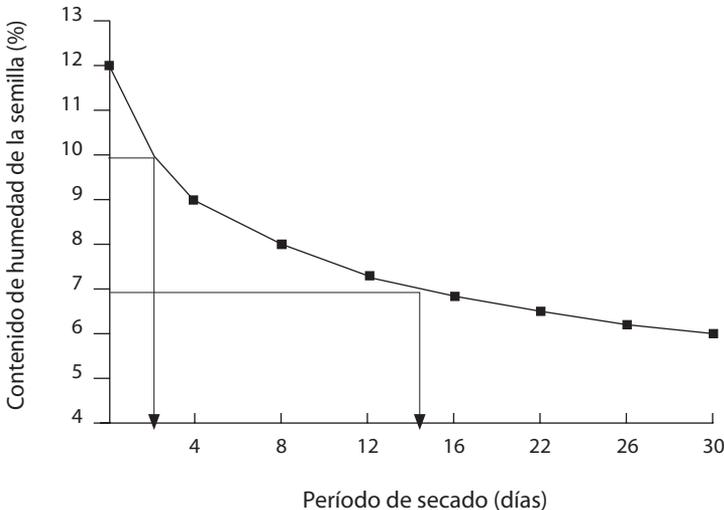
Cómo preparar isotermas de humedad

Las isotermas de humedad se pueden construir fácilmente dejando que las semillas alcancen equilibrio en ambientes con una HR conocida, mantenida mediante soluciones de sales saturadas, a una determinada temperatura. Las siguientes soluciones de sales saturadas proporcionan una serie de porcentajes de HR, a una temperatura de 25°C:

Sal	HR Correspondiente (%)
Hidróxido de sodio	7.5
Cloruro de litio	13
Cloruro de magnesio	32
Nitrato de magnesio	54
Nitrato de amonio	65
Cloruro de sodio	75
Cloruro de potasio	85

Las soluciones de sales saturadas se preparan mezclando sal y agua para formar una suspensión húmeda.

1. Coloque la suspensión en el fondo de un desecador.
2. Coloque una muestra de semillas de peso conocido en un recipiente de malla de alambre o en bolsas hechas de malla de toldillo y ubíquela sobre la placa del desecador. La solución salina no debe entrar en contacto con las semillas.
3. Tape el desecador y selle la tapa.
4. Deje que transcurra tiempo suficiente para que la humedad de las semillas se iguale al nivel del aire circundante en el interior del desecador –esto puede tomar varias semanas. Las semillas absorberán o perderán humedad dependiendo del gradiente de presión de agua entre las semillas y el aire circundante. Cuando el peso de las semillas se mantiene sin modificarse, se ha logrado el contenido de humedad en equilibrio.
5. Calcule el contenido de humedad en equilibrio de las semillas en cada nivel de HR mediante el método de secado en horno descrito en la sección anterior. Haga una gráfica poniendo el contenido de humedad en equilibrio de las semillas en el eje **Y** y la HR de las respectivas soluciones salinas en el eje **X**, como se muestra en la Figura 4.2.



Ejemplo: En un banco de germoplasma se reciben semillas con un contenido de humedad inicial de aproximadamente 10%, y se deben secar a un contenido de humedad de 7% para almacenarlas. En la gráfica que ilustra este texto, las líneas que van de la curva hasta el eje del tiempo (eje X) indican 2 y 15 días, aproximadamente. La diferencia entre los dos valores ($15 - 2 = 13$ días) es el tiempo que se requiere para secar las semillas y llevarlas de un contenido de humedad de 10% a uno de 7%.

Figura 4.2. Predicción del tiempo de secado

Determinación de la sensibilidad a la desecación

Someter las semillas a pruebas de tolerancia a la desecación es un prerrequisito para seleccionar el régimen de secado apropiado si no se conoce aún cómo se comportan frente a la desecación. Las semillas recalcitrantes no pueden sobrevivir la desecación por debajo de contenidos de humedad relativamente altos. La sensibilidad a la desecación se puede valorar midiendo el porcentaje de germinación a diferentes intervalos de secado (ver Diagrama de Flujo 4.3).

- Las semillas que toleran la desecación (sin mostrar pérdida de viabilidad) a un contenido de humedad de 5% o menos (valores con una HR en equilibrio de 10-15% a 20°C) probablemente se comporten en almacenamiento como semillas ortodoxas.
- Las semillas que toleran la desecación hasta un contenido de humedad de alrededor de 10-12% (valores con HR en equilibrio de 40-50% a 20°C), pero cuya viabilidad se reduce cuando se someten a un proceso adicional de secado para reducir su contenido de humedad, probablemente se comporten en almacenamiento como semillas intermedias.
- Las semillas que mueren por la desecación a un contenido de humedad de 15-20% (valores con una HR en equilibrio >70% a 20°C), probablemente sean recalcitrantes.

Información sobre el comportamiento en almacenamiento de una amplia gama de especies se encuentra disponible en la dirección www.rbgekew.org.uk/data/sid. Gran parte de la información de esta página proviene del Compendium on Seed Storage Behaviour de Hong et al. (1996) disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=244.

Procedimientos para secar las semillas

Paso 1: Determine el contenido de humedad y el período de secado

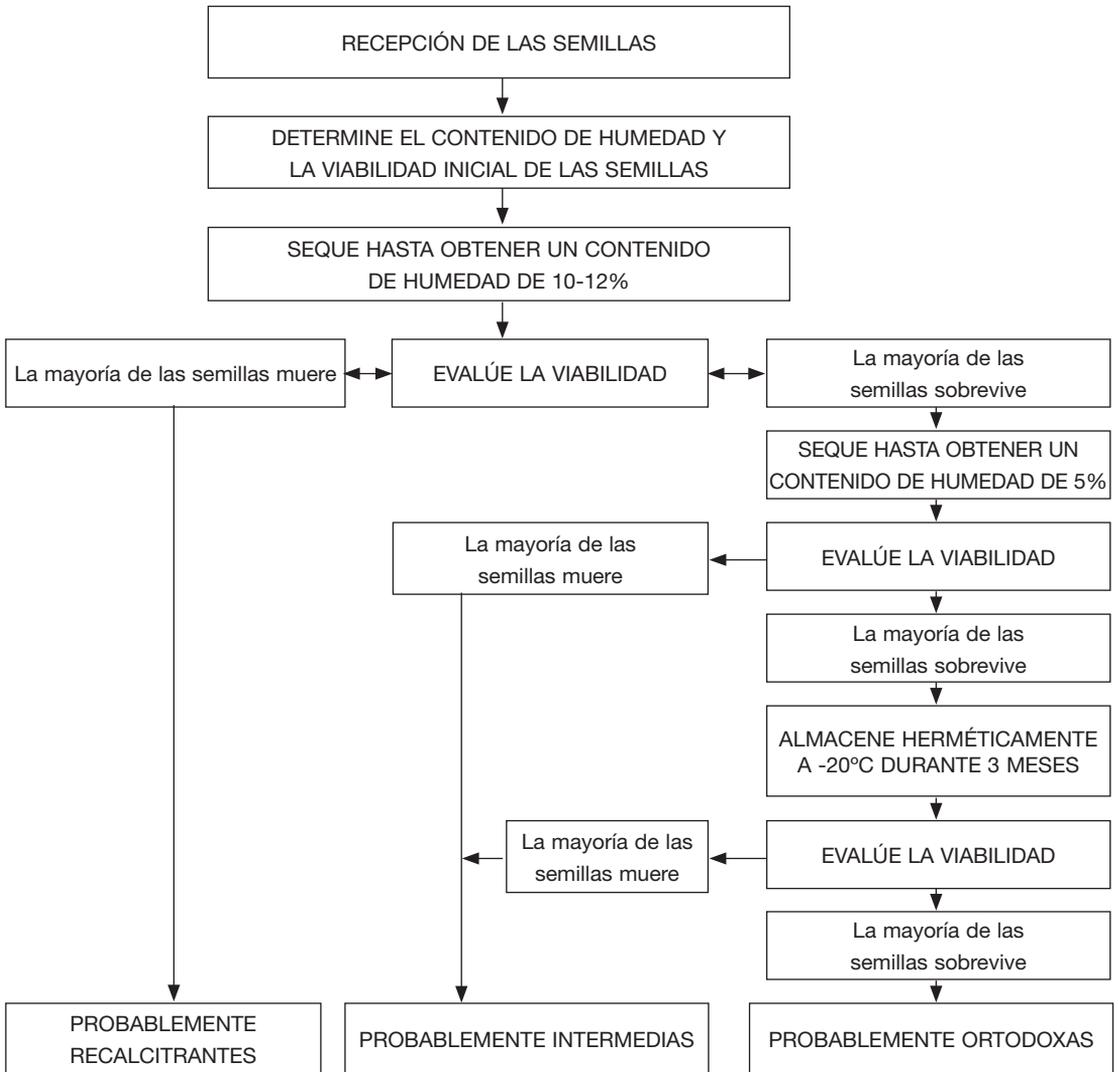
Evalúe la necesidad de secado calculando el contenido de humedad de las semillas recibidas en el banco de germoplasma. El contenido de humedad se puede determinar rápidamente con un medidor de humedad calibrado, como se describe en la sección 4.1.

- Si la humedad está por encima de los límites recomendados para un almacenamiento seguro (3-7% para conservación a largo plazo dependiendo de la especie), hay que secar.

Predicción del tiempo de secado

La duración del período de secado se puede predecir empleando cualquiera de los métodos que se describen a continuación. Si el banco de germoplasma no tiene experiencia previa con el secado de semillas de alguna especie en particular, puede tener que experimentar con el fin de predecir el período de secado adecuado.

Diagrama de Flujo 4.3. Protocolo para determinar el comportamiento de las semillas en almacenamiento



Fuente: Hong y Ellis (1996).

Predicción del tiempo de secado mediante la pérdida de peso

1. Determine el contenido de humedad de la muestra de semilla empleando los métodos descritos en la sección 4.1.
2. Pese la muestra de semilla que requiere secado.
3. Calcule el peso de las semillas al nivel de humedad requerido utilizando la ecuación:

$$\text{Peso final de las semillas} = \frac{\text{Peso inicial de las semillas} \times (100 - \text{Contenido de humedad inicial})}{(100 - \text{Contenido de humedad objetivo})}$$

Ejemplo:

Peso inicial de las semillas = 250 g
Contenido de humedad inicial = 12%
Contenido de humedad objetivo al final del secado = 8%
Peso final de las semillas
a un contenido de humedad de 8% = $250 \times \frac{(100 - 12)}{(100 - 8)} = 239 \text{ g}$

4. Conserve la muestra en una bolsa de muselina o de malla de toldillo y déjela secar, pesándola periódicamente hasta lograr el peso requerido.

Predicción del período de secado a partir de curvas de secado promedio

En general, las semillas se secan a un ritmo exponencial hasta que se alcanza el contenido de humedad en equilibrio. La tasa de secado de diferentes lotes de semilla de la misma especie será más o menos igual en las mismas condiciones ambientales. Por esto, las curvas de secado se pueden utilizar para pronosticar el período de secado de todos los lotes de semilla de una especie en particular, secados a determinadas condiciones. Esto evita tener que monitorear frecuentemente el contenido de humedad de las semillas durante el secado y limita el desperdicio de semillas.

Cómo elaborar curvas de secado promedio

1. Colecte 250-500 g de semillas de cada 3-5 accesiones de una especie (que difieran en características como tamaño de semilla, masa, forma, composición química). Utilice lotes que tengan abundante semilla o aquellos desechados por su baja viabilidad.
2. Determine el contenido de humedad para cada lote de semilla utilizando el método de secado en horno descrito anteriormente.
3. Seque las semillas empleando el mismo método y las mismas condiciones que utilizaría en la práctica.

4. Mezcle las semillas en un recipiente y cada día retire una muestra pequeña para determinarle el contenido de humedad.
5. Repita el procedimiento cada día hasta que no registre cambios en el contenido de humedad.
6. Trace un gráfico de los datos colocando el contenido de humedad, en porcentaje, en el eje **Y** y el tiempo de secado en el eje **X**.
7. Los cambios en el contenido de humedad durante el proceso se pueden describir trazando una curva exponencial (curva de secado promedio) del conjunto de datos.

La curva de secado promedio se puede utilizar como guía puesto que otros lotes de semilla de la misma especie deben secar a una tasa similar. Esto se puede repetir con semillas de todas las especies y se pueden trazar gráficos de sus curvas de secado para diferentes condiciones de secado.

Uso de las curvas de secado promedio para determinar el tiempo de secado

1. Utilice el gráfico preparado para las semillas de una especie en particular sometida a secado.
2. Determine el contenido de humedad inicial de la muestra mediante el método de secado en horno.
3. Seleccione el contenido de humedad final requerido para almacenar esta especie.
4. Trace una línea horizontal desde el contenido de humedad inicial y del contenido de humedad deseado sobre el eje **Y**, transversal a la curva de secado.
5. Anote el día sobre el eje **X**, correspondiente a los puntos de intersección con la curva de secado, para cada uno de los contenidos de humedad.

La diferencia entre los dos puntos sobre el eje **X** indica el tiempo de secado necesario para lograr el contenido de humedad deseado (ver Figura 4.2).

Paso 2: Aliste las semillas para el secado

1. Es preferible colocar las semillas en bolsas⁸ porosas marcadas para cada accesión. Cuando utilice bolsas, siempre debe tener dos rótulos o etiquetas que acompañen el lote de semillas –uno pegado en la parte de afuera de las bolsas y el otro colocado dentro, con las semillas. Los rótulos o etiquetas deben ser durables y se deben escribir con marcador permanente.

⁸ Las bolsas que se utilizan para el proceso de secado deben ser suficientemente porosas para permitir que la humedad salga fácilmente. Las más apropiadas, dependiendo del tamaño de la semilla, son las de muselina o las de malla de toldillo.

2. No ponga una gran cantidad de semilla dentro de una sola bolsa. Divida las accesiones en varias bolsas rotuladas, en capas delgadas para que se sequen rápido.
3. Cierre bien las bolsas para que las semillas no se derramen o mezclen.

Paso 3: Seque las semillas

Existen varios métodos para secar las semillas. Los métodos más comunes y seguros son el *secado mediante la deshumidificación* y el *secado con gel de sílice*. También se pueden utilizar otros métodos como el *secado mediante la aplicación de soluciones salinas saturadas*.

Todos estos métodos consisten en dejar las semillas en un ambiente con una HR baja y dejar que el contenido de humedad de las semillas alcance el equilibrio a una temperatura relativamente baja (10-25°C). Tenga en cuenta que las semillas alcanzarán el equilibrio a diferentes tasas, dependiendo de la especie, el tamaño de la semilla y las condiciones del secado. Al principio, la mayoría de las semillas se secará rápidamente y la tasa de secado irá siendo más lenta a medida que se vaya acercando a un contenido de humedad bajo.

Si el contenido de humedad inicial de las semillas es demasiado alto (>15%), se recomienda secar las semillas en dos fases:

1. secado inicial para reducir el contenido de humedad a niveles seguros para evitar una desecación rápida y daño a las semillas sensibles (como daño por agrietamiento en la soya) (ver Recuadro 4.1 para las opciones de secado inicial); y
2. secado final hasta llegar al contenido de humedad recomendado para conservación en bancos de germoplasma.

Recuadro 4.1. Alternativas para el secado inicial

- Si el clima es apropiado, seque al aire libre, a la sombra, en estantes de malla abiertos –se requieren medidas adicionales de control contra pájaros, insectos y rocío
 - Secado pasivo en un cuarto con buena ventilación y circulación de aire –no factible en el clima caliente y húmedo del trópico
 - Secado activo mediante ventilación forzada
-

Secado mediante la deshumidificación

Este método implica secar las semillas en un ambiente en donde la HR se mantiene baja por el uso de deshumidificadores. Las Normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGRI (1994)



Evite secar a temperaturas altas ya que éstas reducen la vida de la semilla en almacenamiento.

recomiendan secar las semillas a un rango de HR de 10-15% y a una temperatura de 10 a 25°C. Para bancos de germoplasma más pequeños, existen cabinas para el secado de las semillas, diseñadas para proporcionar estas condiciones. Los bancos de germoplasma más grandes pueden requerir cuartos modulares para el secado de las semillas, con acceso para desplazarse dentro de ellos. La cabina o cuarto de secado debe tener un dispositivo de seguridad que regule la temperatura y evite el sobrecalentamiento en caso de falla mecánica.

1. Coloque las semillas, previamente empacadas en bolsas de tela, en los estantes de un cuarto o cabina de secado. Asegúrese de que las bolsas con las semillas no queden demasiado juntas y que haya suficiente espacio para que el aire circule libremente entre ellas.
2. Deje las semillas en el cuarto o cabina de secado hasta que el contenido de humedad llegue al rango requerido para el almacenamiento. Si se conocen el contenido de humedad inicial y el peso de la muestra, la duración del período de secado se podrá predecir utilizando curvas de secado promedio o midiendo la pérdida de peso como se describió anteriormente (ver Paso 1).
3. Otra opción consiste en retirar una submuestra y determinar si se ha alcanzado o no el contenido de humedad requerido, empleando los métodos descritos en la sección 4.1.

Secado mediante el gel de sílice

El gel de sílice sirve para secar muestras pequeñas. A continuación se describe el procedimiento para secar semillas con gel de sílice:

1. Coloque gel de sílice autoindicador, azul y seco⁹ en un desecador o frasco de vidrio con sello hermético. El peso del gel de sílice utilizado debe ser igual al de las semillas para lograr un secado eficiente. Para un secado más rápido, algunos bancos de germoplasma utilizan una relación más alta de gel a semilla, como de 3:1.
2. Coloque las semillas en bolsas porosas y consérvelas muy cerca del gel de sílice.
3. Mantenga el desecador a temperatura fresca (aproximadamente 20°C).
4. Cambie el gel de sílice a diario o cuando el color cambie de azul

⁹ Los usuarios del tradicional gel de sílice azul autoindicador son muy cuidadosos por los posibles efectos carcinogénicos del cloruro de cobalto que se utiliza como indicador. El gel se debe manipular en un aparador con extractor de vapores cuando exista riesgo de que se genere polvo. La mayoría de proveedores de químicos ofrecen otras alternativas de gel de sílice azul, como el gel de sílice autoindicador granular de naranja a incoloro, o el gel de sílice esférico (2-5 mm), que producen menos polvo y que se deben utilizar siempre que sea posible.

intenso a rosado o azul pálido.

5. Regenere el gel de sílice calentándolo a 100°C hasta que adquiera de nuevo el color azul intenso. Deje que se enfríe en un recipiente hermético antes de reutilizarlo.
6. Deje las semillas en el recipiente con gel de sílice fresco hasta que el contenido de humedad esté en el rango requerido para el almacenamiento.
7. Empaque las semillas en recipientes adecuados cuando las semillas hayan alcanzado el contenido de humedad recomendado o el peso en equilibrio, y cuando su nivel de germinación y sanidad sea aceptable.

Secado mediante el cloruro de calcio

Las semillas también se pueden secar utilizando gránulos de cloruro de calcio anhidro. El cloruro de calcio es seguro, no es tóxico y es económico. Se encuentra disponible en ferreterías y se desecha fácilmente por un desagüe. El método de secado es muy similar al del gel de sílice, excepto que el químico se desecha después del secado o se puede reutilizar para preparar soluciones de sales saturadas.

1. Coloque los gránulos de cloruro de calcio anhidro en el fondo de un desecador o frasco de vidrio hermético, bajo una capa de malla de alambre. Cierre el recipiente rápidamente para evitar que absorba humedad del aire.
2. Coloque las semillas en bolsas porosas sobre la placa del desecador o en una malla de alambre.
3. Mantenga el desecador a una temperatura fresca (aproximadamente 20°C).
4. Cuando la capa superior de cloruro de calcio se endurezca y esté brillante, gírela de manera que la parte inferior quede arriba. Una vez esté completamente dura, se puede reutilizar para preparar una solución salina saturada como se describe más adelante.
5. Deje las semillas en el recipiente con el cloruro de calcio fresco hasta que el contenido de humedad de las semillas se encuentre en el rango requerido para el almacenamiento.
6. Empaque las semillas en recipientes adecuados una vez obtenga el contenido de humedad recomendado o el peso en equilibrio, y si la germinación y sanidad de las semillas son aceptables

Soluciones salinas saturadas

Las semillas se pueden acondicionar para el almacenamiento secándolas en recipientes sellados, sobre soluciones saturadas de sales minerales como cloruro de calcio y cloruro de litio. El cloruro de calcio mantiene una HR de 30% a 25°C y se puede utilizar para

secar semillas para conservación a mediano plazo. De manera similar, el cloruro de litio proporciona 13% de HR y el bromuro de calcio 18% de HR a 20°C, y se pueden utilizar para secar semillas para conservación a largo plazo. También se pueden utilizar mezclas de cloruro de calcio y cloruro de litio para alcanzar contenidos de humedad más bajos a un menor costo, en comparación con el uso de cloruro de litio únicamente. Para obtener la proporción específica de los químicos que se utilizan, se deben determinar la HR exacta y el contenido de humedad objetivo.

Para preparar la solución salina:

1. Mezcle sal y agua para formar una suspensión húmeda.
2. Coloque la suspensión en un desecador o en un recipiente abierto y coloque el recipiente en otro más grande de cierre hermético que utilizará para secar las semillas.
3. Disperse las semillas en una capa delgada dentro de su recipiente y colóquelo en el desecador o en el recipiente más grande. La solución salina no debe hacer contacto con las semillas. Selle la tapa del recipiente más grande que contiene las semillas y la solución.
4. Deje que transcurra tiempo suficiente para que la humedad de las semillas se equilibre con el aire dentro del recipiente –esto podría tomar varias semanas. La circulación de aire dentro del recipiente agilizará el proceso de secado.

Otros métodos de bajo costo

Refrigerador de descongelación automática

Si no se dispone de sales minerales, las semillas se pueden secar utilizando un refrigerador de descongelación automática. La acción de la unidad de autodescongelación mantendrá una HR baja dentro del refrigerador. Aunque es difícil controlar la HR con exactitud, este método produce resultados satisfactorios si no se dispone de otros mejores. La HR en muchos refrigeradores oscila entre 10 y 40%, que corresponde al rango apropiado de contenido de humedad para conservar semillas a mediano o largo plazo.

1. En un recipiente abierto, disperse las semillas en una capa delgada.
2. Coloque el recipiente en un refrigerador de descongelación automática y deje que las semillas se equilibren con la humedad dentro del refrigerador.
3. Selle el recipiente de secado, retírelo del refrigerador y deje que alcance temperatura ambiente antes de abrirlo para evitar que la humedad se condense en las semillas.
4. Selle las semillas en recipientes de cierre hermético y trasládelas al cuarto de almacenamiento.

Secado a la sombra

El secado a la sombra puede ser una forma efectiva de reducir el contenido de humedad de las semillas en ambientes en donde la HR es baja (menos del 40%); entre más baja sea la humedad, más efectivo será el proceso de secado. El secado a la sombra es particularmente útil para el proceso de secado inicial. No seque al sol ya que se cree que afecta la viabilidad a largo plazo de las semillas de algunas especies.

1. Extienda las semillas en una sola capa sobre una sábana de lino o en estantes de malla abiertos, dispuestos en la sombra, asegurándose de que el aire circule libremente. Cualquier dispositivo que ayude a elevar el flujo del aire sobre las semillas (como un ventilador) mejorará la eficiencia del secado.
2. Cubra las semillas con una red protectora para evitar la depredación de animales (pájaros, ratas, etc.).
3. En la noche, envuelva la sábana y manténgala en un cuarto fresco.
4. Deje que transcurra el tiempo suficiente para que la humedad de las semillas alcance equilibrio con la HR del ambiente –esto podría tomar varios días.

En los países tropicales con una HR alta, es más difícil y costoso mantener un cuarto de secado a una HR muy baja. Para reducir de manera efectiva el contenido de humedad de las semillas a niveles aceptados, se puede emplear una combinación de métodos incluyendo tecnologías de bajo costo como el secado con gel de sílice y sales saturadas.

Documentación

Los siguientes descriptores se pueden utilizar para documentar los procesos mediante los cuales se determinó el contenido de humedad y se secaron las semillas de cada accesión:

- Contenido de humedad de las semillas al momento de recibirlas (%)
- Método utilizado para determinar la humedad
- Método de secado previo, duración (donde corresponda)
- Método de secado final
- Duración del secado final
- Contenido de humedad final, después del secado (%)
- Fecha de determinación del contenido de humedad final
- Peso de 100 ó 1000 semillas (g)
- Peso seco total de las semillas (g)

Lectura complementaria

Cromarty, A. 1984. Techniques for Seed-drying. Pp. 88-125 in Seed management techniques for genebanks. (J.B. Dickie, S. Linington y J.T. Williams, eds.). Memorias de un taller realizado en Royal Botanic Gardens, Kew, julio 6 al 9, 1982. IBPGR, Roma, Italia.

- Cromarty, A. S., Ellis, R.H. y Roberts, E.H. 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation. IBPGR, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=281.
- Ellis, R.H. 1998. Longevity of seeds stored hermetically at low moisture contents. *Seed Science Research* 8 (Suppl. 1):9-10.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. y Roberts, E.H. 1989. A comparison of the low-moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture content and longevity in twelve species. *Annals of Botany* 63:601-611.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, R.H. y Tao, K.L. 1990. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65:493-504.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Astley, D., Pinnegar, A.E. y Kraak, H.L. 1996. Survival of dry and ultra-dry seeds of carrot, groundnut, lettuce, oilseed rape, and onion during five years' hermetic storage at two temperatures. *Seed Science and Technology* 24:347-358.
- FAO/IPGRI, 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO e IPGRI, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.
- Hong, T.D. y Ellis, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Boletín técnico No. 1. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=137.
- Hong, T.D., Linington, S.H. y Ellis, R.H. 1996. Seed storage behaviour: A compendium. *Handbooks for Genebanks* No. 4. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=244.
- Linington, S.H. 2003. The design of seed banks. Pp. 591-636 In *Seed conservation: Turning science into practice*. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.
- Probert, R.J. 2003. Seed viability under ambient conditions, and the importance of drying. Pp. 337-365. En *Seed conservation: Turning science into practice*. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.
- Vertucci, C.W. y Roos, E.E. 1993. Theoretical basis for seed storage II: The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research* 3:201-203.
- Walters, C. 1998. Ultra-dry technology: Perspective from the National Seed Storage Laboratory, USA. *Seed Science Research* 8 (Suppl. 1):11-14.
- Walters, C. 2003. Principles of preserving germplasm in gene banks. Pp. 113-138. En: *Strategies for survival*. (E. Guerrant, K. Havens y M. Maunder, eds.). Island Press, Covelo, CA, USA.

1. Introducción
2. Adquisición y registro del germoplasma
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. Limpieza de las semillas
4. Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. Determinación de la calidad de las semillas
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. Empaque y almacenamiento de las semillas
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. Distribución del germoplasma
8. Monitoreo y regeneración del germoplasma
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 Regeneración del germoplasma

5. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS SEMILLAS

5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas

¿Qué es la viabilidad de las semillas?

La viabilidad es la medida de cuántas semillas de un lote están vivas y pueden llegar a convertirse en plantas capaces de reproducirse en condiciones de campo adecuadas.

¿Por qué se debe determinar la viabilidad de las semillas?

Es muy importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se las siembre en el campo. Por tanto, las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el almacenamiento. Las semillas con una viabilidad inicial alta sobrevivirán también más tiempo en almacenamiento. La viabilidad de las semillas se reduce lentamente al comienzo y luego rápidamente a medida que la semilla envejece. Es importante saber cuándo ocurre esta reducción para tomar acciones conducentes a regenerar la accesión. El deterioro excesivo conducirá a la pérdida del material.

¿Cuándo se debe determinar la viabilidad?

La viabilidad de las accesiones se debe determinar:

- antes de empacar las semillas y almacenarlas en el banco de germoplasma; y
 - a intervalos regulares durante el almacenamiento.
- Las pruebas de viabilidad pueden tomar de unos cuantos días a varias semanas, dependiendo de la especie. De ser posible, los resultados de las pruebas de viabilidad deben estar listos antes de que las semillas se empaquen y se lleven a almacenamiento en el banco de germoplasma, de manera que las semillas de calidad deficiente se puedan identificar y regenerar.

Mientras se esperan los resultados de las pruebas de viabilidad, o si existe alguna demora en la

realización de las pruebas antes del almacenamiento, las semillas se deben ubicar en un ambiente fresco para minimizar el deterioro.

¿Cómo se debe determinar la viabilidad?

Existen muchos métodos para determinar la viabilidad de las semillas. El más exacto y confiable es la prueba de germinación. También existen pruebas bioquímicas, que tienen la ventaja de ser más rápidas, pero que no son tan exactas como la prueba de germinación, y que requieren habilidades especiales para realizarlas e interpretarlas. Normalmente, no se recomienda el uso generalizado de estas pruebas para determinar la viabilidad de las semillas en un banco de germoplasma.

¿Qué es una prueba de germinación?

Una prueba de germinación se realiza para determinar qué proporción de las semillas de una accesión germinará en condiciones favorables y producirá plántulas normales (plántulas con estructuras esenciales – raíces, brotes y suficiente reserva de alimento– capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras (ver Diagrama de Flujo 5.1).

¿Cómo se prueba la germinación?

Los requerimientos básicos para que una semilla germine son agua, oxígeno, luz y temperatura adecuada. Las semillas de diferentes especies tienen diferentes requerimientos, por lo cual no existe un conjunto general de condiciones para germinar las semillas de todas las especies. Las semillas de algunas especies son más tolerantes y germinan en una amplia gama de condiciones, pero la germinación completa sólo se puede lograr en condiciones óptimas.

¿Cuántas semillas se deben utilizar en la prueba?

- Para determinar la viabilidad al comienzo del almacenamiento se recomienda realizar la prueba de germinación con un tamaño de muestra fijo de 200 semillas.
- Las Normas para Bancos de Genes (FAO/IPGRI, 1994) recomiendan usar mínimo dos repeticiones de 100 semillas cada una. Si los resultados de la prueba muestran que la germinación está por debajo del 90%, se deberá someter a prueba un lote adicional de 200 semillas, utilizando el mismo método. El promedio de las dos pruebas se tomará como la viabilidad general de las semillas.

¿Cuándo ha germinado una semilla?

La germinación de la semilla se puede definir como la reanudación del crecimiento del embrión y la emergencia o protrusión de la radícula desde las estructuras de la testa. Para las pruebas de semillas en los bancos de germoplasma, la germinación no está completa hasta que se califique la plántula como normal de acuerdo con los criterios

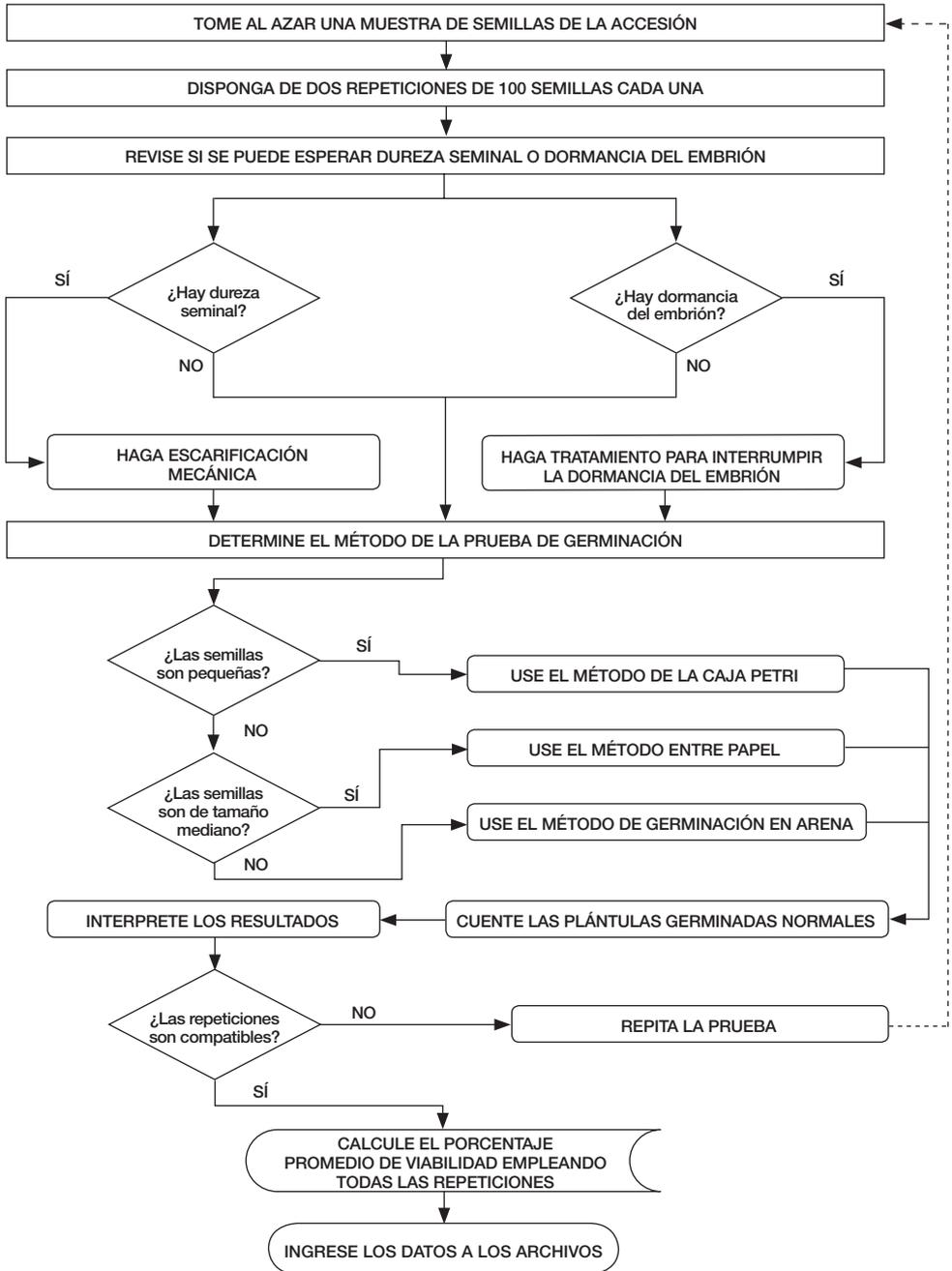


Almacenar las semillas con una calidad inicial alta maximizará la longevidad de la accesión. Monitorear la viabilidad durante el almacenamiento facilita la identificación oportuna de las accesiones que requieren regeneración, asegurando así la disponibilidad continua del germoplasma conservado.



Para las especies de semilla grande que tienen una tasa baja de multiplicación de semilla y para aquellas con problemas de regeneración (como las especies silvestres), puede resultar difícil gastar 200 semillas en una prueba de germinación. En este caso, se pueden utilizar dos repeticiones de 50 ó 25 semillas cada una, dependiendo de la cantidad disponible.

Diagrama de Flujo 5.1. Pruebas de germinación



específicos para cada especie (ver Asociación de Analistas Oficiales de Semillas [AOSA], 2005; ISTA, 2005). Esto se debe a que el propósito de las pruebas es dar una indicación de cómo se desempeñarán las semillas como propágulos en el campo.

Pruebas de germinación

Paso 1: Preparación de las pruebas de germinación

1. Revise los requerimientos específicos de temperatura, luz y cualquier otro tratamiento necesario para probar la germinación de una especie (ver Cuadro 5.1).
2. Revise si dispone del equipo y el ambiente adecuados para cumplir con estos requerimientos. De lo contrario, debe encontrar las mejores alternativas posibles.
3. Tome al azar una muestra de semillas de cada accesión después de mezclar con cuidado el lote de semillas en su recipiente o de haberlo esparcido sobre una superficie limpia y mezclado bien las semillas.
4. Separe 200 semillas (o menos, dependiendo de la disponibilidad) para cada prueba. Devuelva el resto de las semillas al recipiente.
5. Divida estas semillas en por lo menos dos repeticiones.
6. Si las semillas están muy secas (con un contenido de humedad por debajo del 8%) y si es probable que sufran daño por imbibición, puede ser necesario elevarles el contenido de humedad (este proceso se llama *humidificación*) al 15-17% antes de realizar la prueba de germinación (ver Recuadro 5.1).

Recuadro 5.1. Humidificación de semillas secas

Semillas secas

1. Disperse las semillas de manera uniforme en una caja petri.
2. Coloque tres toallas de papel bien húmedas en el fondo de una caja de polietileno grande.
3. Coloque las cajas petri (sin la tapa) con las semillas sobre el papel húmedo y cierre la caja con una tapa bien ajustada.
4. Coloque la caja en una incubadora a 20°C durante 24 horas o más, dependiendo del contenido de humedad inicial.

Semillas grandes

1. Coloque las semillas en bolsas porosas hechas de malla de toldillo o de un material similar.
2. En un desecador, coloque las bolsas sobre una rejilla colocada por encima del agua. Las semillas no deben entrar en contacto directo con el agua.
3. Coloque el desecador a 20°C durante aproximadamente 48 horas. La capa de semillas no debe ser más gruesa que una semilla para que todas las semillas absorban humedad de la atmósfera equitativamente.

Las semillas de las especies silvestres con testa dura pueden requerir escarificación (perforación de la testa con una cuchilla, papel de lija o un escalpelo, sin dañar el embrión) previa a la humidificación o la siembra.

Cuadro 5.1. Normas para realizar pruebas de germinación en las especies cultivadas más comunes. Para mayor información sobre otros cultivos, referirse a ISTA (2005) o AOSA (2005).

Cultivo	Especie	Sustrato*	Temp (°C)**	Conteo Inicial, Final (días)	Tratamientos especiales; instrucciones adicionales para semillas frescas y dormantes
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	SP	20; 20/30	5, 14	Iluminación; KNO ₃
Ají/Chile	<i>Capsicum frutescens</i>	SP; EP	20/30	6, 14	Iluminación; KNO ₃
Ajonjolí	<i>Sesamum indicum</i>	SP	20/30	3, 6	
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	SP; EP	20	4, 7	Escarificación mecánica de semillas duras
Algarrobo	<i>Vicia sativa</i>	EP; A	20	5, 10	
Algodón	<i>Gossypium</i> spp.	EP; A	20/30; 25	4, 12	Eliminar pelusa; escarificación mecánica de semillas duras
Amaranto	<i>Amaranthus</i> spp.	SP	20/30; 20	7, 14	
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	SP; EP; A	20/30; 25	5, 14	Calentamiento previo a 40°C durante cinco días
Arveja	<i>Pisum sativum</i>	EP; A	20	8	
Avena	<i>Avena sativa</i>	EP; A	20	5, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días y evaluar durante diez días
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>	SP; EP; A	20/30	7, 14	Iluminación; KNO ₃
Calabaza	<i>Cucurbita maxima</i>	EP; A	20/30; 25	4, 7	Mantener el sustrato en el lado seco
Cártamo	<i>Carthamus tinctorius</i>	SP; EP	20; 25;	4, 14	Iluminación a 15°C
Caupí	<i>Vigna unguiculata</i>	EP; A	20/30; 25	5, 8	
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	EP; A	20	4, 7	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante 5 días
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	EP; SP	20	6, 10	
Centeno	<i>Secale cereale</i>	SP; EP; A	20	4, 7	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	SP; EP	15	6, 21	
Coliflor	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	SP; EP	20/30; 20	3, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante tres días; KNO ₃ e iluminación
Chícharo	<i>Lathyrus sativus</i>	EP; A	20	4, 14	Escarificación mecánica de semillas duras
Fleo de los prados	<i>Phleum pratensis</i>	SP	20/30	5, 10	Iluminación; KNO ₃ y enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	SP	20/30; 20	28	Iluminación

Cultivo	Especie	Sustrato*	Temp (°C)**	Conteo Inicial, Final (días)	Tratamientos especiales; instrucciones adicionales para semillas frescas y dormantes
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EP; A	20/30; 25; 20	5, 8	
Frijol lima	<i>Phaseolus lunatus</i>	EP; A	20/30; 25	5, 9	
Frijol mungo	<i>Vigna radiata</i>	EP; A	20/30; 25	3, 7	
Guandul	<i>Cajanus cajan</i>	EP	25	5, 10	Escarificación mecánica de semillas secas
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	EP	20	5, 8	Escarificación mecánica de semillas duras
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	EP; A	20/30; 25; 20	3, 7	
Haba	<i>Vicia faba</i>	EP; A	20	4, 14	Enfriamiento previo a 10°C durante tres días
Lechuga	<i>Latuca sativa</i>	SP; EP	20	7	Iluminación; enfriamiento previo
Lenteja	<i>Lens culinaris</i>	EP; A	20	5, 10	Escarificación mecánica de semillas duras
Lenteja negra	<i>Vigna mungo</i>	EP	20/30; 25; 20	3, 7	
Lino	<i>Linum usitatissimum</i>	EP; SP	20/30; 20	3, 7	
Lupino	<i>Lupinus angustifolius</i> ; <i>L. albus</i>	EP; A	20	3, 10	
Maíz	<i>Zea mays</i>	EP; A	20/30; 25; 20	4, 7	
Maní	<i>Arachis hypogaea</i>	EP; A	20/30; 25	5, 10	Etefon, 0.2%
Melón	<i>Cucumis melo</i>	EP; A	20/30	4, 10	Mantener el sustrato en el lado seco
Millo africano	<i>Eleusine corocana</i>	SP	20/30	8	KNO ₃
Millo cola de zorra	<i>Setaria italica</i>	SP	20/30	4, 10	
Millo perla	<i>Pennisetum glaucum</i>	SP; EP	20/30; 25	3, 7	
Mostaza india	<i>Brassica juncea</i>	SP; EP	20/30	3, 7	Iluminación; enfriamiento previo a 10°C durante siete días y evaluar durante otros cinco días
Mostaza negra	<i>Brassica nigra</i>	SP; EP	20/30; 20	3, 7	Iluminación; KNO ₃ y enfriamiento previo a 10°C durante tres días
Nabo	<i>Brassica napus</i>	EP, SP	20/30	3, 7	
Ocra	<i>Abelmoschus esculentus</i>	EP; SP	20/30	4, 14	
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	SP; EP	20/30; 20	8, 16	GA ₃ , 2000 ppm
Pasto bermuda	<i>Cynodon dactylon</i>	SP	20/30	7, 21	Iluminación; KNO ₃

Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8

Cultivo	Especie	Sustrato*	Temp (°C)**	Conteo Inicial, Final (días)	Tratamientos especiales; instrucciones adicionales para semillas frescas y dormantes
Pasto Orchard	<i>Dactylis glomerata</i>	SP	15/25	7, 21	Iluminación; enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante siete días
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	SP; EP	20/30	3, 7	Mantener el sustrato en el lado seco
Porongo	<i>Lagenaria siceraria</i>	EP; A	20/30; 20	14	
Rábano	<i>Raphanus sativus</i>	SP; EP	20/30; 20	4, 6	
Raigrás	<i>Lolium perenne</i>	SP	15/25; 20	5, 14	KNO ₃ y enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Remolacha	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i>	SP, EP, A de 25°C	20/30; 20	3, 10	Lavar previamente y secar a un máximo
Repollo	Brassica oleracea var. <i>capitata</i>	SP; EP	20/30; 20	3, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante tres días; KNO ₃ e iluminación
Ricino	<i>Ricinus communis</i>	EP; A	20/30	7, 14	
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	EP; A	20/30; 25	4, 14	Mantener el sustrato en el lado seco; evaluar a 30°C
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	SP; EP	20/30; 25	3, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Soya	<i>Glycine max</i>	EP; A	20/30; 25	5, 8	
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP	20/30	4, 14	Iluminación
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP; EP	20/30	5, 14	Iluminación; KNO ₃
Trébol blanco	<i>Trifolium repens</i>	SP; A	20	3, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Trébol de Alejandría	<i>Trifolium alexandrinum</i>	SP; EP	20	3, 7	
Trébol dulce	<i>Melilotus albus</i>	SP; EP	20	4, 7	
Trébol rojo	<i>Trifolium pratense</i>	SP; EP	20	4, 10	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	SP; EP; A	20	4, 7	Calentamiento previo (30–35°C); enfriar previamente; GA ₃
Trigo sarraceno	<i>Fagopyrum esculentum</i>	EP; SP	20/30; 20	3, 6	
Triticale	<i>Triticosecale</i>	SP; EP; A	20	4, 7	Enfriamiento previo a 5 o a 10°C durante cinco días
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	SP; EP	20/30; 20	6, 14	GA ₃ 50 ppm
Zapallo	<i>Cucurbita pepo</i> ; <i>C. moschata</i>	EP; A	20/30	4, 7	Mantener el sustrato en el lado seco

*SP = Sobre papel, EP = Entre papel, A = Arena

**20/30 = temperaturas alternadas de 20°C aplicada durante ocho horas diarias, y de 30°C aplicada durante 16 horas.

Paso 2: Preparación de la prueba de germinación

Aunque existen varios métodos para evaluar la germinación, se sugieren los cuatro que se describen a continuación, que se pueden usar con la mayoría de las especies y dan resultados uniformes:

1. Método de germinación sobre papel
2. Método de germinación entre papel
3. Germinación en arena
4. Método de germinación en agar

En los dos primeros métodos, el papel absorbente se usa como sustrato para la germinación.

Calidad del papel sustrato

Es importante utilizar como sustrato un papel de alta calidad con el fin de obtener una germinación uniforme y resultados que se puedan reproducir. En lo posible, el papel debe cumplir con las siguientes especificaciones (ISTA, 2005):

- El papel utilizado como sustrato¹⁰ no debe ser tóxico para las plántulas en desarrollo.
- Debe poder absorber y suministrar humedad suficiente para que las semillas germinen.
- Debe ser lo suficientemente fuerte para que no se deshaga mientras se manipula, y no lo penetren las raíces de las plántulas en desarrollo.
- Debe tener un pH neutro de 6-7.



Todos los pedidos de papel sustrato se deben evaluar cuando se reciban para verificarles la calidad.

Prueba simple para verificar la calidad del papel

A. Presencia de sustancias tóxicas

1. Corte el papel al tamaño adecuado y colóquelo en una caja petri de 9 cm.
2. Humedezca el papel con suficiente agua.
3. Utilizando semillas de especies sensibles como el pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*), la petunia (*Petunia hybrida*) o el tabaco (*Nicotiana tabacum*), haga pruebas para observar la germinación en el papel humedecido.
4. Evalúe el desarrollo de las raíces después de cinco días.
 - Si las puntas de las raíces aparecen recortadas y descoloridas, el papel es tóxico.

B. Resistencia del papel

1. Humedezca el papel y sosténgalo en el aire por una esquina.
 - El papel no debe deshacerse.

¹⁰ Ejemplos de sustratos estándar son el papel de filtro grado 181 de Whatman y las toallas de papel no tóxico 400PT de Seedburo.

C. Absorción de la humedad

1. Corte el papel en tiras de 10 mm de ancho.
2. Sumerja unos 20 mm del papel en agua y sosténgalo verticalmente.
3. Mida la altura por encima del nivel al cual ha subido la humedad.
 - El estándar mínimo es una elevación de 30 mm en dos minutos.

Control de hongos en las pruebas de germinación

La contaminación por hongos es un evento común durante las pruebas de germinación, en especial con las semillas de leguminosas; por lo general, se asocia con la presencia de semillas inmaduras, dañadas o viejas. Ésta también se puede presentar durante los tratamientos previos como la extracción de semillas o como resultado de problemas de higiene en el área donde se realizan las pruebas de semillas. Para minimizar el riesgo de contaminación por hongos, adopte las siguientes prácticas de laboratorio:

1. Limpie y desinfecte el área de prueba (esterilizando las superficies con alcohol a 70-95% o blanqueador doméstico a 20%) al igual que las incubadoras, entre tandas de procesamiento, para limitar la dispersión de los hongos. Una técnica simple, pero efectiva, para reducir la contaminación es lavar las manos, los módulos de trabajo y el interior de las incubadoras con jabón y agua caliente.
2. Distribuya las semillas adecuadamente y asegúrese de que no se toquen unas con otras. Si es necesario, utilice más repeticiones.
3. Proporcione un ambiente óptimo para la germinación de manera que las semillas germinen rápidamente. El régimen de temperatura debe ser adecuado y el ambiente de prueba estar bien ventilado.
4. Asegúrese de que los recipientes y medios de las pruebas de germinación estén limpios de manera que no constituyan fuentes de inóculo. Esterilice la superficie de los recipientes frotándolos con alcohol a 70-95%, o sumergiéndolos en blanqueador a 20% o agua caliente, a 55°C, durante 10-15 minutos.
5. Evite el daño por imbibición (mediante la humidificación previa de las semillas) que podría conducir al escape de contenido celular, el cual provee nutrientes para los hongos.
6. Elimine rápidamente las semillas en descomposición para prevenir la dispersión de hongos hacia las semillas vecinas.

Si la contaminación está en aumento, lave bien las semillas en blanqueador al 1-10% y reinicie la prueba en un recipiente limpio sobre un sustrato nuevo.

7. Cuando descubra que las estructuras que recubren la semilla (como las glumas) son fuentes de infección, elimínelas antes de realizar las pruebas.
8. Elimine las semillas que han germinado antes de la cosecha y se han secado, ya que pueden ser fuentes de infección.

Así como estas prácticas minimizan el riesgo de contaminación por hongos, cubrir las semillas con fungicidas como Tiram o Benlate, o esterilizar las superficies con hipoclorito de sodio, reduce el ataque de hongos durante las pruebas de germinación. Sin embargo, el uso de fungicidas puede afectar los resultados de las pruebas de germinación, y puede constituir una amenaza para la salud de quienes analizan las semillas. Los fungicidas se deben emplear sólo cuando sea esencial aunque son muy útiles durante la siembra en el campo para la regeneración.

Cubrimiento de las semillas

1. Agregue una pizca de fungicida al recipiente que contiene las semillas para la prueba de germinación.
2. Agite bien el recipiente, de manera que las semillas reciban un cubrimiento uniforme de fungicida.

Esterilización de la superficie

1. Sumerja las semillas durante diez minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. En general, el blanqueador casero viene a una concentración de hipoclorito de sodio al 5%. Agregue 80 ml de agua destilada a 20 ml de blanqueador para obtener una solución al 1%.
2. Enjuague bien las semillas antes de realizar la prueba.

Método de germinación sobre papel

Este método es el más adecuado para especies cuyas semillas miden menos de 2 mm de diámetro, como los vegetales de semilla pequeña y las gramíneas forrajeras. Las semillas se germinan sobre papel absorbente húmedo, en recipientes con tapas bien ajustadas para evitar la pérdida de la humedad. Entre los recipientes más comúnmente utilizados están las cajas petri de plástico o vidrio de 9 cm.

1. Esterilice la superficie del recipiente frotándola con alcohol a 70-95% o sumergiendo el recipiente en blanqueador a 20% o en agua caliente a 55°C, durante 10-15 minutos.
2. Corte el papel absorbente de acuerdo con el tamaño y la forma del recipiente. Para las cajas petri puede utilizar papel de filtro redondo, como el Whatman Grado 181, de un diámetro adecuado.

3. Coloque el papel sustrato en la parte inferior del recipiente o de la caja petri.
4. Rotule los recipientes con el número de la accesión, el número de la repetición y la fecha de la prueba; para el rotulado utilice un lápiz o marcador permanente.
5. Agregue el volumen de agua destilada que se requiera. Si no dispone de agua destilada, puede utilizar agua corriente, previamente hervida y enfriada. El volumen de agua destilada depende del grosor del papel sustrato y del tamaño del recipiente. Para el papel de filtro Whatman Grado 181 en cajas petri de 9 cm, se requieren 4 ml. El papel de filtro no debe estar tan mojado que forme una película de agua alrededor del dedo cuando se le presione.
6. Empuje firmemente el papel sustrato hacia el fondo del recipiente utilizando un embudo vuelto al revés o unas pinzas.
7. Disperse las semillas de manera uniforme sobre la superficie del papel de modo que no queden en contacto. La distancia entre las semillas debe ser de por lo menos tres a cinco veces el diámetro de la semilla.
8. Tape los recipientes y asegúrese que no haya aire encerrado proveniente del exceso de humedad en las tapas.
9. Coloque los recipientes en una germinadora o incubadora mantenida a la temperatura recomendada para la germinación de la especie (ver Cuadro 5.1).
10. Revise regularmente el nivel de humedad del sustrato, en especial si la humedad dentro de los estantes no es controlada o cuando la temperatura se haya fijado en 25-30°C. Por lo general, hay que mojar el papel absorbente varias veces durante la prueba. Alternativamente, mantenga los recipientes en una bolsa plástica delgada (doblada holgadamente en el extremo abierto, pero no sellada para permitir la difusión de oxígeno) para evitar que el sustrato se seque.
11. Realice la prueba por el período de tiempo recomendado (ver Cuadro 5.1) y cuente el número de semillas que han germinado.
12. Si algunas semillas no han germinado y parecen estar dormantes, trátelas con técnicas apropiadas para estimular la germinación (ver Cuadro 5.1) y continúe la prueba hasta que todas las semillas hayan germinado o hasta que no haya más germinación después de dos conteos consecutivos.
13. Tome nota de las semillas que no germinaron, pero que están firmes y sanas al final del primer conteo, y de aquellas que no germinaron y que se presume han muerto, al final de la prueba de germinación.

La Figura 5.1 muestra las etapas de la prueba de germinación utilizando papel absorbente en cajas petri.



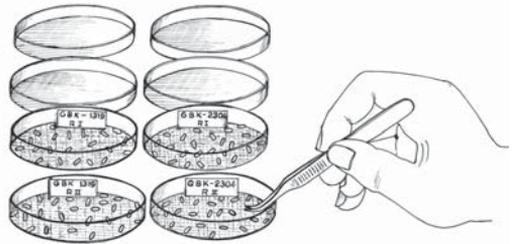
1



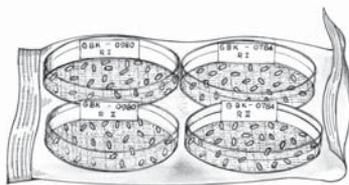
2



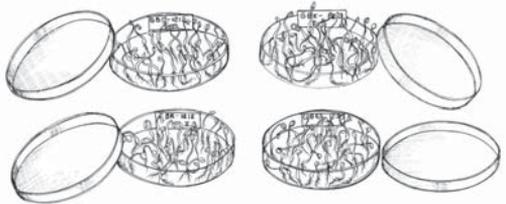
3



4



5



6

Figura 5.1. Prueba de germinación sobre papel absorbente, en cajas petri



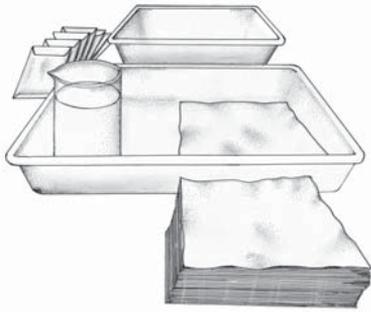
El método de germinación entre papel es económico y de fácil preparación, pero las semillas no se pueden observar sin desenrollar el papel. No seque y reutilice el papel para otra prueba ya que podría transmitir hongos de una prueba a otra.

Método de germinación entre papel

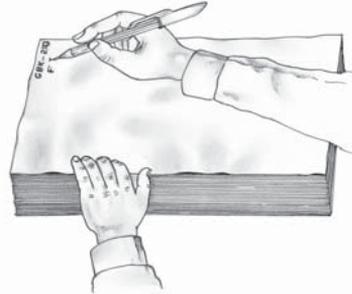
Este método es el más adecuado para las especies con semillas medianas y grandes, entre 2 mm y 1 cm de diámetro, como las de muchos cereales, leguminosas de grano y vegetales. Las semillas se germinan entre dos capas de papel toalla húmedo. En lo posible, el papel toalla debe cumplir las especificaciones descritas anteriormente (e.g., papel toalla no tóxico de Seedburo Equipment Co., papel de germinación pesado y regular de Hoffman Manufacturing, Inc. y papel para pruebas de semillas Grado 3663 de Whatman Plc.).

1. Corte el papel a un tamaño suficiente para que sostenga una repetición de las semillas.
2. Rotule el papel en un extremo con el número de la accesión, el número de repetición y la fecha de la prueba. Para el rotulado utilice lápiz o marcador permanente.
3. Humedezca el papel con agua.
4. Organice las semillas en hileras a intervalos regulares aproximadamente 4 cm del borde superior, dejando un espacio de 3-4 cm a los lados. Lo ideal es que la distancia entre semillas sea de por lo menos tres a cinco veces el diámetro de la semilla.
5. Cubra las semillas con otra hoja de papel toalla húmedo.
6. Enrolle el papel sin apretarlo, iniciando en el extremo opuesto al rótulo.
7. Utilice un clip o una banda de caucho para sostener los rollos y evitar que se desbaraten.
8. Ponga los rollos en forma vertical en una bandeja plástica profunda.
9. Agregue una cantidad suficiente de agua a la bandeja (que cubra los 3 cm inferiores de los rollos).
10. Coloque la bandeja en una incubadora o germinadora mantenida a la temperatura recomendada y realice la prueba por el tiempo recomendado (ver Cuadro 5.1).
11. Mantenga las toallas húmedas rociándolas con agua (utilice atomizadores) si es necesario, especialmente cuando las temperaturas sean altas (25-30°C).
12. Cuente las semillas germinadas desenrollando el papel con cuidado para que no se rasgue y se dañen las raíces de las plántulas jóvenes.
13. Si algunas semillas no han germinado y parecen estar dormantes, trátelas con una técnica apropiada para estimular la germinación (ver Cuadro 5.1). Continúe la prueba hasta que hayan germinado todas las semillas o hasta que no ocurra ninguna otra germinación después de dos conteos consecutivos.
14. Tome nota de las semillas que no germinaron, pero que están firmes y sanas al final del primer conteo, y de aquellas que no presentaron germinación y que se presume han muerto, al final de la prueba de germinación.

La Figura 5.2 muestra las etapas en la preparación de las pruebas de germinación utilizando toallas de papel.



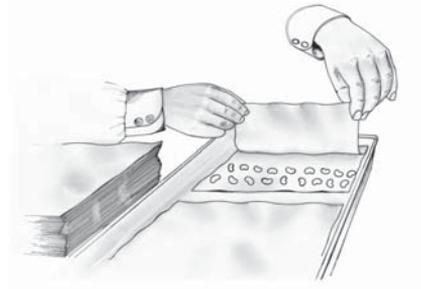
1



2



3



4



5



6

Figura 5.2. Prueba de germinación de semillas mediante el método entre papel



Utilice arena fina para la prueba de germinación. La arena de río o de cantera es mejor que la de playa. Si debe usar arena de playa, lávela bien para eliminar todas las sales. Antes de usarla, limpie la arena pasteurizándola (a 180°F o a 82°C y a una presión de 5 psi [lb/pulgada cuadrada] en tres ciclos de una hora cada uno).



El agar permanece húmedo hasta por un mes y es un sustrato apropiado para estudios de dormancia. Sin embargo, este sustrato es susceptible de contaminarse con bacterias y hongos del aire, y cuando se le utiliza, se requieren condiciones estériles en el laboratorio.

Germinación en arena

Este método es el más adecuado para las semillas grandes (con un diámetro de más de 1 cm), que son difíciles de germinar en cajas petri o demasiado pesadas para el método entre papel.

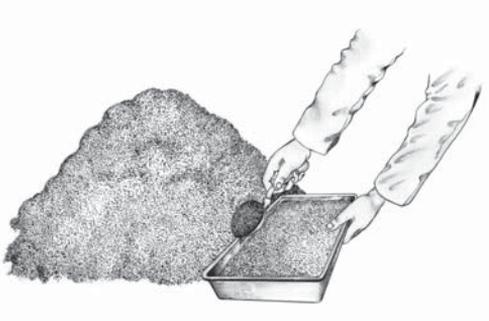
1. Envase la arena estéril, húmeda, en macetas o bandejas plásticas profundas con drenaje. En la base de la bandeja, se puede colocar una hoja sencilla de papel para evitar que la arena se filtre por entre las perforaciones del drenaje.
2. Riegue la arena hasta que quede húmeda. No utilice agua en exceso.
3. Siguiendo un patrón regular, equidistante, haga perforaciones con una profundidad de más o menos el tamaño de las semillas. Lo ideal es que la distancia entre las perforaciones sea de por lo menos tres a cinco veces el diámetro de la semilla.
4. Prepare un rótulo plástico o de madera con el número de la accesión, la fecha de siembra y el número de la repetición, y colóquelo en cada bandeja.
5. Coloque una semilla en cada perforación y cubra las perforaciones con arena.
6. Riegue la arena de nuevo con un rociador para evitar que la capa de arena se desplace o que las semillas se desacomoden durante el riego. El riego por debajo es mejor que el riego por encima –esto se logra colocando los recipientes de la prueba sobre bandejas plásticas más grandes con agua, durante una hora.
7. Coloque las bandejas a una temperatura y luminosidad apropiadas para la especie.
8. Mantenga el sustrato húmedo durante las pruebas agregando agua, pero no en exceso.
9. Realice la prueba por el tiempo recomendado para la especie y cuente el número de semillas que brotaron.

La Figura 5.3 muestra las etapas de la prueba de germinación en arena.

Método de germinación en agar

El agar es un sustrato alternativo al papel, particularmente útil para probar la germinación de semillas pequeñas y medianas. El agar se disuelve lentamente en agua caliente y forma una solución viscosa que al enfriarse se convierte en una gelatina dura.

1. Esterilice la superficie de los recipientes frotándolos con alcohol a 70-95% o sumergiéndolos en blanqueador a 20% o en agua caliente a 55°C, durante 10-15 minutos.
2. Rotule las cajas petri de 9 cm y sus tapas (para semillas pequeñas), o cualquier otro recipiente para pruebas de germinación resistente al calor, con el número de la accesión, el número de la repetición y la fecha de la prueba.



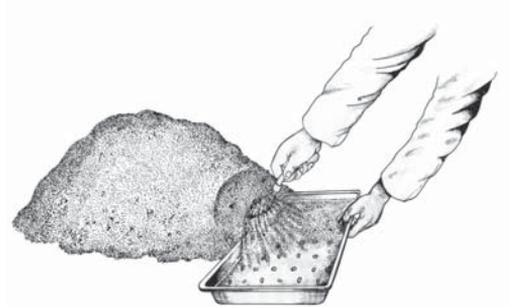
1



2



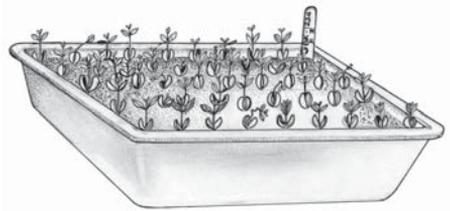
3



4



5



6

Figura 5.3. Prueba de germinación de semillas en arena



Sólo las plántulas normales (las que demuestran capacidad para desarrollarse de manera sostenida en condiciones adecuadas) se consideran germinadas. Las plántulas anormales no se consideran germinadas.

3. Prepare la solución de agar al 1% (agar en agua) disolviendo 1 g de polvo de agar en 100 ml de agua destilada tibia, calentada sobre una placa caliente.
4. Deje que la solución hierva hasta que el agar se disuelva por completo, luego enfríe ligeramente a 50°C y vierta la solución en las cajas petri rotuladas o en los otros recipientes. El grosor del sustrato debe ser el doble del de las semillas.
5. Organice las semillas de manera equidistante sobre la superficie del agar.
6. Cubra las cajas con sus tapas y colóquelas en una incubadora a la temperatura recomendada para la especie (ver Cuadro 5.1).
7. Realice la prueba durante el tiempo recomendado (ver Cuadro 5.1) y cuente el número de semillas que germinaron.

Paso 3: Evaluación de las pruebas de germinación

1. Las plántulas que se sacaron durante el transcurso de la prueba de germinación se clasifican como plántulas normales o como plántulas anormales (ver Recuadro 5.2).
 - Las plántulas normales poseen estructuras adecuadas de raíces y brotes esenciales para el desarrollo posterior de las plantas.
 - Las plántulas anormales son incapaces de desarrollarse más y sufren deficiencia, descomposición o debilidad en sus sistemas de raíces y brotes.
2. Es importante monitorear regularmente las pruebas de germinación y sacar las plántulas normales y las de germinación anormal con el fin de permitir el desarrollo de otras plántulas en un ambiente menos congestionado. También es importante remover las semillas infectadas con hongos para evitar que la infección se disperse. Es aconsejable efectuar un conteo de la germinación inicial a los 3 ó 7 días, seguido por un conteo final a los 7 ó 14 días, dependiendo de la especie. Algunas especies como las gramíneas requieren un período de prueba de hasta 21 ó 28 días, y se aconseja hacer un conteo intermedio a los 14 días. Las normas de la ISTA y la AOSA para las pruebas de semillas (ver ISTA, 2005 y AOSA, 2005) dan procedimientos de germinación y períodos detallados para hacer los conteos de las plántulas.
3. Registre las observaciones en la hoja de datos que se suministra en el Cuadro 5.2.
4. También registre cualquier plántula anormal o semilla muerta que se haya sacado durante el primer conteo o durante el intermedio (ver Cuadro 5.2) –éstas constituyen una indicación del avance en el deterioro de la semilla si se requiriera una revisión en una fecha posterior.
5. Al terminar la prueba de germinación, cuente y registre todas las semillas muertas y sin germinar de cada repetición.

6. Calcule el porcentaje promedio de germinación de la accesión a partir de los resultados de todas las repeticiones para determinar el número de *plántulas normales* que se produjeron.
7. Repita la prueba de germinación si la diferencia entre las dos repeticiones excede el 10% o si la tolerancia máxima excede el 2.5% de probabilidad (ver Ellis *et al.*, 1985).
8. Una vez que una semilla ha germinado, la plántula resultante se puede descartar o transplantar para regeneración cuando el número de semillas en almacenamiento es muy bajo.

Recuadro 5.2. Las plántulas con los siguientes defectos se clasifican como anormales (para más detalles, referirse a ISTA [2003, 2005] o AOSA [2005]).

Raíces

- Raíz primaria atrofiada, corta, sin punta, ausente, rota, dividida desde la punta, demasiado delgada, atrapada en la testa de la semilla, con geotropismo negativo, vidriosa, en descomposición por infección primaria o con menos de dos raíces secundarias en las monocotiledóneas.

Brote (hipocótilo, epicótilo y mesocótilo)

- Corto y grueso, partido a lo largo, ausente, obstruido, torcido, vidrioso o en descomposición por infección primaria.

Hojas/capullos terminales

- Deformes, dañadas, ausentes o en descomposición por infección primaria.

Cotiledones

- Hinchados, deformes, necróticos, vidriosos, separados o ausentes, y en descomposición debido a una infección primaria.

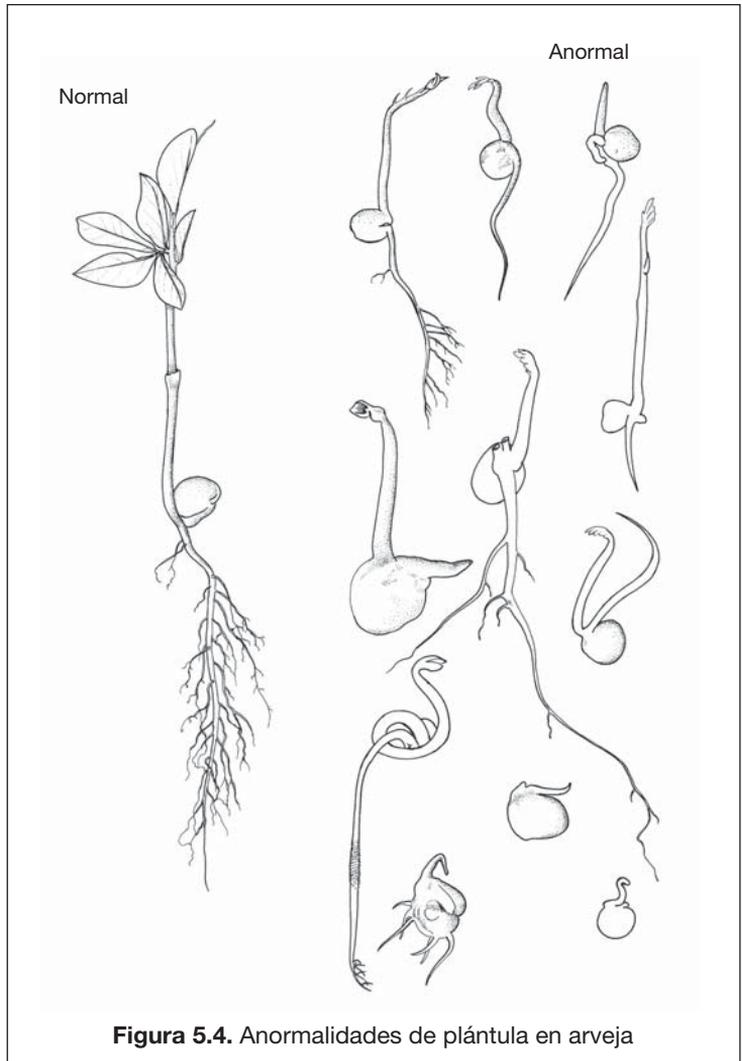
En las Figuras 5.4 a 5.7, se muestran ejemplos de plántulas normales y anormales de arveja, maní forrajero, trigo y cebolla.

¿Por qué algunas semillas no germinan?

Las semillas no germinan porque están muertas o porque están dormantes. Las semillas muertas generalmente se ablandan y se pudren durante la prueba. Para determinar si las semillas están muertas o dormantes, inspeccione las semillas no germinadas con unas pinzas para determinar si están blandas o firmes. Las semillas no germinadas que tienen embriones firmes son potencialmente viables. Un alto porcentaje de estas semillas indica que las condiciones de germinación no fueron las óptimas o que las semillas son dormantes.

Dormancia

La dormancia se refiere al estado en el cual las semillas viables no germinan aun en condiciones normalmente favorables para la germinación.



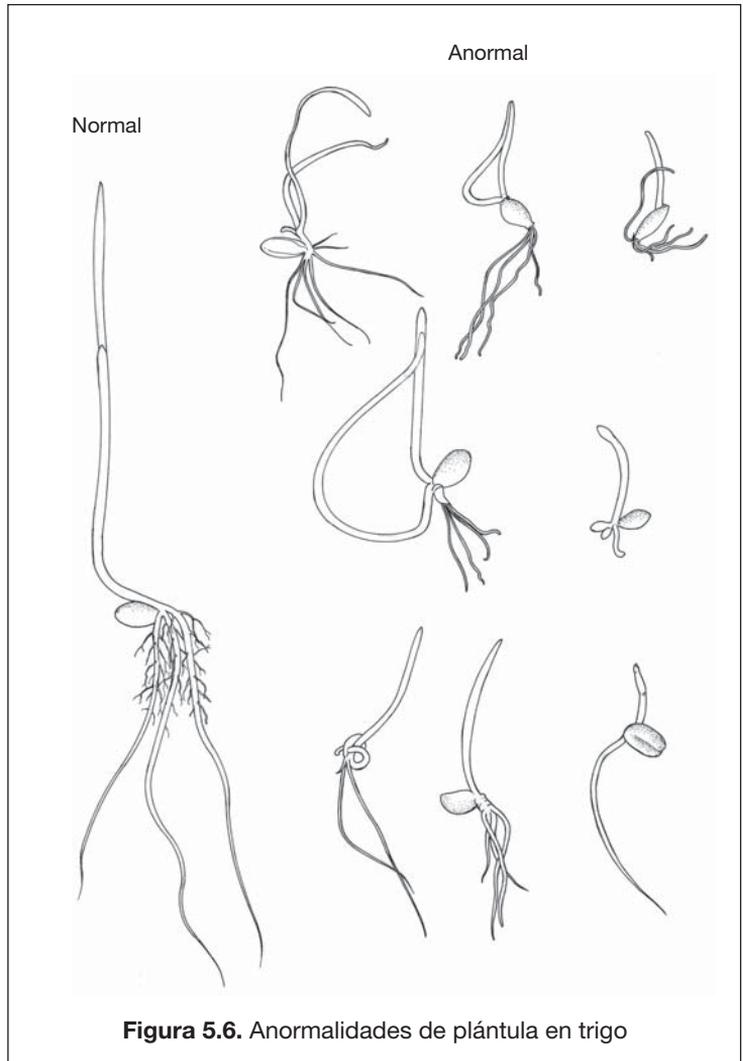
¿Cómo se determina si las semillas son dormantes?

Las semillas que permanecen duras, o que absorben agua pero permanecen firmes y en buena condición durante las pruebas de germinación, probablemente son dormantes. La dormancia de las semillas es común en semillas recién cosechadas y en muchos parientes silvestres de especies cultivadas.

Tipos de dormancia

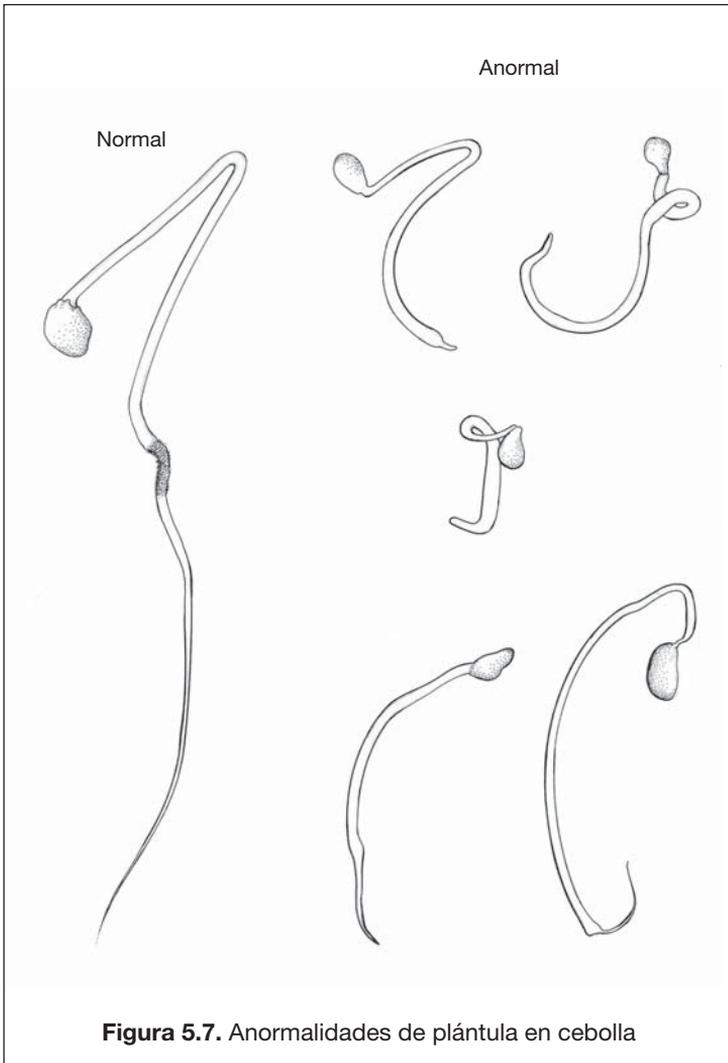
Dormancia de la testa de las semillas

Las condiciones físicas, químicas o mecánicas evitan la absorción de la humedad. Ejemplos de dormancia de la testa de las semillas



creciendo después de la dispersión, y la germinación no ocurre hasta que el embrión alcanza una longitud crítica específica de la especie. Se pueden encontrar ejemplos en las familias Annonaceae, Apiaceae, Orchidaceae, Orobanchaceae y Ranunculaceae.

La dormancia también puede ser causada por una combinación de semillas impermeables o testas de frutos y embriones fisiológicamente dormantes. Para que ocurra la germinación, se deben interrumpir ambos tipos de dormancia. El orden en el cual se debe interrumpir cada tipo de dormancia depende de la especie. Algunos ejemplos son *Ceanothus* (Rhamnaceae), *Tilia* (Tiliaceae) y *Rhus* (Anacardiaceae).



Cómo determinar el tipo de dormancia

Si la eliminación de la testa de la semilla no resulta en germinación, el mecanismo de dormancia está ubicado en el embrión.

Tratamientos para interrumpir la dormancia

En algunas semillas se encuentran dormantes en el momento de la cosecha, la dormancia se interrumpe naturalmente con el paso del tiempo. Otras especies requieren algún tratamiento previo. Existen varios métodos que se aplican a determinados géneros.

- Para eliminar la cubierta cerosa y permitir la imbibición, coloque las semillas en agua a 75°C durante tres a seis minutos. Se debe tener cuidado de no usar temperaturas altas durante períodos largos o hervir las semillas.



Figura 5.8. Escarificación manual de la testa de las semillas

Interrupción de la dormancia del embrión

Existen varios tratamientos para resolver el problema de la dormancia del embrión (ver Cuadro 5.1). Éstos incluyen el enfriamiento previo (también denominado estratificación en frío) para especies de altitudes templadas y altas del trópico, el calentamiento previo, la aplicación de ácido giberélico (GA_3) en bajas concentraciones, la adición de nitrato de potasio (KNO_3) al sustrato, y la iluminación.

Enfriamiento previo (estratificación en frío)

Las semillas se colocan en recipientes sobre un sustrato de germinación humedecido y se conservan a 3-5°C en un refrigerador durante siete días. Para semillas más dormantes, el tratamiento se puede extender a 14 días. Una vez se termina la estratificación, los recipientes se trasladan a incubadoras y se dejan germinar las semillas en las condiciones recomendadas.

Calentamiento previo

Antes de la germinación, las semillas se someten a una temperatura que no exceda los 40°C durante un período de siete días, en un lugar donde circule el aire libremente y en las condiciones recomendadas.

Acido giberélico

El papel de la prueba de germinación se humedece con una solución al 0.05% de ácido giberélico (GA₃), preparada disolviendo 500 mg de GA₃ en 1 litro de agua. Luego se continúa la germinación en las condiciones recomendadas.

Nitrato de potasio

Se utiliza una solución al 0.2% de nitrato de potasio (KNO₃) que se prepara disolviendo 2 g de KNO₃ en 1 litro de agua para humedecer el papel de la germinación al comienzo de la prueba. Se continúa la germinación en las condiciones recomendadas.

Iluminación

La germinación puede o no requerir iluminación, dependiendo de la especie. Cuando se usan temperaturas constantes para germinar especies que requieren iluminación, las pruebas se deben iluminar por lo menos durante 8 de cada ciclo de 24 horas. Cuando se usan temperaturas alternantes, cualquier aplicación necesaria de iluminación debe coincidir con el ciclo de temperatura alta. La intensidad de la luz debe ser de 750-1250 lux y provenir de lámparas de luz blanca, fría.

Muchos de los métodos descritos son específicos para un género. El Cuadro 5.1. muestra los tratamientos recomendados para interrumpir dormancia en cultivos comunes. Para obtener información sobre otras especies, referirse a Ellis *et al.* (1985).

Algoritmo para desarrollar pruebas de germinación adecuadas en especies para las cuales no hay información disponible

Paso 1

- Determine si la testa de las semillas es impermeable verificando la imbibición de las semillas dispuestas sobre papel de filtro húmedo durante la noche. Si las semillas no han absorbido agua, escarifique las testas con un escalpelo y observe de nuevo después de 12 horas. Proceda a germinar cuando las semillas hayan absorbido agua.

Paso 2

- Si el primer paso no resulta en una germinación completa y las accesiones son de origen templado, pruebe a temperaturas constantes de 15 y 20°C. Para las accesiones de origen tropical, utilice temperaturas constantes de 20 y 25°C.
- Si el origen de la accesión es desconocido o dudoso, pruebe a 15, 20 y 25°C.
- En todos los casos, aplique 12 horas de luz por día.

Paso 3

- Si el segundo paso no resulta en una germinación completa, pruebe una muestra adicional de semillas a temperaturas alternantes de 25/10°C (12 horas y 12 horas) si las accesiones son de origen templado, y 35/20°C (12 horas y 12 horas) si son de origen tropical.
- Si se aplica iluminación durante 12 horas por día, ésta debe coincidir con el ciclo de temperatura más alta.
- Si el origen de la accesión es desconocido o dudoso, pruebe una muestra de semillas a cada temperatura.

Paso 4

- Si el tercer paso no resulta en una germinación completa, agregue nitrato de potasio al 0.1-0.2% (KNO_3) al sustrato de la prueba al régimen de temperatura más exitoso determinado en los pasos 2 y 3.

Paso 5

- Si el cuarto paso no resulta en una germinación completa, enfríe previamente las semillas a 2-6°C durante ocho semanas y pruebe la germinación en el régimen más exitoso determinado en los pasos dos al cuatro.

Paso 6

- Si no obtiene una germinación completa, calcule la viabilidad utilizando la prueba de tetrazolio que se describe a continuación. Los resultados de esta prueba indicarán si la falta de germinación completa se debe a la presencia de semillas muertas.
- Si la prueba de tetrazolio indica que la dormancia no se ha roto y que las semillas son viables, intente otros tratamientos para romper la dormancia como el ácido giberélico (GA_3) o el calentamiento previo a 40°C durante tres a siete días.

Prueba de tetrazolio para verificar la viabilidad de las semillas

La prueba de tetrazolio se puede utilizar como un procedimiento de apoyo para identificar semillas viables pero dormantes que no han germinado al final de una prueba de germinación. El procedimiento para esta prueba se indica a continuación.

Acondicionamiento previo

1. Remueva las estructuras que cubren la semilla (glumas, etc.).
2. Acondicione previamente las semillas sumergiéndolas en agua o colocándolas en un medio húmedo a 30°C. No es necesario un acondicionamiento previo cuando las semillas sin germinar se evalúan al final de una prueba de germinación.



La prueba de tetrazolio no es una prueba definitiva de la viabilidad de las semillas. Para hacer el resultado más confiable, la prueba se debe comparar con los resultados de las pruebas de germinación para cada especie.

Preparación de la solución de cloruro de tetrazolio

La solución de tetrazolio debe estar a un pH entre 6 y 8 para lograr los mejores resultados. Para preparar 1 litro de solución neutralizada de cloruro de tetrazolio al 1%:

1. Disuelva 3.631 g de potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) en 400 ml de agua destilada.
2. Disuelva 7.126 g de disodio hidrógeno fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 600 ml de agua destilada.
3. Mezcle las dos soluciones para preparar la solución neutralizada.
4. Disuelva 10 g de cloruro de 2,3,5,-trifenil-tetrazolio en 1 litro de la solución neutralizada.

Para producir una solución de tetrazolio al 0.5%, mezcle una parte de la solución de reserva con una parte de agua destilada. La solución de cloruro de tetrazolio se debe almacenar en condiciones de oscuridad y frío, durante períodos cortos.

Tinción

1. Corte las semillas longitudinalmente a través del embrión con una cuchilla.
2. Deseche la mitad de cada semilla y coloque la otra mitad en la solución de tinción a la concentración recomendada (ver Cuadro 5.3) en un vial de vidrio.
3. Coloque los viales de vidrio en una incubadora, en un área oscura, a la temperatura y duración recomendadas para cada especie (ver Cuadro 5.3).
4. Después de la tinción, lave las semillas varias veces en agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
5. Sumerja las semillas en una solución de lactofenol (1 litro de lactofenol preparado con 200 ml de fenol, 200 ml de ácido láctico, 400 ml de glicerina y 200 ml de agua) durante una o dos horas antes de evaluar las semillas.
6. Evalúe el patrón de tinción de las semillas bajo un microscopio binocular de baja potencia; el color de los tejidos viables será rojo intenso. Los tonos rosado y rojo muy oscuro indican tejido muerto.
7. Clasifique las semillas en tres categorías según el patrón de tinción:
 - semillas totalmente teñidas que son viables;
 - semillas totalmente libres de coloración que son no viables; y
 - semillas parcialmente teñidas que producirán plántulas normales o anormales, dependiendo de la intensidad y patrón de la tinción (para mayor información, ver ISTA 2005).

Cuadro 5.3. Concentración, temperaturas y período de tinción con solución de tetrazolio (para cultivos del Anexo I del Tratado Internacional de RFGAA)

Cultivo	Especie	Acondicionamiento previo	Tinción
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Imbibir o remojar, 18h	0.5%, 3h, 30°C
Arveja o guisante	<i>Pisum sativum</i>	Imbibir 18–24h, luego remojar, 2–3h	0.5–1%, 6–24h, 30°C
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>	Imbibir o remojar, 18h	0.5–1%, 6–24h, 30°C
Brassica	<i>Brassica</i> spp.	Imbibir o remojar, 16–18h	0.5–1%, 3–6h, 30°C
Caupí	<i>Vigna unguiculata</i>	Remojar, 22h	0.5–1%, 16–24h, 30°C
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	Imbibir o remojar, 6–18h	0.5%, 3h, 30°C
Centeno	<i>Secale cereale</i>	Imbibir o remojar, 6–18h	0.5%, 2–3h, 30°C
Frijoles	<i>Phaseolus</i> spp.	Imbibir 18–24h, luego remojar, 2–3h	0.5–1%, 6–24h, 30°C
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	Imbibir o remojar, 18h	1%, 6–24h, 30°C
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Imbibir o remojar, 18h	0.5–1%, 3–6, 30°C
Haba	<i>Vicia faba</i>	Remojar, 22h	0.5–1%, 16–24h, 30°C
Lenteja	<i>Lens culinaris</i>	Imbibir, 18h, luego remojar, 2–3h	1%, 6–24h, 30°C
Maíz	<i>Zea mays</i>	Imbibir o remojar, 18h	0.5–1%, 2–6h, 30°C
Millo africano	<i>Eleusine corocana</i>	Remojar, 18h, 5°C	0.5%, 3h, 30°C
Millo de perla	<i>Pennisetum glaucum</i>	Imbibir o remojar, 6–18h	0.5–1%, 6–24h, 30°C
Remolacha azucarera	<i>Beta vulgaris</i>	Imbibir o remojar, 16–18h	1%, 24–48h, 30°C
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	Imbibir, 16h, 30°C	0.5–1%, 0.5–1h, 40°C
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Imbibir o remojar, 6–18h	0.5%, 2–4h, 30°C
Triticale	<i>Triticosecale</i>	Imbibir o remojar, 6–18h	0.5%, 2–4h, 30°C

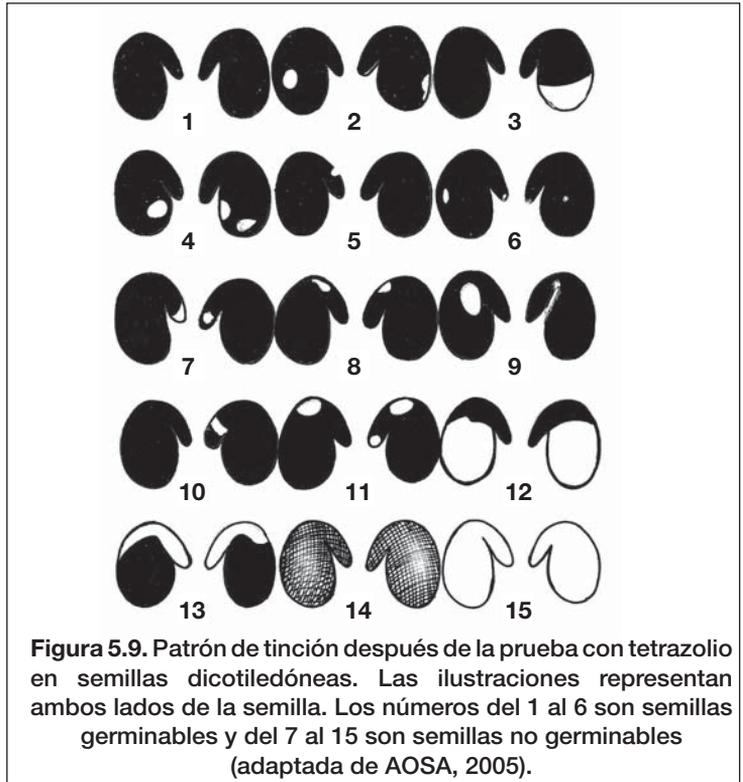
Las Figuras 5.9 y 5.10 muestran los patrones de tinción de tetrazolio en semillas dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente.

Documentación

Para el manejo eficiente de las colecciones de germoplasma es crucial documentar los datos de viabilidad ya que esto permite al personal del banco tomar decisiones informadas para la regeneración oportuna del material (ver Capítulo 8). Entre los descriptores sugeridos para documentar información de las accesiones sobre pruebas de viabilidad (germinación) se encuentran los siguientes:

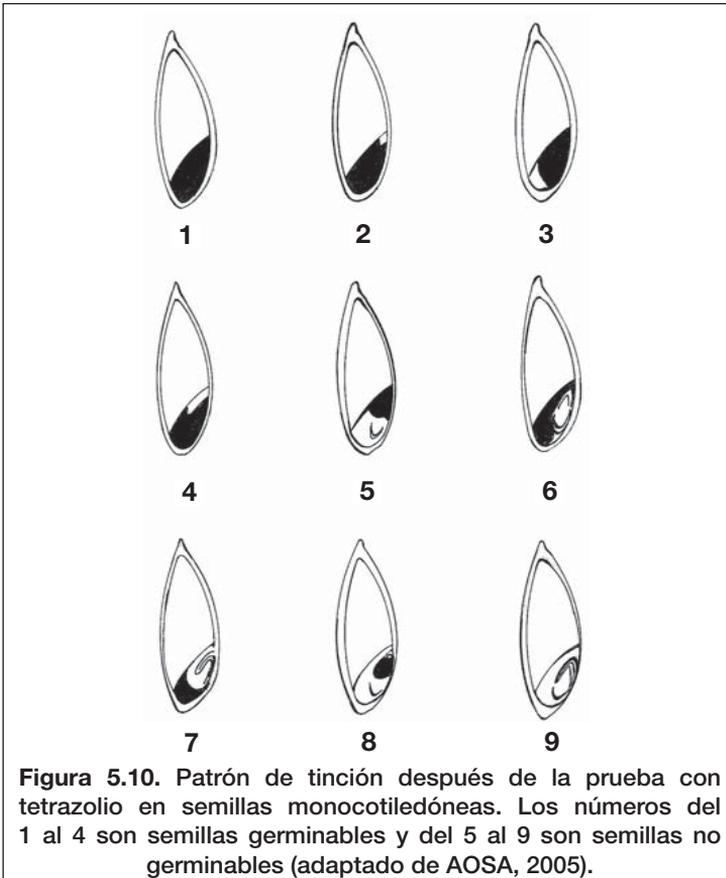
- Número de semillas evaluadas por repetición
- Número de repeticiones
- Método para probar la germinación
- Fecha de la prueba de germinación
- Duración de la prueba (o días de los conteos inicial y final)
- Número de semillas germinadas en el primer conteo
- Semillas duras o dormantes en el primer conteo (%)
- Tratamientos especiales para interrumpir la dormancia (si se aplicaron)

- Germinación final (% de plántulas normales)
- Germinación anormal (%)
- Semillas muertas (%)
- Niveles de tolerancia para precisión estadística



Lectura complementaria

- Association of Official Seed Analysts. 2005. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, USA. Sitio en internet: <http://www.aosaseed.com/>.
- Baskin, C. C. y Baskin, J. M. 1998. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, USA.
- Ellis, R. H., Hong, T.D. y Roberts, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Vol. 1: Principles and methodology. Handbooks for Genebanks No. 2. IBPGR, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=433.
- FAO/IPGRI, 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO e IPGRI, Roma, Italia. Disponible en http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.



ISTA. 2003. ISTA Handbook for Seedling Evaluation. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Suiza. Sitio en internet: <http://www.seedtest.org>.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edición 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.

Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W. y Probert, J.R. (eds.). 2003. Seed conservation: Turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.

5.2 Pruebas de sanidad de las semillas

¿Qué significa sanidad de las semillas?

La sanidad de las semillas se refiere al estado de enfermedad de una muestra de semillas y a la presencia o ausencia de organismos y plagas que causan enfermedades.

¿Qué es una prueba de sanidad de semillas?

Las pruebas de sanidad determinan el estado de una muestra, de un lote de muestras o de una accesión con respecto a enfermedades que afecten ese cultivo o especie silvestre.

¿Por qué es importante determinar la sanidad de las semillas?

Con frecuencia, los cultivos se infectan con una variedad de patógenos comunes transmitidos a través de las semillas, que pueden no ser visibles o reconocidos con facilidad durante la colecta. Los inóculos transmitidos en la semilla reducen la longevidad en almacenamiento y ocasionan germinación o establecimiento en campo deficientes. Los inóculos transmitidos en la semilla también propician enfermedades en el campo, reduciendo el valor de los cultivos. El intercambio de semillas infectadas puede facilitar la dispersión de enfermedades y plagas de una región a otra. Los bancos de germoplasma deben verificar que las semillas destinadas a conservación estén libres de enfermedades y plagas transmitidas a través de las semillas.

Patógenos y plagas comunes transmitidos a través de las semillas

Existen cuatro tipos de organismos que se transmiten en las semillas y que afectan una amplia variedad de cultivos:

- Hongos
- Bacterias
- Virus
- Insectos

Los métodos para detectar patógenos varían según el organismo y el portador, y se requieren métodos específicos para identificar con exactitud la mayoría de patógenos.

Métodos para detectar plagas y patógenos

Estándar de sanidad de las semillas

Examine una muestra representativa de las semillas para verificar la presencia de patógenos utilizando uno o más de los siguientes métodos. Usualmente, se retira una muestra de 400 semillas y se divide en repeticiones de 100 semillas cada una para la evaluación. El tamaño de la muestra se puede disminuir si los lotes de semilla son pequeños. Si el porcentaje de las semillas infectadas es superior al 5%, el lote de semilla se puede considerar inapropiado para conservación.

Inspección visual

El método más sencillo para detectar enfermedades y plagas consiste en inspeccionar las semillas secas a simple vista o bajo un microscopio de baja potencia. Este método revela insectos, huevos, ácaros que se movilizan libremente, fructificación de hongos como esclerotia, agallas, bolas de tizón, masas bacterianas y desechos vegetales infectados. El examen de las semillas secas bajo luz ultravioleta o casi ultravioleta revela infecciones de ciertos hongos y bacterias a través de la emisión de fluorescencia.

Evaluación de las plántulas

Las semillas se deben sembrar en suelo esterilizado en una casa de malla. Las plántulas se deben observar inmediatamente después de la germinación y se debe tomar muestra y someter a prueba cualquier planta que muestre síntomas de posibles virus como moteado, enroscamiento o color amarillo en las hojas para verificar la presencia de virus (ver más adelante). Las plántulas infectadas por bacterias u hongos pueden morir y se deben examinar luego en un laboratorio, y las muestras se deben llevar a placas para identificación del patógeno en el laboratorio (ver más adelante).

Si se sospecha que hay infección pero no se ha observado ningún síntoma después de la aparición de la segunda hoja verdadera, puede ser necesario realizar pruebas serológicas para verificar la presencia de infección latente o asintomática por virus. La mayoría de los virus de las leguminosas mostrarán síntomas evidentes en la fase de plántula.

Técnica de lavado de las semillas

Esta técnica es útil para evaluar hongos contaminantes que se transmiten en la superficie de las semillas tales como el tizón, los tizoncillos, el moho, el mildew polvoso y la roya.

1. Coloque 2 g de la muestra de semillas en un tubo de ensayo, agregue 2 ml de agua estéril y mezcle bien de cinco a diez minutos.
2. Coloque en la centrifuga la solución sobrenadante a 200 rpm durante diez minutos y observe los sedimentos bajo un microscopio para verificar la presencia de estructuras de hongos.

Métodos de incubación

Los métodos de papel secante y del plato de agar son formas sencillas y económicas de detectar hongos transmitidos en las semillas que responden a la esporulación.

Prueba con papel secante

Las pruebas con papel secante son similares a las pruebas de germinación en tanto las semillas se colocan sobre capas humedecidas de papel absorbente y se incuban en condiciones que estimulen el crecimiento de hongos.

1. Forre la base de cajas petri esterilizadas con tres capas de papel absorbente humedecido con agua destilada.
2. Drene el exceso de agua y coloque manualmente, con ayuda de fórceps, 20-25 semillas.
3. Distribuya las semillas de forma uniforme para evitar que entren en contacto unas con otras.
4. Incube las semillas bajo luz casi ultravioleta en ciclos alternantes de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante siete días a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
5. Examine las cajas petri bajo un microscopio estereobinocular para verificar el desarrollo de hongos en las semillas.

El crecimiento abundante de plántulas puede dificultar la interpretación. Esto se puede solucionar agregando 2,4-D de sal sódica para proporcionar una solución humectante al 0.2%.

Método del plato de agar

Éste es el método más comúnmente utilizado para identificar hongos transmitidos en las semillas. Hongos diferentes e incluso cepas diferentes de los mismos hongos requieren medios diferentes de crecimiento y esporulación. Se podría requerir el uso de luz casi ultravioleta con una longitud de onda de 300-380 nm (también denominada luz negra). Cuando no se disponga de mezclas comerciales, se pueden preparar medios simples que incluyen una combinación de vegetales, carbohidratos o fuentes de azúcar y agar, combinando vegetales hervidos y macerados con agar. Los medios que se utilizan comúnmente son agar papa dextrosa/sucrosa y agar harina de avena.

1. Prepare el medio mezclando 1 g de polvo de agar papa dextrosa en 100 ml de agua destilada.
2. Esterilice la mezcla en una autoclave durante 15-20 minutos y enfríe hasta llegar a 50°C .
3. Para evitar contaminación, vierta la mezcla con cuidado dentro de cajas petri esterilizadas, levantando la tapa sólo lo necesario para verter el agar.
4. Deje enfriar y solidificar durante 20 minutos.
5. Desinfecte la superficie de las semillas calentándolas previamente durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (NaOCl) preparada diluyendo 20 partes de blanqueador doméstico (NaOCl al 5%) en 80 partes de agua.
6. Con la ayuda de fórceps, coloque más o menos diez semillas (dependiendo del tamaño) en la superficie del agar.
7. Incube las cajas petri a $20-25^\circ\text{C}$ durante cinco a ocho días.

8. Identifique los patógenos transmitidos en la semilla con base en las características de la colonia y de las esporas.

Algunas veces se desarrollan en el agar colonias de bacterias que inhiben el crecimiento de los hongos, dificultando la identificación. Esto se puede solucionar agregando un antibiótico como la estreptomycin (500 ppm) al medio de agar de la autoclave después de que se enfría a 50-55°C.

Método de la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés PCR)

La PCR es una técnica *in vitro* para amplificar una cantidad pequeña de una secuencia específica de nucleótidos, exponencialmente, en presencia de un patrón secuencial con dos cebadores oligonucleótidos que hibridan bandas opuestas y flanquean la región de interés en el ADN objetivo. La reacción es cíclica, e involucra la desnaturalización del patrón, el recocimiento de los cebadores y la extensión de los cebadores recocidos por la acción de la polimerasa del ADN hasta que se hacen suficientes copias para análisis posteriores. La PCR permite detectar cantidades muy pequeñas de un patógeno en una muestra en tanto amplifica las secuencias del patógeno a un nivel detectable. Por su rapidez y precisión, la PCR es especialmente útil para detectar enfermedades; sin embargo, es una técnica costosa. Se puede utilizar para detectar cualquier organismo que tenga ADN empleando controles negativo y positivo para comparación. Una vez se conoce la secuencia del organismo, se pueden hacer sondas específicas para detectar cepas de patógenos.

También se pueden utilizar pruebas de hibridación de ácido nucleico (llamados secado sureño y norteño), en las cuales el ADN o el ARN se transfieren de un gel de electroforesis a una membrana y luego se detectan los ácidos nucleicos con una sonda marcada. Sin pasar por la etapa de la PCR, también se puede utilizar la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (conocida en inglés como NASH), en la que un patógeno marcado con su ADN hibrida directamente al ADN del patógeno inmovilizado en una membrana de nylon. Estas técnicas se perfeccionan de manera constante y hay disponibles nuevos procedimientos para la detección de patógenos específicos. Para mayor información, referirse a Albrechtsen (2005).

Método serológico y otros

Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (conocido en inglés como ELISA)

El ELISA es un método de diagnóstico que utiliza proteínas llamadas anticuerpos para detectar patógenos vegetales. Esta prueba se

basa en la capacidad de un anticuerpo para reconocer y unirse a un antígeno específico –una sustancia asociada con un patógeno vegetal. Los anticuerpos que se utilizan en los diagnósticos son proteínas altamente purificadas que se producen al inyectar un animal de sangre caliente (como un conejo) con un antígeno asociado a una enfermedad vegetal específica. El animal reacciona al antígeno y produce anticuerpos que reconocen y reaccionan únicamente con las proteínas asociadas con el agente causal de esa enfermedad vegetal. Los cambios de color en la superficie de la unidad indican una reacción positiva (presencia de enfermedad).

Existen muchos tipos diferentes de ELISA que pueden detectar la presencia de proteínas. Una descripción detallada de estos tipos está más allá del alcance de esta publicación, por lo cual sugerimos referirse a Albrechtsen (2005). Sin embargo, los procedimientos generales para dos de los métodos más comunes –placa recubierta de antígenos (ACP-ELISA) y el inmuno ensayo de manchas de tejido (TBIA)– se presentan en el Anexo II. Para más detalles, referirse a Lin *et al.* (1990).

Método de la planta indicadora

Este método es especialmente útil para detectar bacterias y virus. Los extractos de la semilla se preparan e inoculan en plantas indicadoras como el tabaco. Los patógenos se identifican con base en los síntomas que desarrollan. Las plantas indicadoras también se pueden utilizar para separar diferentes virus por especificidad de virus-hospedante.

Documentación

Entre los descriptores que se sugieren para documentar la información de las accesiones en las pruebas de sanidad de semillas, se encuentran los siguientes:

- Fuente del material para la prueba
- Tipo de material (hoja, tallo, raíz, semillas)
- Número de plantas muestreadas y evaluadas, por repetición
- Número de repeticiones
- Organismos para cuya detección se hace la prueba
- Método de prueba
- Fecha de la prueba
- Duración de la prueba, si es relevante
- Enfermedades identificadas
- Incidencia de cada enfermedad (%)

Lectura complementaria

Albrechtsen, S.E. 2005. Testing methods for seed-transmitted viruses: Principles and protocols. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.

ISTA. 2005a. International Rules for Seed Testing. Edición 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. Sitio en internet: www.seedtest.org.

Lin, N.S., Hsu, Y.H. y Hsu, H.T. 1990. Immunological detection of plant viruses and mycoplasma-like organisms by direct-tissue blotting in nitrocellulose membranes. *Phytopathology*, 80:824-828.

5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes

¿Qué son los transgenes?

Los transgenes son genes que se introducen en otro organismo o especie mediante técnicas de ADN recombinante. Las plantas transgénicas portan transgenes en sus genomas y los transmiten a su progenie a través de la reproducción normal.

¿Por qué se debe determinar la presencia de un gen o transgén?

Uno de los componentes más importantes en el manejo adecuado de un banco de germoplasma es la realización de pruebas para verificar la presencia de un gen o fenotipo. Esto es crítico para varios requerimientos fitosanitarios, pero también ha cobrado importancia para la detección de transgenes. Existen varias razones que explican la importancia de detectar la presencia de un gen o transgén en una accesión de un banco de germoplasma. Aunque la siguiente lista no es muy completa, entre éstas se incluyen:

- problemas de reglamentación, en especial relacionados con fitosanidad o bioseguridad, en donde el país de importación, y potencialmente el país de exportación, requieren informes sobre la presencia de dichos genes;
- situaciones en las cuales la presencia de dicho gen o transgén podría afectar los derechos de propiedad intelectual bien sea en el país en donde el banco de germoplasma se encuentra localizado o en el país a donde se enviará la accesión; y
- problemas sociales que requieren que se declare la identidad genética o que se limiten ciertos genes o transgenes.

¿Cuándo se debe detectar la presencia de un gen o transgén?

En general, no se considera recomendable incorporar a las colecciones de germoplasma cultivos que contienen transgenes. El riesgo de introducir transgenes de forma inadvertida se puede clasificar así:

- Probabilidad alta: cultivos típicamente exógamos con parientes sexualmente compatibles para los que se esté haciendo investigación extensiva en el campo, o que estén en proceso de distribución comercial.
- Probabilidad baja: cultivos típica y altamente autopolinizadores, multiplicados vegetativamente o cultivos para los cuales no se ha hecho ingeniería genética o ésta se encuentra en fase inicial.
- Probabilidad media: el resto de los cultivos.
- Atención inmediata: cultivos con transgenes que ya se encuentran distribuidos de manera comercial.
- Atención a corto plazo: trabajo experimental de campo, en progreso o que se espera se desarrolle en un período de uno a tres años.
- Atención a largo plazo: cultivos para los cuales no se ha hecho ningún trabajo significativo en el campo.

Los bancos de germoplasma deben tomar acciones para limitar el riesgo de introducir genes exóticos, incluyendo los transgenes, en sus colecciones *ex situ*. Las accesiones que no requieren pruebas incluyen:

- las especies en las cuales no ha ocurrido ningún evento transgénico (comercial o investigativo);
- las accesiones para las cuales no se encontraba ningún transgén comercial presente en el momento de la adquisición (como el maíz antes de 1996) o no había presencia de transgénicos cerca al sitio de colecta; y
- las accesiones que han presentado eventos transgénicos pero que se han manejado con buenas prácticas.

En 2004, el Genetic Resources Policy Committee (GRPC) y el Consejo Científico del GCIAl organizaron un taller técnico para explorar cómo manejar la introducción involuntaria de transgenes en las colecciones de germoplasma, con el fin de proporcionar orientación técnica a un proceso que permitiera a los bancos de los centros del GCIAl implementar procedimientos enfocados en prevenir la introgresión involuntaria de transgenes en sus colecciones. Después del taller, el GRPC preparó y adoptó unos principios orientadores. Para mayor información sobre este tema, consulte la página de internet de Bioversity International en la dirección www.bioversityinternational.org/About_Us/Guiding_Principles/index.asp. Estos principios orientadores también se trataron en la Tercera Sesión del Grupo de Trabajo

Técnico Intergubernamental sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, realizada en la FAO, Roma, entre el 26 y el 28 de octubre de 2005. Información adicional sobre esta reunión, se encuentra en la página de internet de la Comisión, en la dirección www.fao.org/waicent/FaolInfo/Agricult/AGP/AGPS/pg/ITWG3rd/docsp1.htm.

Procedimientos para evitar el flujo involuntario de genes de organismos modificados genéticamente (OMG)

Los transgenes y los genes convencionales están sujetos a los procesos biológicos de mutación, flujo de genes, introgresión, recombinación y selección natural. Por lo tanto, las buenas prácticas para evitar la introgresión de genes convencionales también sirven de base para evitar la introgresión de transgenes.

El germoplasma se encuentra en mayor riesgo de flujo de genes durante la regeneración (ver Capítulo 8) y el control del flujo de genes es esencial para asegurar la integridad genética. Para reducir el riesgo en los cultivos en donde los transgenes son comúnmente parte de los nuevos cultivares, se recomienda que la regeneración se haga en aislamiento de cualquier área en donde probablemente hay presencia de cultivos transgénicos.

La información sobre el estado transgénico de los cultivos es esencial para determinar qué medidas, si se requiere alguna, son necesarias para confirmar que el germoplasma está libre de transgenes. Se recomienda:

- publicar todos los resultados tan pronto se hayan confirmado;
- presentar todos los procedimientos e información de apoyo;
- informar a la autoridad competente del país de origen cuando se detecten transgenes; y
- mantener en los bancos de germoplasma una base de datos de los cultivos y de su estatus en lo referente a investigación transgénica, para cultivos modificados genéticamente distribuidos comercialmente y para cultivos en desarrollo experimental.

Una vez determine que una accesión no requiere pruebas, o si la prueba ha resultado negativa, siga los procedimientos para regenerar y mantener la integridad genética, que se aplican a todas las accesiones.

Procedimientos para detectar la presencia de OMG

Los dos métodos básicos para detectar la presencia de un gen o transgén son el método ELISA y la amplificación mediante la PCR. Ambos métodos ya se han descrito y son válidos, aunque cada uno

tiene sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, el ELISA detecta la presencia de un producto de un gen (proteína) y requiere un gen que se exprese. Existen en el mercado paquetes de prueba para la mayoría de eventos comerciales, que se pueden utilizar en el campo. Además, el método de la PCR puede detectar secuencias de genes que no se expresan en casi todos los tejidos, pero es más difícil de realizar y no resulta práctico en el campo. En la mayoría de los casos, un resultado positivo con un método se debe confirmar con un segundo método. Si los materiales se están analizando a nivel molecular para estudios de identificación genética o de diversidad, se puede hacer una prueba adicional a un costo mínimo para verificar la presencia de un transgén.

Los genes o transgenes que se deben utilizar en tales pruebas incluyen los principales productos que en la actualidad se comercializan para la especie. Éstos se pueden encontrar normalmente en internet y se indican para las pruebas provistas por los servicios comerciales (bien sea como paquetes de ELISA o servicios de PCR). Éstos cambiarán a medida que se introduzcan nuevos productos transgénicos al mercado o que los productos se vuelvan obsoletos y se eliminen, aunque la necesidad de realizar pruebas pueda continuar por algún tiempo. El número de semillas en cualquier accesión puede limitar el nivel de detección. Mayor información y orientación técnica sobre el muestreo y detección de OMG se encuentra en español en http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/l_348/l_34820041124es00180026.pdf (vínculo válido a octubre 18 de 2007).

También se encuentra disponible una lista actualizada de métodos validados en <http://biotech.jrc.it>. (vínculo válido a octubre 18 de 2007).

Documentación

Los descriptores que se recomiendan para documentar la información a nivel de accesión sobre la presencia de transgenes incluyen los siguientes:

- Fuente del material para la prueba
- Tipo de material (hoja, plántula, semilla)
- Número de plantas muestreadas y evaluadas, por repetición
- Número de repeticiones
- Transgenes evaluados
- Método de prueba
- Fecha de la prueba
- Duración de la prueba, si corresponde
- Transgenes identificados
- Incidencia de cada transgén (%)

1. **Introducción**
2. **Adquisición y registro del germoplasma**
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. **Limpieza de las semillas**
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**

6. EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO DE LAS SEMILLAS

6.1 Empaque de las semillas

¿Qué es el empaque de las semillas?

El empaque consiste en colocar una muestra de semillas, contada o pesada, en un recipiente, que luego se cierra herméticamente para almacenamiento posterior (ver Diagrama de Flujo 6.1).

¿Por qué se empacan las semillas?

Las semillas se empacan para:

- evitar que absorban agua de la atmósfera después del secado;
- mantener las accesiones separadas y evitar que se mezclen; y
- prevenir la contaminación de las muestras con insectos y enfermedades.

¿Cuándo se deben empacar las semillas?

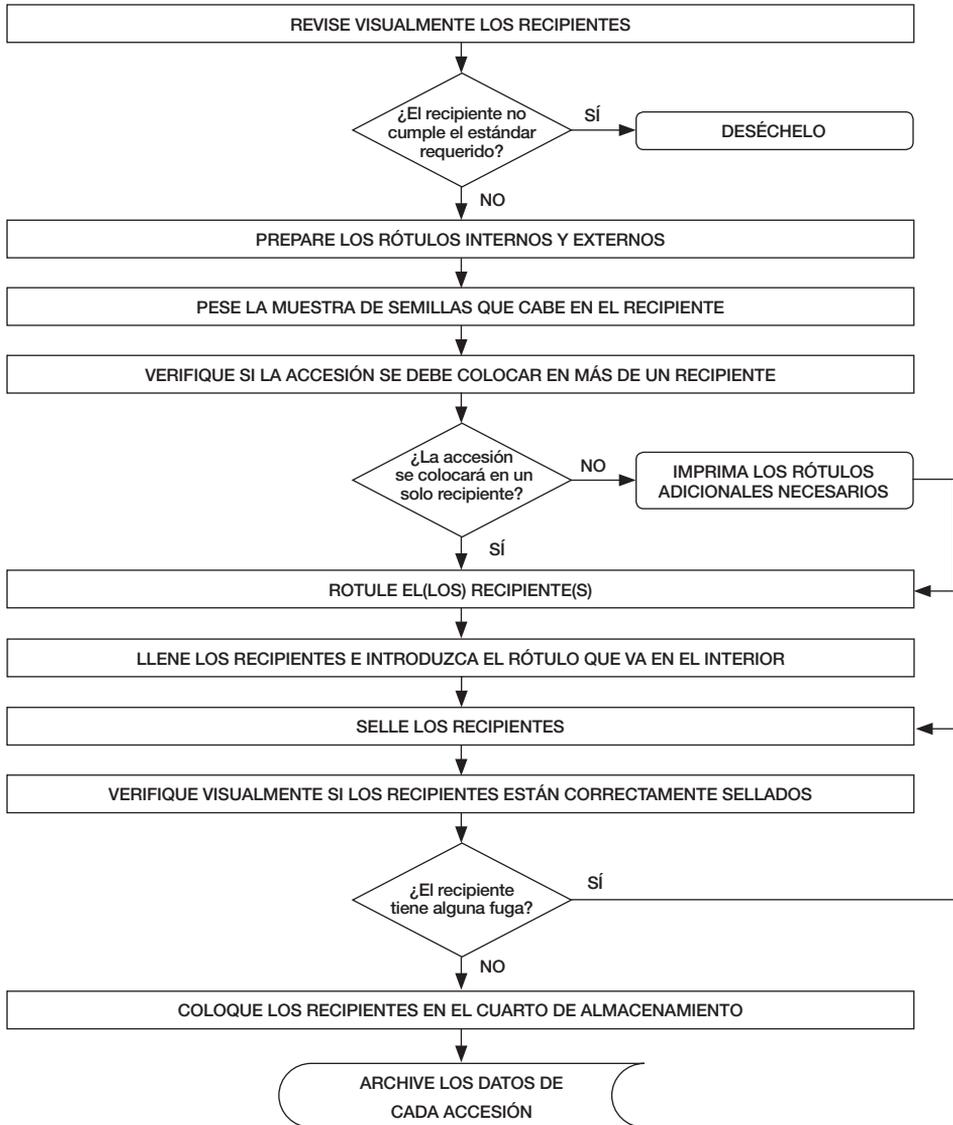
El momento más oportuno para empacar las semillas es inmediatamente después de haber determinado que el contenido de humedad está dentro de los límites requeridos para un almacenamiento seguro. Las semillas secas reabsorberán la humedad del aire del ambiente que tenga más humedad; por lo tanto, hay que empacar las semillas en recipientes a prueba de agua y sellarlos herméticamente sin demora después de retirarlos del cuarto o cámara de secado.

Tipos de recipiente

Para el empaque se pueden utilizar recipientes de diferentes tipos; la selección depende de las condiciones de almacenamiento y de la especie. Es importante que el material de empaque sea totalmente impermeable al agua y adecuado para uso a largo plazo. Los recipientes comúnmente utilizados son los frascos de vidrio, las latas de aluminio, las bolsas de aluminio laminado y los recipientes de plástico.

Cada tipo de recipiente tiene sus ventajas y desventajas. Los frascos de vidrio son buenos, pero se pueden romper fácilmente. Las latas de

Diagrama de Flujo 6.1. Empaque de las semillas





aluminio son difíciles de resellar una vez se han abierto. Las bolsas de aluminio laminado se pueden resellar y ocupan menos espacio que otros recipientes, pero las semillas con proyecciones filosas las pueden perforar y la humedad se puede filtrar al interior. Los recipientes de plástico y las latas de aluminio con tapa son resistentes a la humedad, pero no son a prueba de humedad a menos que tengan un sello de caucho bien apretado. Éstos se deben utilizar con precaución si la humedad relativa del cuarto de almacenamiento no está controlada.

Evaluación de la calidad de los recipientes

La calidad y capacidad de sellado de los recipientes se puede evaluar así:

1. Llene los recipientes con gel de sílice autoindicador regenerado y séllelo de la misma forma en que lo haría si fuera a almacenar las semillas.
2. Con ayuda de una balanza analítica, determine con precisión el peso de los recipientes.
3. Ponga los recipientes en un desecador, por encima del agua (pero sin tocarla), durante aproximadamente una semana.
4. Retire los recipientes del desecador y deje que la superficie se seque.
5. Pese los recipientes, registre el cambio en el peso y examine el color del gel de sílice.
 - Si el peso de los recipientes permanece constante, entonces son a prueba de humedad y el sello es bueno.
 - Si el peso de los recipientes aumenta y el gel de sílice se ha vuelto rosado o azul pálido, entonces son de mala calidad o el sello tiene fugas de humedad.
6. Ajuste el sello y repita la prueba para confirmar la calidad de los recipientes.

La calidad de un recipiente también se puede evaluar llenándolo con agua y poniéndolo sobre el gel de sílice en un desecador o en un horno ventilado a 40°C durante una a dos semanas. Un cambio en el peso del recipiente indicará que el recipiente es de mala calidad o que hay un escape en el sello.

¿Cuántas semillas se deben empacar?

El número de semillas que se debe empacar para almacenamiento dependerá de la especie que se esté conservando y de la frecuencia con que se retirarán las semillas para monitoreo, distribución o regeneración. De acuerdo con las Normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGRI (1994), 3000 semillas son un número aceptable para representar materiales que muestran poca variación morfológica (accesiones genéticamente homogéneas)

Las bolsas de aluminio laminado son los recipientes que más comúnmente se utilizan en los bancos de germoplasma ya que ocupan poco espacio y son fáciles de resellar. Las bolsas de aluminio deben tener las siguientes especificaciones:

- una capa externa de Melinex de 17 g m⁻², barniz de 4 g m⁻²;
- una capa intermedia de papel de aluminio de 33 g m⁻² (12 μm), laca de 4 g m⁻²; y
- una capa interna de polietileno de 63 g m⁻².

aunque se prefieren 4000 por accesión. Para los materiales que muestran gran variación morfológica (accesiones heterogéneas genéticamente), deben mantenerse por lo menos 4000 semillas por accesión aunque preferiblemente 12,000.

En los bancos de germoplasma es más fácil trabajar con unidades de peso, pero el número de semillas se puede convertir fácilmente a partir del peso si se conoce el peso de 100 semillas o de 1000 semillas. Por ejemplo, a continuación se describe cómo determinar el número de semillas de una muestra cuyo peso de 100 semillas se conoce:

$$\text{Número de semillas en la muestra} = \frac{\text{Peso de la muestra (g)} \times 100}{\text{Peso de 100 semillas (g)}}$$

Ejemplo:

Peso de la muestra = 275 g

Peso de 100 semillas = 12.5 g

$$\text{Número total de semillas en la muestra} = \frac{275 \times 100}{12.5} = 2200$$

¿Cómo se deben empacar las semillas?

El proceso de empaque se realiza mejor en un cuarto con aire acondicionado y humedad relativa controlada. Después de sacar las semillas del cuarto de secado, hay que tener cuidado de exponerlas al aire durante el menor tiempo posible para evitar que reabsorban agua.

1. Escoja el tipo de recipiente más adecuado para almacenar las semillas. Puede utilizar diferentes tipos dependiendo del tamaño y forma de las semillas, y del objetivo de conservación (colección base o activa —ver sección 6.2).
2. Prepare y rotule los recipientes para cada accesión; muchos bancos de germoplasma utilizan ahora rótulos y códigos de barras¹¹ autoadhesivos, generados por computador. El código de barras garantiza que la información sea exacta y que no

¹¹ El código de barras es un sistema computarizado de codificación, que utiliza un patrón impreso de barras de diferente grosor, y permite identificar las accesiones de manera única. Un código de barras se lee escaneando el patrón impreso y decodificándolo en un programa de computador. Los datos que contiene un código de barras pueden variar desde algo tan simple como un número de accesión hasta detalles de inventario y de pasaporte más elaborados. El código de barras es de gran beneficio para los bancos de germoplasma puesto que capta la información de manera más rápida y exacta, minimiza los errores y facilita el manejo del inventario.

se cometan errores durante la transcripción. Prepare un rótulo para ponerlo dentro del recipiente con las semillas. Los rótulos deben contener la siguiente información:

- Número de la accesión
 - Género y especie
 - Número del recipiente
 - Peso de las semillas
 - Fecha de almacenamiento
3. Pese cada recipiente rotulado antes de llenarlo
 4. Llene los recipientes con las semillas y péselos de nuevo. Calcule el peso real de las semillas.
 5. Agregue el rótulo y selle el recipiente inmediatamente para proteger las semillas en caso de que el ambiente tenga una humedad relativa alta.
 6. Verifique cada recipiente después de sellarlo, mediante una inspección visual, para asegurarse de que no haya fugas.
 7. Cualquier recipiente que se encuentre por debajo del estándar de calidad se debe reemplazar inmediatamente.
 8. Traslade los recipientes al cuarto de almacenamiento.
 9. Ingrese los datos relevantes acerca de cada accesión en el archivo de datos. El Cuadro 6.1. muestra un modelo para registrar el peso del recipiente y las semillas.

Cuadro 6.1. Modelo de cuadro para registrar información sobre el empaque de las semillas

Fecha de empaque:			Nombre de la persona responsable:		
Número de accesión	Tipo de recipiente	Número de recipiente	Peso del recipiente vacío	Peso del recipiente con las semillas	Peso de las semillas
		1			
		2			
		3			

Muestras de referencia (herbarios de semillas)

Los herbarios de semillas son útiles para verificar los atributos físicos de las semillas sin tener que abrir los recipientes sellados. Empaque una pequeña muestra (de cinco a diez semillas o vainas de leguminosas, o 5 g de cereales) de las semillas originales en un sobre de plástico transparente que pueda volver a sellar o en un frasco de vidrio, para verificar la integridad genética después de la regeneración y durante el traslado de las semillas. Las muestras se pueden almacenar en un estante con entrepaños no muy espaciados. Asegúrese de que las semillas de la muestra original no se acaben de modo que puedan servir como referencia para identificación.

Algunas precauciones

- No mezcle las semillas cosechadas en diferentes estaciones ya que la calidad y longevidad de las muestras puede variar. Asigne números a cada lote de semillas (indicando la época de cosecha, el número del campo o del sitio y el número de generación) para diferenciarlos.
- Mantenga las semillas de diferentes estaciones en recipientes separados, o dentro del mismo recipiente si se pueden acomodar en él, separadas con una tela o empacadas en bolsas plásticas resellables.
- Recuerde que cuando saca los recipientes de la cámara de almacenamiento en frío o de los refrigeradores, los debe dejar tomar temperatura ambiente antes de abrirlos para evitar que el agua se condense en la superficie de las semillas. Esto puede tomar varias horas, especialmente en el caso de las semillas grandes y de aquellas que han estado a temperaturas bajo cero.
- Los rótulos autoadhesivos y la tinta para rotular deben ser resistentes al agua y muy durables.

Para garantizar que las semillas se conserven a largo plazo y haya disponibilidad sostenida de semilla de alta calidad para la utilización, las semillas se deben empacar en recipientes a prueba de humedad y almacenar en condiciones ambientales controladas, como se describe en la siguiente sección.

Lectura complementaria

FAO/IPGRI, 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO e IPGRI, Roma. Disponible en la dirección http://www.biodiversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.

6.2 Almacenamiento de las semillas

¿Qué es el almacenamiento de las semillas?

El almacenamiento es la preservación de las semillas en condiciones ambientales controladas para que mantengan la viabilidad durante períodos prolongados.

La longevidad de las semillas depende de su calidad inicial, del contenido de humedad y de la temperatura durante el almacenamiento. En general, un contenido de humedad bajo y una temperatura baja reducen la pérdida de viabilidad en las semillas. Para prolongar la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento, se pueden emplear diferentes combinaciones de contenido de humedad y temperatura.

Tipos de almacenamiento

Existen dos modalidades de conservación de los recursos genéticos almacenados en forma de semilla: las *colecciones base*, que conservan las muestras de semilla a largo plazo para seguridad, y las *colecciones activas*, que mantienen muestras de semilla para el uso inmediato. Estas colecciones varían en cuanto a temperatura, humedad relativa, contenido de humedad de las semillas, recipientes y condiciones de distribución del germoplasma.

Colecciones base

Una colección base es un conjunto de accesiones únicas, cuya integridad genética es lo más cercana posible a la muestra original. Las semillas de una colección base por lo general no se distribuyen directamente a los usuarios; sólo se utilizan para regenerar colecciones activas (FAO/IPGRI, 1994). Las colecciones base se almacenan durante períodos prolongados a temperaturas bajo 0°C –generalmente entre -18 y -20°C– para mantener la viabilidad de las semillas.

Engels y Visser (2002) introdujeron el término ‘muestra más original’ (MMO) para calificar las muestras de una colección base. Una MMO se compone de semillas que se han sometido al menor número de regeneraciones desde que el banco de germoplasma adquirió el material; pueden ser submuestras del lote original o una muestra de semillas del primer ciclo de regeneración, si el lote original requirió regeneración antes del almacenamiento.

Colecciones activas

Las colecciones activas se componen de accesiones que están disponibles para distribución inmediata. Estas accesiones son de acceso frecuente y se mantienen en condiciones que garanticen una viabilidad de por lo menos 65% durante 10-20 años (FAO/IPGRI, 1994). El Cuadro 6.2 muestra las combinaciones de temperatura y contenido de humedad para el almacenamiento de colecciones activas que pueden garantizar una viabilidad superior a 65% durante 10-20 años. Para reducir el costo de refrigeración, resulta más práctico utilizar un contenido de humedad más bajo y almacenar a una temperatura más alta. Sin embargo, cuando no es posible secar hasta un contenido de humedad bajo, se puede almacenar a un nivel más alto de humedad pero aplicando una temperatura más baja.

Cuadro 6.2. Temperatura de almacenamiento y contenido de humedad sugeridos para colecciones activas (fuente: Bioversity, sin publicar)

Temperatura (°C)	Características de almacenamiento	
	Deficientes (e.g. cebolla)	Buenas (e.g. cebada)
	Contenido de humedad (% en base fresca)	
25	3	7
20	3.5	7.5
15	5.0	8.0
10	6.0	9.0
5	7.0	10.0
0	8.0	11.0

Organización de las colecciones

El principio fundamental para mantener una colección base o una MMO es conservar aparte por lo menos algo de semilla de la muestra original en las mejores condiciones posibles para garantizar supervivencia segura a largo plazo. Esto se puede lograr guardando las semillas para distribución físicamente aparte de la muestra original (en colecciones activas), aunque esto no es obligatorio. Un banco de germoplasma puede optar por mantener una muestra de cada accesión tanto para conservación (en una colección base) como para utilización (en una colección activa) siempre y cuando el costo de mantenimiento no sea demasiado alto. Si el banco de germoplasma mantiene tanto colecciones base como activas, en términos de costos es más efectivo almacenar en la colección activa sólo aquellas accesiones que los mejoradores y otros usuarios están utilizando (para información adicional, ver Engels y Visser, 2003).

Tipos de instalaciones para el almacenamiento

Las dos opciones de que comúnmente se dispone para el almacenamiento de las semillas son los *congeladores* y los *cuartos fríos*. La selección depende del número de accesiones que se vayan a almacenar, del tamaño de las semillas y de las temperaturas de almacenamiento que se escojan. Cuando las colecciones son pequeñas y se requieren temperaturas bajo cero, una opción de bajo costo para el almacenamiento de las semillas son los congeladores, horizontales o verticales.

¿Cómo se organiza el espacio de almacenamiento?

La organización del espacio de almacenamiento depende del tipo

de instalación para almacenamiento y del tipo de recipiente que se utilicen en el banco de germoplasma. Teniendo en cuenta el costo de mantener el almacenamiento en frío, hay que optimizar el espacio de manera que se almacene el máximo número de accesiones de semilla.

Almacenamiento en cuarto frío

Si el banco de germoplasma tiene un cuarto frío con acceso para desplazarse dentro de él, lo mejor es usar estantes móviles para maximizar el espacio de almacenamiento. Cada estante está dividido en varios entrepaños. La distancia entre cada entrepaño dependerá del tamaño de los recipientes. Los recipientes pequeños o las bolsas de aluminio se pueden colocar en cajas o en bandejas, que se ubican luego en los entrepaños de los estantes.

Un sistema de codificación puede ayudar al personal del banco de germoplasma a ubicar las accesiones para recuperar las muestras; la codificación se puede ingresar en una base de datos o en un sistema de inventario. Por ejemplo, el código 'A010201' para indicar la siguiente ubicación:

- Número del cuarto (si se está utilizando más de un cuarto de almacenamiento): A
- Número de estante: 01
- Número del entrepaño: 02
- Número de la caja o bandeja: 01

Congeladores horizontales o verticales

Para almacenar las accesiones en bancos de germoplasma que utilizan congeladores horizontales o verticales, se pueden utilizar recipientes que quepan en los estantes o cajas en las que se puedan guardar recipientes pequeños. Al igual que en el almacenamiento en frío, se puede establecer un sistema de codificación que ayude a ubicar las accesiones, que incluya el número del congelador, el número del entrepaño y el número de la caja.

Almacenamiento de muestras de semillas

Paso 1: Verifique el número de semillas de cada accesión

1. Pese las semillas de cada accesión. Convierta el peso de las semillas a números utilizando el peso de 100 semillas o el de 1000 semillas, como se describió en la sección anterior.
2. Verifique si la muestra tiene más del número requerido de semillas para una muestra genéticamente homogénea (3000-4000 semillas) o genéticamente heterogénea (4000-12,000 semillas).
3. Si la muestra contiene menos de la cantidad requerida,

proceda a regenerar o almacene en el banco de germoplasma temporalmente y regenere en la primera oportunidad posible (ver Capítulo 8).

Paso 2: Defina una ubicación para el almacenamiento

El próximo paso es determinar la ubicación dentro del cuarto de almacenamiento o congelador en donde se almacenará la accesión.

1. Busque en el archivo de inventario el siguiente espacio disponible para almacenar una accesión.
2. Asigne el espacio en donde se ubicará la accesión. Si la accesión se almacena en más de un recipiente, manténgalos juntos.

Paso 3: Coloque las semillas en el sitio de almacenamiento

1. Haga una lista de los espacios asignados a cada accesión.
2. Coloque los recipientes en el cuarto de almacenamiento o en el congelador en la ubicación que les corresponde.

Paso 4: Ingrese los datos en la base de datos

1. Ingrese en el archivo de inventario los datos sobre la ubicación de las accesiones en el sitio de almacenamiento, la fecha en que se almacenaron y el número de recipientes.

Duplicados de seguridad (colecciones de seguridad)

Un duplicado de seguridad es una submuestra genéticamente idéntica de la accesión que está almacenada en otro sitio (preferiblemente fuera del país) a manera de seguro contra la pérdida del material. El duplicado de seguridad incluye tanto el material como la información que se relaciona con él. Las muestras para un duplicado de seguridad se preparan de la misma manera que las de una colección base:

- Las semillas se secan a un contenido de humedad de $5\pm 2\%$ dependiendo de la especie.
- Las semillas deben estar limpias y sanas.
- El porcentaje de germinación debe ser superior a 85%.
- Las semillas deben estar en recipientes adecuados y herméticamente sellados.

El tamaño de la muestra puede ser más pequeño, pero suficiente para permitir realizar por lo menos tres regeneraciones (con el factor de seguridad incluido). Para ganar tiempo, las muestras para los duplicados de seguridad se deben procesar simultáneamente a las de la colección base.

Para conservar el duplicado de una colección, el banco de germoplasma debe hacer un convenio con el instituto que lo va a

mantener. Aunque lo ideal para garantizar la supervivencia a largo plazo es que los duplicados se guarden en las mismas condiciones de las colecciones base, hay varias modalidades en las que una institución puede mantener duplicados de otros bancos:

- *En caja negra:* la única responsabilidad del banco de germoplasma que recibe un duplicado en caja negra es mantenerlo sin manipularlo. El instituto receptor no tiene responsabilidades con las muestras más allá de proporcionarles las mejores condiciones de almacenamiento posibles. Establecer un esquema de monitoreo de la viabilidad y regenerar la colección cuando sea necesario son responsabilidad del instituto que envía la muestra. Si las condiciones de almacenamiento del duplicado son las mismas que las de la colección base, la pérdida de viabilidad se puede pronosticar a partir de los resultados del monitoreo de la colección base. Después de la regeneración de las muestras de la colección base, el que envía el duplicado de seguridad lo reemplaza. Para enviar duplicados para conservación en caja negra fuera del país, se requiere un permiso especial para exportar las semillas sin certificado fitosanitario del país de origen. De manera similar, la autoridad fitosanitaria de país de destino debe permitir al receptor importar las semillas sin la inspección rutinaria de cuarentena.
- *Como parte de la colección base del receptor:* el duplicado se mantiene en condiciones adecuadas para almacenamiento a largo plazo y se incorpora a la colección base del receptor.
- *Como parte de la colección activa del receptor:* cuando el duplicado se incorpora a la colección activa del receptor y, en consecuencia, está sujeto a regeneración, multiplicación y distribución por parte del receptor.

Colección de archivo

Los bancos de germoplasma pueden decidir almacenar muestras de germoplasma que no necesitan estar representadas en una colección base o distribuirse, como una ‘colección de archivo’. Estas muestras se mantienen en condiciones óptimas para supervivencia a largo plazo, pero sin inversión adicional en monitoreo y regeneración. El germoplasma de una colección de archivo puede incluir:

- líneas experimentales con derechos de propiedad intelectual –las muestras se pueden guardar como colecciones en caja negra y devolverse a solicitud al tenedor del derecho de propiedad intelectual;
- germoplasma que se encuentra fuera del mandato del banco de germoplasma –las muestras se pueden almacenar temporalmente hasta que se identifique otro banco con un mandato relevante para ellas;
- accesiones que, después de haber racionalizado una colección base, se identifican como duplicados; y

- accesiones que, después de que se ha revaluado el mandato del banco, se determina que ya no se necesitan en la colección, o material que se ha excluido por falta de fondos.

Documentación

La documentación adecuada de los procedimientos de empaque y almacenamiento de las semillas permite acceder rápidamente a muestras nuevas, responder a inquietudes sobre el germoplasma conservado, y monitorear la calidad y la cantidad del material almacenado para regenerar y distribuir. Los descriptores que se sugieren incluyen los siguientes:

- Condiciones de almacenamiento/tipo de colección
- Tipo de recipiente, si el banco de germoplasma utiliza una diversidad de éstos
- Número de recipientes
- Cantidad total de semillas almacenadas (por peso o número)
- Fecha de almacenamiento
- Ubicación en el banco de germoplasma
- Cantidad mínima de semilla permitida (unidad base) para distribución o regeneración
- Ubicación del duplicado de seguridad, si existe.

Lectura complementaria

Cromarty A.S., Ellis, R.H. y Roberts, E.H. 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation. IBPGR, Roma. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=281.

Engels, J.M. y Visser, L. (eds.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbook for Genebanks No. 6. IPGRI, Roma. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=899.

FAO/IPGRI, 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO e IPGRI, Roma. Disponible en pdf en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.

Linington, S.H. 2003. The design of seed banks. Pp. 591-636 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.

7. Distribución

1. **Introducción**
2. **Adquisición y registro del germoplasma**
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. **Limpieza de las semillas**
4. **Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas**
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. **Determinación de la calidad de las semillas**
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. **Empaque y almacenamiento de las semillas**
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. **Distribución del germoplasma**
8. **Monitoreo y regeneración del germoplasma**
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 **Regeneración del germoplasma**

7. DISTRIBUCIÓN DEL GERMOPLASMA

¿Qué es la distribución de germoplasma?

La distribución de germoplasma es el suministro de muestras representativas de accesiones de semillas de un banco de germoplasma, en respuesta a solicitudes de los usuarios del germoplasma. En general, las semillas se distribuyen únicamente a partir de colecciones activas (ver Diagrama de Flujo 7.1).

¿Por qué se distribuye el germoplasma?

El propósito de conservar germoplasma en un banco es mejorar las variedades cultivadas a través del fitomejoramiento y la investigación, o restaurar la diversidad perdida en fincas y hábitats naturales, con el fin de satisfacer las necesidades de los agricultores y las comunidades. Esto contribuye directamente a mejorar la subsistencia de las personas de escasos recursos y a proteger el medio ambiente.

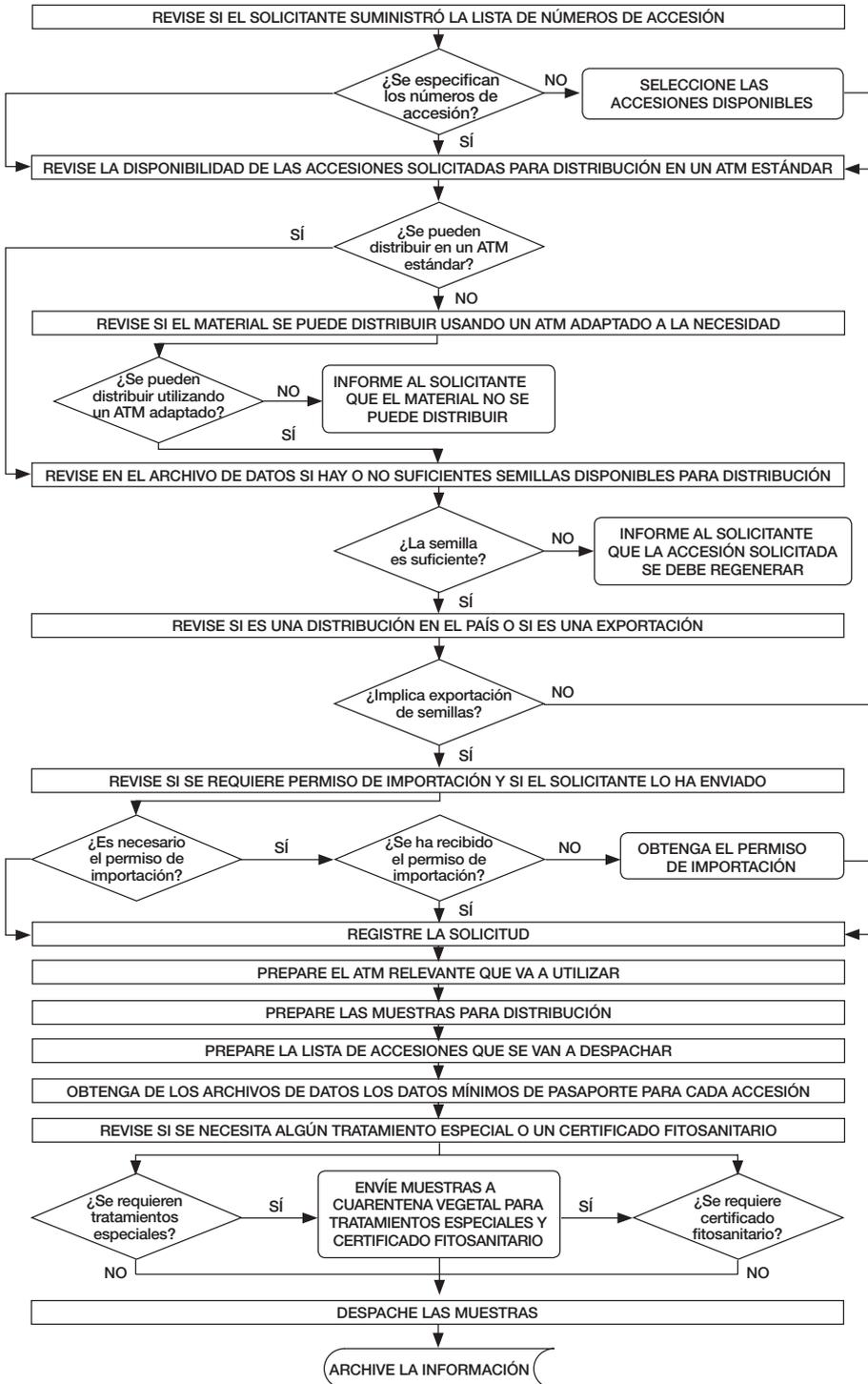
En el pasado, no se hizo suficiente énfasis en la distribución de germoplasma. Ahora, se reconoce ampliamente que la utilización debe guiar la conservación del germoplasma. Los bancos de germoplasma deben ser más proactivos en establecer vínculos con los usuarios del germoplasma, incluyendo los mejoradores, los investigadores, los agricultores y otros grupos.

¿Cómo se debe distribuir el germoplasma?

El germoplasma se debe distribuir de manera que llegue a su destino en buenas condiciones. Las condiciones ambientales durante el transporte pueden deteriorar la calidad de las semillas; por lo cual, éstas se deben empaquetar con cuidado y distribuir en sobres sellados resistentes a la humedad, para que estén protegidas durante el transporte (ver más adelante).

El ámbito y el grado de distribución varían para cada banco de germoplasma. El germoplasma se puede distribuir dentro o fuera del país, dependiendo del mandato del banco de germoplasma y de si su colección es nacional, regional o mundial.

Diagrama de Flujo 7.1. Distribución del germoplasma



Procedimientos para distribuir semillas dentro del país

Paso 1: Decida si la accesión se puede distribuir

- Revise la base de datos del inventario para verificar si la cantidad de semillas en el banco de germoplasma es suficiente para distribuir.
- Distribuya sólo si en almacenamiento queda un mínimo de cuatro a seis veces el número de semillas requerido para un ciclo de regeneración después de atender la solicitud. Se puede ser algo flexible con accesiones que se solicitan rara vez.
- Cuando la cantidad de semillas es inadecuada para la distribución, informe al solicitante que las accesiones no se pueden suministrar sino hasta después de que se hayan regenerado, y prepare las accesiones para regeneración.
- Revise los datos de pasaporte para determinar el estatus del material en cuanto a acceso y distribución de beneficios bajo el Tratado Internacional sobre RFGAA y otros acuerdos internacionales. Si existen restricciones sobre la distribución bajo el acuerdo de adquisición de germoplasma (AAG) con el donante (ver Anexo I), informe al solicitante sobre las restricciones.

Paso 2: Prepare la muestra para distribución

Si las semillas están disponibles para distribución:

1. Registre la solicitud y asígnele un número.
2. Prepare la lista de accesiones disponibles para distribución.
3. Revise los requerimientos para el acuerdo de transferencia de materiales (ATM); si el material no se puede distribuir bajo el ATM estándar, utilice un ATM adaptado a las accesiones seleccionadas (ver Anexo I para mayor información).
4. Prepare dos grupos de rótulos para las accesiones seleccionadas y adhiera uno de ellos a los sobres (preferiblemente de papel aluminio laminado) que se utilizarán para distribuir las semillas al solicitante.
5. Revise el archivo del inventario y anote la ubicación de los recipientes en el banco de germoplasma.
6. Traslade los recipientes del banco de germoplasma a un cuarto con deshumidificador la noche antes de atender el despacho para dejarlos que alcancen temperatura ambiente antes de abrirlos. Cuando retire las accesiones del banco, cerciórese de que las ha identificado correctamente.
7. Abra el recipiente y retire rápidamente la cantidad de semillas necesaria para los sobres marcados. Haga un muestreo al azar de modo que se suministre una buena representación de la accesión. Para atender una solicitud, se sugiere distribuir 50-100 semillas viables, dependiendo del sistema de reproducción de la especie (más para especies de polinización cruzada y menos para las especies de autopolinización).

8. Cierre el recipiente inmediatamente después de retirar las semillas que va a distribuir para evitar que absorban la humedad del ambiente.
9. Para mayor seguridad, puede colocar un segundo rótulo dentro de los sobres antes de sellar las bolsas.
10. Compare la lista de las accesiones que se retiraron del banco de germoplasma con los rótulos de los sobres.

Paso 3: Prepare la lista de información que acompañará las semillas

1. Imprima la lista final, incluyendo los detalles de pasaporte tales como número de accesión, identidad alterna, país fuente, ubicación y estatus biológico, al igual que los datos de caracterización utilizados para verificar las accesiones y cualquier información que el solicitante requiera.
2. Prepare una carta remisoría.



Las semillas son un germoplasma valioso y se deben empaquetar con cuidado para el despacho. El empaque debe garantizar la seguridad de las semillas y evitar que se contaminen con insectos o patógenos durante el transporte.

Paso 4: Despache las semillas

1. Empaque los sobres con las semillas, la carta remisoría, el ATM y la lista de semillas en una bolsa plástica y luego en un sobre resistente (si son pocas semillas), o en una caja de cartón (utilice material de relleno para evitar que las semillas se estropeen durante el transporte). Marque el sobre o caja con la dirección completa del solicitante. El ATM puede ir adherido a la parte exterior del sobre en casos en que el hecho de abrir el recipiente y usar las semillas indique que se está en acuerdo con los términos y condiciones de acceso.
2. Incluya un formato de respuesta para que el solicitante lo llene y lo devuelva al banco de germoplasma confirmando que recibió las muestras de semilla en buenas condiciones.
3. Envíe las bolsas con las semillas por el medio más rápido, como un servicio de aeromensajería para evitar demoras y deterioro de la calidad de las semillas durante el transporte. Si existe alguna preocupación de que los materiales se puedan perder durante el despacho, utilice un correo registrado o, si es posible, transpórtelos personalmente.
4. Registre los detalles del despacho en el archivo de los datos de distribución.
5. Actualice el inventario de semillas descontando el peso o el número de las semillas que se distribuyeron.



A los envíos de germoplasma infestados con plagas o sin la documentación apropiada se les negará la entrada o serán destruidos. El personal del banco de germoplasma debe ser consciente de las regulaciones fitosanitarias que rigen el movimiento transfronterizo de germoplasma.

Distribución de germoplasma fuera del país

Siga el mismo procedimiento para seleccionar las accesiones y para cumplir con el requerimiento del ATM que se describió en los pasos 1 y 2 del punto anterior. Para la distribución de germoplasma entre países, puede ser necesario cumplir con requerimientos adicionales

antes de proceder con los pasos 3 y 4. Éstos se relacionan con el cumplimiento de regulaciones fitosanitarias (ver más adelante) para evitar introducir plagas y enfermedades a otras regiones.

Cómo afectan las medidas fitosanitarias el traslado de las semillas

El traslado de cualquier semilla puede potencialmente esparcir una plaga¹². Esto ya ha ocurrido en muchos lugares del mundo con efectos devastadores. Reconociendo este peligro, los países han implementado medidas fitosanitarias para regular la entrada de plantas, partes de plantas y sus productos. Por lo tanto, es esencial cumplir con los requerimientos nacionales del país importador cuando se trasladan semillas a través de fronteras internacionales.

¿Qué son las medidas fitosanitarias?

Una medida fitosanitaria es cualquier legislación, regulación o procedimiento que busca prevenir la introducción o dispersión de plagas cuarentenarias, o limitar el impacto económico de las plagas reguladas que no son objeto de cuarentena. El país importador establece estas medidas siguiendo un análisis de riesgo de plagas, de acuerdo con estándares internacionales.

La documentación oficial que se requiere para exportar semillas incluye un *certificado fitosanitario* expedido por la institución nacional de protección fitosanitaria o por el instituto oficialmente autorizado del país exportador, certificando que el despacho cumple con las regulaciones fitosanitarias del país importador. Los certificados fitosanitarios contribuyen a asegurar que los materiales se encuentran libres de plagas vegetales perjudiciales después de haber sido sometidos en el país de origen a una inspección por parte de un miembro de la organización nacional de protección fitosanitaria de ese país. El país que expide el certificado normalmente cobra una tarifa por cada certificado.

Cuando se prepare para distribuir semillas, siga estas pautas:

- Verifique el destino final y los requerimientos fitosanitarios para importación más recientes del país importador (en muchos países, las regulaciones cambian con frecuencia, de manera que esto se debe hacer antes de cada despacho –ver también ‘cuarentena posterior al ingreso’ en el Capítulo 2).
- Asegúrese de que la organización nacional de protección fitosanitaria del país exportador suministre la documentación adecuada, como



La información fitosanitaria de muchos países se puede encontrar en la internet, en la página oficial de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria https://www.ippc.int/IPP/Es/default_es.jsp?language=es. Los puntos focales nacionales para la CIPF se deben contactar cuando haya que determinar los requerimientos fitosanitarios para importar semillas; o cuando se necesite un certificado fitosanitario para exportar semillas.

¹² La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) define como plagas todos los agentes bióticos perjudiciales y potencialmente perjudiciales, desde viroides hasta plantas arvenses.

un certificado fitosanitario oficial, que cumpla con los requerimientos del país importador.

- Infórmese sobre los procedimientos para obtener un certificado fitosanitario en el país de exportación.
- La orientación de las autoridades pertinentes en certificación le garantizará éxito en todas las etapas.

Procedimiento para exportar semillas

1. Prepare una lista de las accesiones que se requieren para atender la solicitud.
2. Retire las semillas del banco de germoplasma como se describe para la distribución dentro del país.
3. Solicite un certificado fitosanitario a la organización nacional de protección fitosanitaria o a la institución designada.
4. Envíe la solicitud a la autoridad fitosanitaria pertinente y organice los tratamientos e inspecciones necesarios para la expedición de un certificado fitosanitario.
5. Obtenga las declaraciones adicionales para los tratamientos especiales que requiera el país importador.
6. Cuando las muestras estén listas para despacho, prepare una carta remisoría y la lista final de accesiones junto con los datos de pasaporte, los datos de caracterización y otra información como se indica en el Paso 3 descrito anteriormente. Cualquier accesión que se encuentre detenida en cuarentena se debe eliminar de la lista final.
7. Despache las semillas al destinatario¹³ junto con el certificado fitosanitario, y las otras declaraciones requeridas, el ATM y la carta remisoría.
8. Antes de despachar las semillas, cumpla con cualquier requerimiento adicional como obtener un *permiso de importación* de plantas o un permiso de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES) para especies en peligro (ver Anexo I).
9. Registre los detalles del despacho en el archivo de datos de distribución y actualice el inventario de semillas descontando el peso o la cantidad de semillas que distribuyó.

Si, como medida sanitaria, se exigen tratamientos obligatorios, o si se requieren garantías, éstos debe proveerlos una autoridad gubernamental, como se solicita. Por ejemplo, el país importador puede solicitar la fumigación o la inmersión de las muestras en un insecticida o fungicida, o requerir un tratamiento con agua caliente. Los tratamientos deben ir detallados en el certificado fitosanitario junto con cualquier otra garantía que solicite el país importador. Si no se solicita ningún tratamiento, no se debe administrar

¹³ Las regulaciones fitosanitarias de algunos países estipulan que el envío se debe dirigir a las autoridades fitosanitarias y no al destinatario, y se debe hacer a través de puertos de entrada específicos.

ninguno ya que estos tratamientos pueden ocultar síntomas de patógenos transmitidos en las semillas e interferir con las pruebas de laboratorio. La administración de cualquier tratamiento previo al ingreso en contra de las especificaciones del país importador podría poner en serio peligro el despacho. Cuando se van a enviar muestras de germoplasma a más de un país, es necesario obtener un certificado fitosanitario para cada destino. Se deben obtener dos copias del certificado fitosanitario y el original debe acompañar el envío. Cualquier alteración o enmienda invalidará el certificado fitosanitario.

Como la siembra de cultivos transgénicos o cultivos modificados genéticamente está en expansión, hoy día muchos países requieren un certificado de una entidad independiente acreditada que confirme que el despacho se encuentra libre de OMG (ver también Anexo I).

Retroalimentación sobre la utilización del germoplasma

A intervalos semestrales, obtenga de los usuarios retroalimentación sobre la utilidad del germoplasma que les suministró. Esto le servirá para identificar deficiencias en el servicio y para informarse sobre cualquier característica nueva o fuente de resistencia que se identifique en el material.

Documentación

Es importante que los bancos conserven registros de los destinatarios del germoplasma, del número de muestras enviadas, de los detalles de la adquisición y del propósito para el cual se hacen las solicitudes, con el fin de mantener registros sobre el uso y evaluar el impacto del germoplasma distribuido. Se recomienda conservar la información en dos archivos con un campo que los vincule. Como campo de vínculo para los dos archivos, se puede asignar un 'número de referencia' mientras se registra una solicitud de semilla. Los descriptores de la distribución también se pueden organizar en dos archivos, así:

- un archivo maestro con los detalles del destinatario, el número de accesiones enviadas, etc.; y
- un archivo de los detalles de la adquisición con información sobre el material.

Para la distribución se sugieren los siguientes descriptores:

Archivo maestro

- Número de referencia de la distribución
- Dirección del destinatario
- Fecha de solicitud
- Fecha de despacho
- Número total de accesiones distribuidas

- Propósito de la solicitud
- Certificado fitosanitario (donde corresponda)
- Número del permiso de exportación (donde corresponda)
- Número del *permiso de importación* del destinatario (donde corresponda)

Archivo de los detalles de la accesión

- Número de referencia de la distribución
- Número de la accesión
- Cantidad de semillas distribuidas
- Estatus de designación de materiales en custodia o bajo el Tratado Internacional.

8. Monitoreo

1. Introducción
2. Adquisición y registro del germoplasma
 - 2.1 Adquisición del germoplasma
 - 2.2 Registro del germoplasma
3. Limpieza de las semillas
4. Determinación del contenido de humedad y secado de las semillas
 - 4.1 Determinación del contenido de humedad de las semillas
 - 4.2 Secado de las semillas
5. Determinación de la calidad de las semillas
 - 5.1 Pruebas de viabilidad de las semillas
 - 5.2 Pruebas de sanidad de las semillas
 - 5.3 Pruebas para verificar la introducción inadvertida de transgenes en las semillas
6. Empaque y almacenamiento de las semillas
 - 6.1 Empaque de las semillas
 - 6.2 Almacenamiento de las semillas
7. Distribución del germoplasma
8. Monitoreo y regeneración del germoplasma
 - 8.1 Monitoreo del germoplasma
 - 8.2 Regeneración del germoplasma

8. MONITOREO Y REGENE-RACIÓN DEL GERMOPLASMA

8.1 Monitoreo del germoplasma

¿Qué es el monitoreo?

El monitoreo es la verificación regular de la calidad (viabilidad) y cantidad (número o peso) de las accesiones de germoplasma almacenadas en un banco. El objetivo del monitoreo es determinar si hay que regenerar o multiplicar una accesión.

¿Por qué se deben monitorear las accesiones?

Las accesiones se monitorean porque:

- la viabilidad de las semillas almacenadas en un banco de germoplasma disminuye durante el almacenamiento y es necesario monitorearla para garantizar que las semillas no pierdan su capacidad de producir plantas viables cuando se requiera.
- retirar semillas para distribución y para pruebas de germinación con el tiempo disminuye la cantidad de semilla disponible.

Para evitar el deterioro excesivo de la calidad o la cantidad de las semillas, hay que monitorear tanto la viabilidad como la cantidad de semillas de cada accesión almacenada en un banco.

¿Con qué frecuencia se deben monitorear las accesiones?

La cantidad de semillas se debe monitorear por número o peso cada vez que se distribuyen semillas del banco de germoplasma. Esto facilita identificar las accesiones cuya cantidad de semilla es insuficiente para la conservación. Las pruebas de monitoreo de la viabilidad se deben hacer regularmente. El intervalo de monitoreo depende de la especie, del ambiente del almacenamiento (contenido de humedad de las semillas y temperatura) y de la viabilidad de las semillas al inicio del almacenamiento.

- Las Normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGRI (1994) recomiendan que

la primera prueba de monitoreo se haga después de haber almacenado las semillas durante diez años, en colecciones base mantenidas en condiciones preferenciales (-18°C), con una viabilidad inicial alta (germinación superior a 90%).

- Las semillas de especies que se sabe son de poca longevidad, incluyendo la mayoría de los cultivos oleaginosos y las accesiones con una viabilidad inicial relativamente baja (germinación de 85-90%), al igual que todas las semillas almacenadas en colecciones base y activas en condiciones preferenciales, se deben monitorear a los cinco años para verificarles la viabilidad (ver Cuadro 6.2).
- El intervalo entre las pruebas subsiguientes se debe basar en la experiencia, y se puede ajustar por encima o por debajo según la extensión de pérdida de la viabilidad que se observe durante la primera prueba de monitoreo (ver Cuadro 8.1).



Recuerde actualizar la cantidad de semillas en la base de datos de inventario, descontando el número de semillas que retiró para la prueba de germinación. Actualice también, en la base de datos de inventario, el resultado final de los datos de germinación.

Monitoreo de la viabilidad

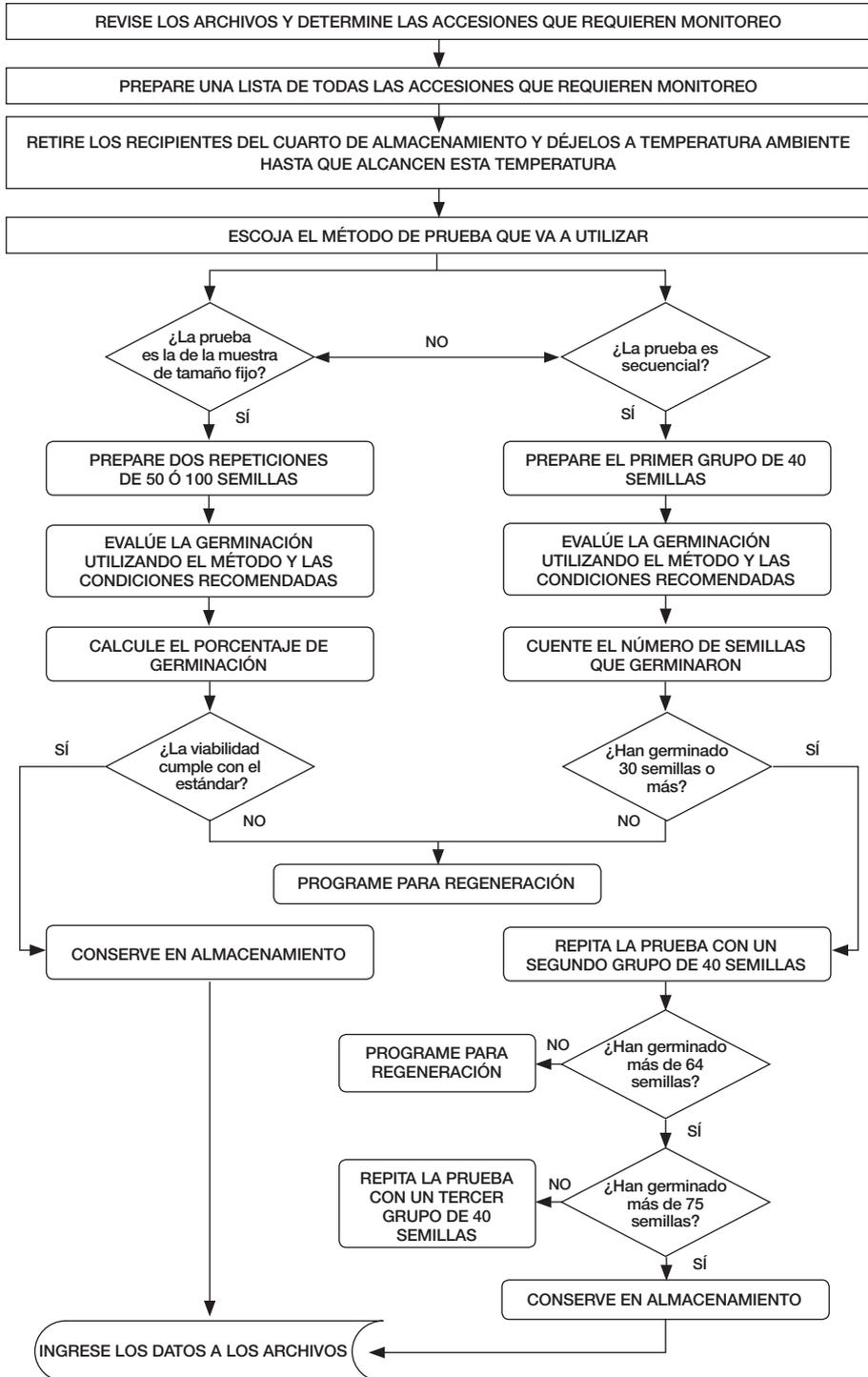
La viabilidad se monitorea mediante una prueba de germinación practicada en una muestra fija o mediante la germinación secuencial (ver Diagrama de Flujo 8.1).

Prueba de germinación de una muestra de tamaño fijo

Para la prueba de germinación con una muestra de tamaño fijo, se recomienda utilizar un mínimo de 200 semillas (en dos repeticiones de 100 semillas cada una). Si la cantidad es limitada, se pueden evaluar 50-100 semillas en dos repeticiones.

1. Identifique y prepare una lista de todas las accesiones que requieren evaluación, y programe las pruebas con una frecuencia semanal o mensual (según la disponibilidad de espacio en los germinadores y de recurso humano).
2. Ubique en el archivo de inventario los recipientes en almacenamiento.
3. Retire los recipientes del cuarto de almacenamiento y déjelos durante la noche a temperatura ambiente.
4. Abra cada recipiente, retire una muestra de semillas para la prueba y cierre los recipientes inmediatamente.
5. Haga las pruebas de germinación utilizando los métodos y condiciones que se describen en el Capítulo 5.
6. Calcule el porcentaje promedio de germinación a partir de los resultados de las dos repeticiones. Repita la prueba de germinación si la diferencia entre las dos repeticiones excede el 10% o si los límites máximos de tolerancia se encuentran a un 2.5% de probabilidad (ver Ellis *et al.*, 1985).
 - Si el porcentaje de germinación está por encima del 85% del porcentaje de germinación inicial, continúe almacenando la accesión. Establezca la fecha para la próxima prueba

Diagrama de Flujo 8.1. Monitoreo de la viabilidad



dependiendo del porcentaje de germinación actual (ver Cuadro 8.1).

- Si la germinación promedio está por debajo del 85% del porcentaje de germinación inicial, programe la accesión para regeneración (ver Cuadro 8.2).

Cuadro 8.1. Intervalo sugerido para monitorear la germinación de colecciones base o activas de semillas oleaginosas y no oleaginosas

Nivel actual de germinación (%)	Intervalo de monitoreo (años)			
	Colección activa (4–5°C)		Colección base (-20°C)	
	Semillas no oleaginosas	Semillas oleaginosas	Semillas no oleaginosas	Semillas oleaginosas
<80	3	1	5	2
80–85	5	3	10	5
85–95	8	5	15	8
>95	12	8	20	12

Cuadro 8.2. Umbral de porcentajes de germinación para la regeneración de accesiones

Germinación inicial	Regenerar si, después del monitoreo, el porcentaje de germinación está por debajo de
100	85
99	84
98	83
97	82
96	82
95	81
94	80
93	79
92	78
91	77
90	77
89	76
88	75
87	74
86	73
85	72

Prueba de germinación secuencial

La prueba de germinación secuencial utiliza menos semillas por repetición que la prueba de germinación estándar. Además, los métodos y condiciones para la germinación son los mismos que

se describieron para la prueba de germinación de una muestra de tamaño fijo.

Cuadro 8.3. Plan de prueba de germinación secuencial para una regeneración estándar de 85%, cuando se evalúan semillas en grupos de 40[†]

Número de semillas evaluadas	Regenerar si el número de semillas germinadas es menor o igual a	Repetir la prueba si el número de semillas germinadas está en el rango de	Almacenar si el número de semillas germinadas es mayor o igual a
40	29	30–40	-
80	64	65–75	76
120	100	101–110	111
160	135	136–145	146
200	170	171–180	181
240	205	206–215	216
280	240	241–250	251
320	275	276–285	286
360	310	311–320	321
400	340	-	341

[†] Cuando se han evaluado 400 semillas, la prueba se puede finalizar porque ya se han efectuado suficientes pruebas para tomar una decisión con conocimiento de causa.

El número de semillas que se requiere para cada repetición puede variar, pero se recomienda utilizar por lo menos 40 semillas por repetición.

- Haga la prueba de germinación siguiendo los métodos que se describen en el Capítulo 5, utilizando (por ejemplo) 40 semillas.
- Cuente el número de semillas germinadas después del período de prueba sugerido.
- Compare los resultados con el número de semillas germinadas que aparece en el Cuadro 8.3, prestando atención a la línea con el valor de 40 en la primera columna (número de semillas evaluadas).
 - Si el número de semillas germinadas es de 29 o menos, la accesión requiere regeneración.
 - Si el número de semillas germinadas es mayor de 29, entonces la prueba se debe repetir con otra muestra de 40 semillas tal y como se describió antes.

Es importante usar el mismo número de semillas al repetir la prueba de manera que las diferentes muestras se puedan tratar como repeticiones.

4. Cuente el número de semillas germinadas en la segunda prueba y adicione este número al resultado de la primera prueba.
5. Compare los resultados de la prueba con el número de semillas germinadas en el Cuadro 8.3, siguiendo la línea con el valor igual al número total de semillas utilizadas para todas las pruebas (80 semillas) en la primera columna (número de semillas evaluadas).
 - Si el número de semillas germinadas es 64 o menos, la accesión se debe regenerar.
 - Si es mayor de 75, la accesión puede continuar en almacenamiento.
 - Si se encuentra entre 65 y 75, la accesión se debe probar de nuevo con otra muestra de 40 semillas y los resultados se deben comparar con el valor igual al número total de semillas utilizadas en todas las pruebas (120 semillas), en el Cuadro 8.3.
6. Continúe la prueba de esta manera hasta que pueda tomar una decisión sobre si regenera o mantiene las accesiones en almacenamiento, o hasta haber repetido la prueba diez veces.

Para mayor información sobre los planes de prueba para otros tamaños de grupos (20, 25, 50 ó 100 semillas) y para estándares de regeneración entre 65% y 80%, referirse a Ellis *et al.* (1985). La prueba secuencial sólo es necesaria cuando la cantidad de semilla es limitada. Los cultivos de semilla pequeña, como el millo africano, normalmente tienen suficiente semilla para utilizar el método de la muestra de tamaño fijo.

Monitoreo de la cantidad de semilla

La cantidad de semilla se puede monitorear verificando los datos de inventario, lo cual se hace mejor si el sistema de documentación del banco es computarizado.

1. Registre el peso de las semillas que se transfirieron inicialmente al banco de germoplasma.
2. Registre todos los retiros subsiguientes de semillas para distribución, regeneración y pruebas de germinación.
3. Actualice la documentación de las reservas de semilla *inmediatamente*, ajustando el total después de todos los retiros de semilla.
4. Prepare una lista de las accesiones cuyo número de semillas en almacenamiento ha descendido por debajo del nivel crítico (en general, el número requerido para por lo menos tres regeneraciones).

Las accesiones de germoplasma identificadas con baja viabilidad o con cantidad inadecuada durante el curso del monitoreo se deben regenerar lo más pronto posible utilizando el método que se describe en la siguiente sección.

Documentación

El monitoreo es una actividad crucial en el manejo de un banco de germoplasma puesto que proporciona información sobre las reservas de semilla que están disminuyendo, las accesiones que requieren pruebas de viabilidad y aquellas que requieren regeneración. Es difícil hacer monitoreo efectivo del banco de germoplasma si no se han documentado apropiadamente los datos de las actividades anteriores.

8.2 Regeneración del germoplasma

¿Qué es la regeneración del germoplasma?

La regeneración es la renovación de las accesiones de germoplasma mediante la siembra y la cosecha de semillas con las mismas características de la muestra original. La regeneración de germoplasma es la operación más crítica en el manejo de un banco de germoplasma.

¿Por qué es crítica la regeneración en el manejo de un banco de germoplasma?

La regeneración de germoplasma implica riesgos para la integridad genética de las accesiones procedentes de presiones de selección, polinización cruzada, mezclas mecánicas y otros factores. Por lo general, el riesgo de pérdida de la integridad genética es alto cuando se regeneran accesiones genéticamente heterogéneas. La regeneración de germoplasma también es muy costosa.

¿Por qué se debe regenerar el germoplasma?

El germoplasma se regenera para los siguientes propósitos:

1. Incrementar la cantidad inicial de semilla

En las colecciones o materiales nuevos que se reciben como donaciones, la cantidad de semillas que recibe el banco de germoplasma es con frecuencia insuficiente para conservarla directamente. Las semillas también pueden tener mala calidad debido a que tienen una viabilidad baja o a que están infectadas. Todos estos materiales requieren regeneración. El germoplasma foráneo recién adquirido también se puede regenerar inicialmente ya sea bajo confinamiento o en un área aislada, bajo la supervisión de la autoridad fitosanitaria nacional como se describe en el Capítulo 2.

2. Recuperación de las reservas de semilla de colecciones base y activas

Incrementa las reservas de semilla de las accesiones:

- a las que les haya detectado baja viabilidad durante el monitoreo; o
- cuyas reservas son insuficientes para distribución o conservación.



Los bancos de germoplasma deben adoptar un estándar alto de regeneración (como un porcentaje de germinación al cual se le permite llegar a una accesión conservada antes de regenerarla) para evitar cambios genéticos producto de la selección natural de las semillas de mayor longevidad en accesiones genéticamente homogéneas. Las Normas para Bancos de Genes publicadas por la FAO y el IPGRI (1994) anotan que el valor inicial de germinación debe ser superior al 85% para la mayoría de las semillas y que la regeneración se debe hacer cuando la viabilidad sea inferior al 85% del valor inicial. La regeneración se debe hacer cuando el número de semillas de una colección base descienda por debajo del número requerido para al menos tres ciclos de regeneración.

- Las colecciones activas se deben regenerar a partir de semillas originales de una colección base, particularmente importante en el caso de especies exógamas. También es aceptable utilizar semillas de una colección activa *hasta por tres ciclos de regeneración* antes de regresar a las semillas originales (colección base)(FAO/IPGRI, 1994).
- Las colecciones base normalmente se regeneran utilizando la semilla residual de la misma muestra.

3. Cumplimiento de requerimientos especiales

Puede haber requerimientos especiales para regenerar accesiones con caracteres especiales que los mejoradores e investigadores utilizan con frecuencia –como accesiones de alto rendimiento, resistentes a enfermedades y plagas, y reservas genéticas– o si no hay semilla insuficiente para hacer un duplicado de seguridad y repatriar.

Cuando regenere accesiones de germoplasma, tenga en cuenta los siguientes factores:

- el ambiente donde va a regenerar para minimizar la selección natural;
- requerimientos especiales, si los hubiere, para interrumpir la dormancia y estimular la germinación (como la escarificación);
- un espaciamiento adecuado que permita un establecimiento óptimo de las semillas; y
- el sistema reproductivo de la planta y la necesidad de controlar la polinización o aislar.

Procedimientos para la regeneración

- Si es posible, regenere el germoplasma en la región ecológica de origen. De manera alternativa, busque un ambiente que no tenga preferencias por algunos genotipos en una población.
- Si no se encuentra un sitio adecuado, busque la colaboración de un instituto que pueda proporcionar un sitio adecuado o regenere en un ambiente controlado como en un cuarto de siembra.
- Examine el ambiente biótico en el contexto de la información previa sobre las plantas y de la experiencia pasada –un ambiente biótico inadecuado puede ser perjudicial para las plantas, la calidad de la semilla y la integridad genética de una accesión.

Selección de las accesiones

- La regeneración de las accesiones con calidad inadecuada (baja viabilidad) debe tener prioridad sobre las accesiones cuyo número de semillas es inadecuado.
- La regeneración de accesiones base debe tener prioridad sobre la regeneración de aquellas en colecciones activas.

Preparación de las parcelas para la regeneración

Suelo

- Las parcelas para la regeneración deben ser tan uniformes como sea posible.
- El campo debe tener buen drenaje.
- Evalúe la necesidad de hacer análisis de suelo y aplicar tratamientos apropiados para el cultivo y el lugar (fertilizantes, cal, riego o solarización).

Solarización

La solarización consiste en calentar el suelo, durante el verano cálido del trópico, cubriéndolo con láminas de polietileno para controlar las enfermedades que se transmiten a través del suelo. El procedimiento se realiza durante por lo menos seis semanas en el período más caliente del año.

1. Are concienzudamente la tierra y nivélela para minimizar las protuberancias del terreno.
2. Administre un riego de 50 mm antes de colocar las láminas de polietileno.
3. Utilice láminas de polietileno transparente, de 1-2 mm de espesor.
4. Inserte dos bordes de cada lámina de polietileno en los surcos y entierre firmemente los bordes en el suelo.
5. Coloque pesos para evitar que las láminas de polietileno se muevan y se rasguen con el viento.
6. Cuando siembre, deje una zona de separación de por lo menos 0.5 m alrededor de los bordes del área de solarización para que el calor se diluya cerca de los bordes.
7. No permita que agua de riego de otras áreas fluya al interior después de la solarización y durante el crecimiento del cultivo.

Malezas, plagas y enfermedades transmitidas a través del suelo

- Identifique las malezas, plagas y patógenos mediante una inspección y con base en su experiencia previa.
- Para disminuir dichos problemas durante la preparación de las parcelas de regeneración, considere la aplicación de los siguientes tratamientos:
 - aspersión de herbicida;
 - esterilización del suelo;
 - arado para estimular la germinación de malezas, seguido por la aspersión de herbicida; y
 - arado profundo para matar malezas emergentes.

Limpieza

- Mantenga las parcelas absolutamente libres de semillas y plantas invasoras.

- Considere el riesgo de contaminación con polen de otras plantas y tome las medidas adecuadas durante la preparación de la parcela, y mediante el cultivo intercalado y la deshierba manual.
- Asegúrese de que el método de preparación de la parcela es el apropiado para el método de establecimiento de las plantas que seleccionó (por ej., camellones y camas planas).
- Prepare la parcela de regeneración teniendo en cuenta:
 - el número de accesiones que se van a regenerar;
 - el número de plantas por accesión;
 - el espacio entre surcos y entre plantas; y
 - el acceso de maquinaria para deshierba y cosecha.
- El método de preparación depende de:
 - la estructura del suelo;
 - la especie que se va a sembrar o a transplantar; y
 - la necesidad de soportes para las plantas, en el caso de especies trepadoras.

Preparación de la semilla

1. Seque, trille y limpie las semillas si las muestras están recién adquiridas.
2. Para aquellas en almacenamiento:
 - a. identifique las accesiones que requieren regeneración;
 - b. retire los recipientes del banco de germoplasma y permita que tomen temperatura ambiente; y
 - c. retire las muestras de semilla, teniendo en cuenta el tamaño mínimo de muestra que se requiere para la regeneración y el nivel actual de germinación.
3. Durante los procesos de retiro, empaque y marcación de las semillas, cerciórese de identificar correctamente las accesiones a las que corresponden.
4. Para minimizar los errores, se sugiere generar los rótulos en sistemas de manejo de información computarizados.

La cantidad mínima de semillas para regeneración se puede calcular a partir del tamaño de muestra estándar utilizado para regeneración y de la viabilidad de la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Número de semillas requeridas para regeneración = Población deseada de plantas para regeneración / (% de germinación¹⁴ x % de establecimiento esperado en el campo¹⁵).

¹⁴ Los porcentajes de germinación y de establecimiento en el campo se expresan en decimales: 95% se expresa como 0.95.

¹⁵ El establecimiento de la plantas es por lo general 5% menos que el porcentaje de germinación en condiciones deficientes y 1% menos en buenas condiciones.

Ejemplo:

Población deseada de plantas = 150

Porcentaje de germinación = 85

Establecimiento esperado en el campo = 80

Número de semillas = $\frac{150}{0.85 \times 0.80} = 220$ semillas
para siembra

Tratamientos previos a las semillas

Para mejorar la germinación y el establecimiento de las semillas, puede ser necesario aplicar algún tratamiento. Si las semillas están muy secas (contenido de humedad inferior a 8%), eleve el contenido de humedad mediante la humidificación, como se describe en el Capítulo 5.

- Rompa la dormancia de especies o accesiones (empleando la estratificación, la escarificación, etc.).
- Aplique a las semillas recubrimientos de productos de marcas registradas para reducir el daño por enfermedad e insectos.
- Inocule con simbiontes adecuados (tratamiento de *Rizobio* para las leguminosas).
- Para las accesiones con una cantidad limitada de semillas, haga germinación previa en condiciones controladas y transplante las plántulas a macetas con suelo esterilizado y cultívelas en una casa de malla bajo estricta supervisión.

Siembra y manejo de cultivos

El manejo de cultivos para regeneración difiere de las prácticas comerciales normales en cuanto la variación entre plantas no es una consideración de primer orden.

Para evitar grandes pérdidas de alelos y maximizar la producción de semillas:

- utilice 100 o más plantas en accesiones genéticamente heterogéneas;
- tome atenta nota de los requerimientos de duración del día de las especies para garantizar que florezcan.
- proporcione condiciones de crecimiento adecuadas para estimular una floración abundante.
- elimine la competencia de malezas invasoras; y
- asegure una fuente estable de agua para el riego si éste fuera necesario.

Fecha de siembra

- Siembre en una época óptima de modo que la madurez y la cosecha coincidan con las condiciones de clima más favorables.



La meiosis y la antesis son etapas sensibles durante el desarrollo de las plantas. Hay que evitar someter las plantas a estrés como temperatura alta y sequía.

- Si existe una gran variación entre las accesiones en cuanto a época de floración, clasifíquelas por madurez temprana y tardía con base en documentación previa y ajuste las fechas de siembra de manera que todas las accesiones maduren en un ambiente uniforme.
- La administración del cultivo al igual que la cosecha son estrategias convenientes cuando se siembra con base en la madurez.
- Siembre en hileras uniformemente espaciadas y con espacio uniforme entre plantas dentro de las hileras.
- Evite la competencia por luz y nutrientes utilizando un espaciamiento amplio.
- Asegure un control total de patógenos y plagas empleando medidas estándar de fitoprotección.
- Normalmente no se debe hacer raleo –si fuera necesario, hágalo al azar.
- Asegúrese de que no haya presencia de plantas de otras especies en las áreas vecinas durante todo el ciclo de regeneración, utilizando la deshierba manual o el cultivo intercalado.

Riego

- Riegue el campo cuando sea necesario.
- Nunca someta el cultivo a estrés hídrico.
- Asegúrese de que haya un drenaje adecuado y que no ocurra anegamiento.

Para lograr estos objetivos, es obligatorio realizar una inspección regular a las plantas.

Verificación de la identidad de la accesión

- La identidad de la accesión se debe verificar mientras que las plantas están creciendo, comparando:
 - los datos morfológicos que hay en el sistema de documentación; o
 - utilizando material de referencia como especímenes originales de herbario o de semilla.
- La remoción de plantas indeseables se debe efectuar con precaución y sólo cuando se sabe con certeza que las plantas indeseables son mezclas genuinas de otras accesiones o variedades.
- Cuando los materiales se siembran en hileras, las plantas que crecen fuera de la hilera se pueden eliminar.

Biología de la polinización

A menos que la especie sea endógama obligada, se debe implementar un control adecuado de la polinización. Un compendio de los mecanismos de reproducción se encuentra disponible en

www.biodiversityinternational.org/Themes/Genebanks/Species_Compendium/default.asp.

Para las especies exógamas, la eliminación de polen de otras especies se puede lograr mediante:

- el aislamiento espacial (esto no es práctico cuando se trata de un número grande de accesiones de la misma especie, pero es muy útil si se trata de un número limitado de accesiones de muchas especies);
- el aislamiento temporal;
- barreras naturales o artificiales –sembrar las accesiones en cultivos establecidos de especies que crecen altas como el girasol y el cáñamo; y
- el embolsamiento de algunas inflorescencias en bolsas a prueba de polen o a prueba de polinizadores, hechas de lino o papel y colocando temporalmente, alrededor de las parcelas, mallas verticales a prueba de polen y polinizadores. Algunas veces se requiere polinización manual suplementaria para mejorar el establecimiento de las semillas.

Los cultivos polinizados por insectos se pueden cultivar en casas de malla de nylon o red con enjambres diseñados especialmente para insectos polinizadores como las abejas; se puede sembrar una accesión de cada especie cultivada en cada jaula. Los insectos polinizadores se liberan dentro de la jaula en el momento de la florescencia. Para mejorar el establecimiento de las semillas (como en especies silvestres de tomate y berenjena), puede requerirse polinización manual suplementaria. Las jaulas de aislamiento pueden ser costosas y la sombra puede afectar el crecimiento de las plantas. Una solución efectiva puede ser embolsar y hacer una polinización manual controlada. Sin embargo, si las plantas florecen durante o al final de la temporada húmeda, la lluvia podría dañar las bolsas de polinización. La humedad excesiva y la condensación en las bolsas alrededor de las flores también pueden ocasionar incremento de infecciones por bacterias y hongos. En condiciones de humedad, es mejor etiquetar las flores y retirar la bolsa tan pronto se termine la polinización de manera que los frutos se puedan desarrollar en condiciones de campo normales.

Manejo de la cosecha y postcosecha

- Coseche en el punto de madurez óptima (después de que las semillas hayan alcanzado el punto de madurez fisiológica):
 - cuando el máximo número de semillas estén maduras;
 - cuando las semillas sean tolerantes a la desecación y se puedan trillar sin sufrir daño mecánico;
 - antes de que comience el deterioro; y
 - antes de que ocurra la dispersión natural.

- Organice la cosecha de manera escalonada si existen diferencias en el tiempo de madurez de las accesiones.
- Coseche plantas individuales de la misma accesión cuando existan diferencias entre plantas en cuanto a florescencia y madurez.
- Mezcle *una proporción igual de semillas* de diferentes plantas madre para evitar *efectos maternos*.
- Las bolsas que contienen las semillas o las espigas cosechadas deben estar elaboradas en un material poroso que permita una buena circulación de aire para el secado.
- Las opciones de cosecha dependen del cultivo:
 - Coseche las plantas de forma individual, preferiblemente a mano. Si cosecha con máquina, utilice maquinaria construida para ese fin ya que la maquinaria comercial no se puede limpiar adecuadamente entre las parcelas de regeneración.
 - Coseche las infructescencias individualmente, a mano.
- Inicie el proceso de secado de las semillas inmediatamente después de la cosecha para evitar el deterioro.
- Si las semillas no se pueden procesar rápidamente, se deben colocar en un área donde se puedan tener temporalmente en un ambiente controlado, como en un cuarto con aire acondicionado.

Documentación

La regeneración se realiza como resultado de la información generada por el monitoreo de las semillas. Dado que los métodos de regeneración varían de acuerdo con la especie, también varían los tipos de descriptores empleados para registrar la información. Los siguientes descriptores van a ayudar en la documentación de los datos:

- Sitio de regeneración
- Colaborador (si corresponde)
- Referencia de la parcela
- Fecha de siembra
- Germinación en el campo
- Número de plantas establecidas
- Días transcurridos desde la siembra hasta la florescencia
- Sistema de reproducción
- Método de control de polinización utilizado
- Fecha de cosecha
- Número de plantas cosechadas
- Cantidad de semillas cosechadas

Lectura complementaria

- Ellis, R.H., Hong, T.D. y Roberts, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Vol. 1. Principles and Methodology. Handbooks for Genebanks. No. 2, IBPGR, Roma, Italia. Disponible en la dirección http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=433.
- FAO/IPGRI. 1994. Normas para bancos de genes. FAO e IPGRI, Roma, Italia. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250.
- Sackville Hamilton, N.R. y Chorlton, K.H. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: A decision guide. (J. Engels, ed.). Handbook for Genebanks No. 5. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en http://www.bioversityinternational.org/Publications/pubfile.asp?ID_PUB=210.
- Thormann, I., Metz, T. y Engels, J.M. 2004. IPGRI species compendium, Versión 1.0, Diciembre 2004. IPGRI, Roma, Italia. Disponible en www.bioversityinternational.org/Themes/Genebanks/Species_Compedium/default.asp.

Cuadro 8.4. Comportamiento reproductivo y mecanismos de control de la polinización para la regeneración de cultivos importantes

Cultivo	Especie	Comportamiento de polinización (tasa de cruzamiento)	Mecanismo de polinización	Método de regeneración
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	PC; principalmente autoincompatible	Insectos	Aislamiento espacial; Embolsamiento; jaulas a prueba de insectos
Ajonjolí	<i>Sesamum indicum</i>	Principalmente AP; Polinización cruzada hasta 5%	Insectos	
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Principalmente polinización cruzada (84-94%)	Insectos (activadores)	Aislamiento; jaulas de malla con polinizadores
Algarrobo	<i>Vicia sativa</i>	AP		
Algodón	<i>Gossypium</i> spp.	Principalmente AP; polinización cruzada 10-50%	Insectos de insectos	Embolsamiento; jaulas a prueba de insectos
Alverjón/Frijol hierba	<i>Lathyrus sativus</i>	AP; se pueden presentar niveles de significativos de PC		Embolsamiento
Amaranto	<i>Amaranthus</i> spp.	PC	Viento	Aislamiento; Embolsamiento
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	AP		
Arveja o guisante	<i>Pisum sativum</i>	Principalmente AP		
Avena	<i>Avena sativa</i>	AP		
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>	Parcialmente AP; polinización cruzada natural hasta de 48%	Insectos	Aislamiento; Embolsamiento
Calabaza	<i>Cucurbita moschata</i>	PC; monoica	Insectos	Embolsamiento y polinización manual
Cártamo	<i>Carthamus tinctorius</i>	AP		
Caupí	<i>Vigna unguiculata</i>	Principalmente AP		
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	AP		
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Principalmente PC; protándrica	Insectos	Jaulas de malla con polinizadores
Centeno	<i>Secale cereale</i>	PC; muy autoincompatible	Viento	Embolsamiento y polinización manual con reservorio de polen
Coliflor	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Principalmente PC	Insectos	Embolsamiento
Crotalaria/ cáñamo de la India	<i>Crotalaria juncea</i>	Principalmente AP		
Espinaca	<i>Spinacea oleracea</i>	PC; dioica	Viento	Aislamiento espacial
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	Principalmente PC	Insectos	Jaulas a prueba de insectos
Frijol común	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Principalmente AP; Polinización cruzada 8-20%	Insectos	Aislamiento; jaulas a prueba de insectos; Embolsamiento
Frijol Jacinto	<i>Lablab purpureus</i>			
Frijol lima	<i>Phaseolus lunatus</i>	Principalmente AP (hasta 18% cruzamiento natural)	Insectos	Aislamiento
Frijol mungo	<i>Vigna radiata</i>	AP		
Gandul	<i>Cajanus cajan</i>	Normalmente AP; polinización cruzada natural 5-40%	Insectos	Aislamiento; Embolsamiento; jaulas a prueba de insectos
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	AP		
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Parcialmente PC; protándrica	Insectos	Embolsamiento y polinización manual
Haba	<i>Vicia faba</i>	Principalmente AP; polinización cruzada 4-8%	Insectos	Aislamiento; Embolsamiento
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>	Principalmente AP; polinización cruzada natural 1-6%	Insectos	Embolsamiento; jaulas a prueba de insectos
Lenteja	<i>Lens culinaris</i>	AP		

Cultivo	Especie	Comportamiento de polinización (tasa de cruzamiento)	Mecanismo de polinización	Método de regeneración
Lenteja negra	<i>Vigna mungo</i>	AP		
Linaza	<i>Linum usitatissimum</i>	Normalmente AP; cruzamiento natural hasta 12%	Insectos	Aislamiento; Embolsamiento
Lupino	<i>Lupinus spp.</i>	Principalmente AP; puede ocurrir alguna PC	Insectos	Aislamiento; jaulas a prueba de insectos o Embolsamiento
Maíz	<i>Zea mays</i>	PC; monoica	Viento	Embolsamiento de espiga y polinización manual con reservorio de polen
Maní	<i>Arachis hypogaea</i>	AP		
Millo africano	<i>Eleusine corocana</i>	AP		
Millo de cola de zorra	<i>Setaria italica</i>	AP		
Millo de perla	<i>Pennisetum glaucum</i>	Principalmente PC; protoginoso	Viento	Embolsamiento; cruzamiento manual con reservorio de polen
Mostaza café	<i>Brassica juncea</i>	Principalmente AP (4-14% Polinización cruzada)	Insectos	Embolsamiento
Oca	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Parcialmente AP; polinización cruzada natural 4-19%	Insectos	Aislamiento; jaulas a prueba de insectos o Embolsamiento
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	Principalmente PC	Insectos	Aislamiento; Embolsamiento
Pasto buffel	<i>Cenchrus ciliaris</i>	PC	Viento	Aislamiento; Embolsamiento
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	PC; monoica	Insectos	Embolsamiento y polinización manual
Pimiento, ají	<i>Capsicum annuum</i>	Con frecuencia PC; heterostilia	Insectos	Embolsamiento
Porongo	<i>Lagenaria siceraria</i>	PC; monoica	Insectos	Embolsamiento y polinización manual
Rábano	<i>Raphanus sativus</i>	PC; muy autoincompatible	Insectos	Jaulas de malla con polinizadores
Raygrás	<i>Lolium perenne</i>	PC	Viento	Embolsamiento
Remolacha	<i>Beta vulgaris</i>	PC; autoincompatible	Viento, Insectos	Aislamiento espacial, Jaulas de malla con polinizadores
Repollo	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	PC	Insectos	Jaulas de malla con polinizadores
Ricino	<i>Ricinus communis</i>	PC; monoica	Viento	Embolsamiento y polinización manual
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	PC; monoica	Insectos	Embolsamiento y polinización manual
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	Principalmente AP; polinización cruzada hasta 1-50%	Viento	Aislamiento; Embolsamiento
Soya	<i>Glycine max</i>	AP		
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	AP		
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Normalmente AP; algunas especies autoincompatibles con PC moderada a alta		
Trébol dulce	<i>Melilotus albus</i>	AP		
Trébol rojo	<i>Trifolium pratense</i>	PC; muy autoincompatible	Insectos	Jaulas de malla con polinizadores
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	AP		
Trigo sarraceno	<i>Fagopyrum esculentum</i>	PC; autoincompatible	Viento	Embolsamiento y polinización manual
Triticale	<i>Triticosecale</i>	PC	Viento	Aislamiento; Embolsamiento
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	PC; protándrica	Insectos	Jaulas de malla con polinizadores

ANEXO I

Políticas internacionales y marcos de trabajo que afectan el acceso al germoplasma y el intercambio de germoplasma

La adquisición y la distribución de germoplasma implican trasladar semillas de un lugar a otro o de una región a otra. En la adquisición del germoplasma, los bancos importan material proveniente de colectas o de otros proveedores de germoplasma que están dentro o fuera del país. La distribución implica exportar muestras de semillas a usuarios de todo el mundo. Además de las regulaciones fitosanitarias descritas en los Capítulos 2 y 7, las siguientes políticas, marcos de trabajo y convenios, de carácter internacional, afectan el acceso al germoplasma y el intercambio de él.

Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB)

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), que entró en vigencia en diciembre de 1993, proporcionó un marco legal para la conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos. Antes del CDB, los recursos genéticos se consideraban patrimonio común de la humanidad y estaban disponibles para el uso, sin restricciones. El CDB afirmó la soberanía nacional sobre los recursos genéticos; el Artículo 15 se pronuncia sobre las condiciones para el acceso y el uso, incluyendo una distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de la utilización de los recursos (ver articulado en la dirección www.biodiv.org/convention/articles.asp. El texto completo del Convenio en español aparece en la dirección <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-un-es.pdf>).

Código Internacional de Conducta para la Recolección y Transferencia de Germoplasma Vegetal

El Código Internacional, adoptado por la Conferencia de la FAO en 1993, constituye un marco general para la recolección y transferencia de germoplasma. El Código establece las responsabilidades mínimas de los colectores y curadores en cuanto a la colecta y transferencia de germoplasma. Aunque no es un instrumento vinculante, el código es compatible con el CDB y sirve como referencia para que los países establezcan sus propias regulaciones en lo referente a la colecta y el intercambio de germoplasma. La versión oficial en español del Código aparece en la dirección <ftp://ftp.fao.org/ag/cgrfa/GS/CCgermpS.pdf>.

Acuerdos para la Adquisición de Germoplasma

El Artículo 15 del CDB estipula que el acceso a los recursos genéticos se debe realizar en *términos mutuamente acordados*

y que está sujeto a *consentimiento fundamentado previo*. Esto significa que, en respuesta a una solicitud de germoplasma, el país proveedor puede otorgar o negar el acceso a él. El acceso se considera de mutuo acuerdo cuando tanto el proveedor como el destinatario así lo manifiestan haciendo un contrato bilateral, que con frecuencia toma la forma de un acuerdo de adquisición de germoplasma (AAG), que establece los términos en los cuales se adquiere y transfiere el material genético.

Tratado Internacional y Sistema Multilateral para el Acceso y la Distribución de Beneficios

En 2001, la Conferencia de la FAO adoptó el Tratado Internacional sobre los RFGAA, en el cual reconoce que: (i) la agricultura de todos los países depende en gran parte de los RFGAA originarios de otro lugar; (ii) el avance en el mejoramiento de los cultivos requiere un acceso continuo y sin mayores restricciones a una amplia base genética; y (iii) un enfoque puramente bilateral para el acceso y la distribución de beneficios no se adecúa a los recursos genéticos de los principales cultivos alimenticios. El Tratado crea un Sistema Multilateral para el Acceso y la Distribución de Beneficios que cubre 64 cultivos y especies forrajeras importantes, y facilita el acceso a los recursos genéticos en dicho Sistema. Las partes contratantes están obligadas a otorgar acceso con fines de investigación agrícola y alimentaria, mejoramiento y capacitación cuando:

- lo solicite una de las partes, una entidad legal bajo la jurisdicción de una de las partes, o un instituto internacional que haya firmado un acuerdo con el Órgano Rector; y
- los RFGAA se hayan adquirido bajo estos términos.

En los términos del Tratado, los países acuerdan que no se requerirá consentimiento fundamentado previo para tener acceso a una categoría definida de los RFGAA, pero que sí aplicará un conjunto de términos de mutuo acuerdo. El acuerdo estándar de transferencia de materiales (ATM) permite el acceso a los recursos fitogenéticos y establece la distribución de beneficios con base en regalías derivadas de productos comerciales que empleen material obtenido a través del sistema multilateral. Para más información, ver el sitio en español del Tratado Internacional en internet: http://www.planttreaty.org/index_es.htm (la versión en español del Tratado aparece en la dirección <ftp://ftp.fao.org/ag/cgrfa/it/ITPGRs.pdf> y la del ATM en la dirección <ftp://ftp.fao.org/ag/cgrfa/gb1/SMTAs.pdf>).

Permisos de la CITES

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) es un acuerdo internacional entre los gobiernos que ayuda a los países miembros

a controlar y monitorear las poblaciones protegidas de plantas y animales. La CITES regula el comercio y el intercambio mediante permisos y certificados. Cuando se importan muestras de una especie que se encuentra en los Apéndices de la CITES, se deben obtener un permiso CITES de importación del país importador y un permiso CITES de exportación del país de origen. Las especies que cubre la CITES se encuentran en las listas de los tres Apéndices, dependiendo del grado de protección que requieren:

1. El Apéndice I enumera las especies más amenazadas.
2. El Apéndice II enumera las especies que en la actualidad no están amenazadas, pero que enfrentan la extinción a menos que el comercio se controle estrictamente.
3. El Apéndice III es una lista de las especies para las cuales se requiere la cooperación de otros países con el fin de evitar la explotación no sostenible o ilegal.

Las semillas de las plantas del Apéndice II y las semillas de los híbridos propagados de manera artificial del Apéndice I están exentas de los controles de la CITES. Sin embargo, las plantas que se siembran a partir de semillas exentas están protegidas y requieren permisos CITES de importación y exportación. La base de datos de las especies que aparecen en las listas de la CITES, incluyendo los tres Apéndices y los puntos focales nacionales para los permisos y certificados, se encuentra disponible en <http://www.cites.org/esp/index.shtml> (la versión en español del Convenio se encuentra en la dirección <http://www.cites.org/esp/disc/text.shtml>).

Organismos modificados genéticamente (OMG)

Muchos países han establecido marcos para regular la importación y el manejo de los OMG. Éstos tienen como base, en gran parte, el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología, el cual entró en vigencia en septiembre de 2003 (ver www.biodiv.org/biosafety/default.aspx; la versión en español del Protocolo está disponible en la dirección <http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.doc>). Las autoridades nacionales de bioseguridad, en colaboración con las autoridades fitosanitarias, son responsables de expedir los permisos de importación, efectuar las evaluaciones de riesgo y hacer cumplir las normas de bioseguridad. Los investigadores que desean importar OMG deben presentar una solicitud en la que suministrarán detalles del material genético que pretenden introducir, información sobre la investigación y las pruebas de los OMG en cuestión y un plan de las medidas de seguridad que se aplicarán durante la introducción. La aprobación se expide si la autoridad nacional determina que el OMG, o que el producto del OMG, no constituye riesgo para el ambiente, la diversidad biológica o la salud humana. Antes de exportar un

OMG, también se requiere una autorización de la autoridad de bioseguridad del país exportador. No se autorizará la exportación si el país exportador prohíbe el OMG o el producto del OMG.

ANEXO II

Métodos serológicos para la detección de patógenos vegetales

Procedimiento general utilizando el método de placa recubierta de antígeno (ACP)-ELISA

1. Coseche muestras frescas de hoja de las muestras y de los controles, y pese 0.2 g de cada una. Macere cada muestra en 2 ml de tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0.05 M) + polivinil piridina al 2% p/v y Na_2SO_3 al 0.2% p/v. Transfiera la savia a un tubo Eppendorf marcado. Centrifugue durante cinco minutos a 10,000 rpm.
2. Rotule la placa microtiter y cargue las muestras, 100 μl por pozuelo. Cubra la placa con parafilm e incube a 4°C durante la noche. Pese 4 g de la muestra sana y macere en 10 ml de solución tampón de fosfato salino con Tween (PBST), la cual actúa como una solución bloqueadora. Ésta se prepara disolviendo 80.0 g de NaCl, 2.0 g de KH_2PO_4 , 11.0 g de Na_2HPO_4 y 2.0 g de KCl en 2000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 y agregando 5.0 ml de Tween 20 para llegar hasta 10 l. Pese las muestras y disuelva. Filtre a través de algodón hidrófilo y lleve el filtrado a 80 ml. Utilice esto para preparar diluciones del antisuero. Deje absorber a 4°C durante la noche.
3. Prepare una solución al 0.1% de albúmina de suero bovino en PBST.
4. Enjuague la placa en un chorro suave de agua corriente y lave tres veces con PBST.
5. Agregue PBST a todos los pozuelos de la placa, 150 μl por pozuelo. Cubra la placa con parafilm e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Vacíe totalmente la solución bloqueadora de la placa. Sin lavar, agregue el antisuero diluido, utilizando 100 μl por pozuelo. Cubra la placa con parafilm e incube de tres a cuatro horas a temperatura ambiente.
7. Prepare la dilución del conjugado enzimático de fosfatasa alcalina en PBST (1/1000 recién preparada).
8. Lave la placa tres veces con PBST, luego agregue el conjugado diluido de acuerdo con el patrón en el diagrama de carga, empezando con el más diluido. Utilice 100 μl por pozuelo. Cubra la placa con parafilm e incube a 4°C durante la noche.
9. Lave la placa con PBST tres veces.

10. Disuelva la tableta de sustrato (p-NPP, Sigma) en tampón de sustrato (1 mg/ml) (dietanolamina 10%, pH 9.8, almacenada en un refrigerador).
11. Agregue el sustrato disuelto a todos los pozuelos, 150 µl por pozuelo. Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos. Evalúe y anote la intensidad de color de cada pozuelo con el lector de ELISA.

Procedimiento general utilizando el método de inmunoensayo de manchas de tejido (TBIA) sobre membranas de nitrocelulosa

1. Colecte los tejidos (hojas, pecíolos, tallos, etc.).
2. En el caso de tejidos delgados, como hojas, enróllelos, bien apretados. Si son muestras por lotes, envuélvalas juntas usando parafilm.
3. Corte un pedazo de membrana de nitrocelulosa (NCM); córtela la esquina superior izquierda y marque una cuadrícula encerrándola.
4. Sostenga los tejidos en una mano y, con una cuchilla, corte con un movimiento firme de la otra mano para obtener una superficie de un solo corte.
5. Presione con suavidad y firmeza la superficie recién cortada sobre un cuadrado de la cuadrícula de NCM. Sobre un formato preparado con antelación, registre la información de qué material se manchó en qué cuadrícula. Continúe manchando las hojas hasta que todas las cuadrículas queden llenas.
6. Lave la NCM tres veces con PBST a intervalos de cinco minutos.
7. Diluya el antisuero en savia sana, en PBST (dilución 1/500-1/2000), y deje absorber a temperatura ambiente durante dos horas o a 4°C durante la noche.
8. Bloquee la NCM en 2µg/ml de polivinil alcohol en PBST e incube durante un minuto a temperatura ambiente.
9. Lave como se explica en el paso 6.
10. Agregue antisuero diluido e incube durante una hora a temperatura ambiente.
11. Lave como se explica en el paso 6.
12. Agregue conjugado anti-conejo (dilución 1/1000-1/5000 en tampón conjugado) e incube durante una hora a temperatura ambiente.
13. Lave como se explica en el paso 6.
14. Agregue solución de sustrato (NBT/BCIP) (Nitroazul de Tetrazolio/ Bromo Cloro Indol Fosfato).
15. Para detener la reacción, lave con agua desionizada.

ANEXO III

Glosario

Accesión: Muestra de semillas diferenciable e identificable de manera única, que representa un cultivar, una línea de mejoramiento o una población, y que se mantiene en almacenamiento para conservación y uso.

Aquenio: Fruto indehiscente seco de una semilla, con la semilla adherida al pericarpio en un solo punto.

Banco de germoplasma: Centro para la conservación de los recursos genéticos en condiciones que permiten prolongarles la vida.

Base de datos: Conjunto organizado de datos interrelacionados, integrados con un fin específico y que se guardan en uno o más medios de almacenamiento.

Bolsas de papel aluminio laminado: Bolsas elaboradas de un material compuesto por una capa interna de polietileno, una capa intermedia de papel aluminio y una capa externa de poliéster.

Cápsula: Fruto dehiscente seco, derivado de un ovario con dos o más carpelos, que se abre parcialmente durante la madurez.

Carácter o característica: Cualidad o atributo reconocible que resulta de la interacción de un gen o un grupo de genes con el medio ambiente.

Caracterización: Registro de caracteres altamente heredables que se pueden ver con facilidad y que se expresan en todos los ambientes.

Certificado fitosanitario: Certificado expedido por personal fitosanitario de un gobierno para constatar que el material de semilla se encuentra libre de plagas y enfermedades.

Código de barras: Sistema computarizado de codificación que utiliza un patrón o barras impresas sobre rótulos para identificar accesiones de germoplasma. Los códigos de barras se leen escaneando ópticamente el patrón impreso con un programa de computador que lo decodifica.

Colección: Grupo de accesiones de germoplasma que se mantienen en determinadas condiciones y con un propósito definido.

Colección activa: Acciones de germoplasma que se utilizan para regeneración, multiplicación, distribución, caracterización y evaluación. Las colecciones activas se mantienen en almacenamiento de corto a mediano plazos y, en general, se duplican en una colección base que se mantiene en almacenamiento de mediano a largo plazos.

Colección base: Colección de germoplasma que se conserva a largo plazo, en condiciones de almacenamiento seguro, y que no se utiliza como fuente rutinaria de distribución. La semilla por lo general se almacena a temperaturas bajo cero y a un contenido de humedad bajo.

Colección en campo: Colección de germoplasma que se conserva como plantas vivas porque sería difícil de conservar de otra manera, ya que la semilla se mantiene comúnmente en colecciones establecidas en campo.

Colección *in vitro*: Colección de germoplasma que se conserva como tejido vegetal en un rango que va desde los protoplastos y las suspensiones celulares hasta los cultivos de callos, meristemas y embriones.

Conservación a largo plazo: Almacenamiento de germoplasma durante un período prolongado, como en las colecciones base y los duplicados. El período de almacenamiento antes de que sea necesario regenerar las semillas varía, pero es de por lo menos varias décadas y posiblemente de un siglo o más. La conservación a largo plazo se hace a temperaturas bajo cero.

Conservación a mediano plazo: Almacenamiento de germoplasma a mediano plazo, como en las colecciones activas y de trabajo. En general, se supone que habrá una mínima pérdida de viabilidad durante aproximadamente diez años. La conservación a mediano plazo se lleva a cabo a temperaturas entre 0 y 10° C.

Conservación *ex situ*: Conservación de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural en el caso de los recursos fitogenéticos, puede ser en bancos de semillas, en bancos de germoplasma *in vitro* o como colecciones vivas en bancos de germoplasma en el campo.

Contenido de humedad (con base en el peso húmedo): Peso de la humedad libre dividido por el peso del agua más la materia seca, expresado como un porcentaje.

Contenido de humedad en equilibrio: Contenido de humedad en el cual una semilla se encuentra en equilibrio con la humedad relativa del aire circundante.

Cuarentena: Confinamiento oficial de germoplasma introducido a un país, sujeto a regulaciones fitosanitarias, para verificar que no tenga enfermedades o plagas perjudiciales para el país que lo importa.

Cultivar: Variedad cultivada producida mediante el fitomejoramiento científico o la selección de los agricultores.

Daño por imbibición: Daño que sufren las semillas muy secas cuando absorben agua muy rápidamente (ver también *humidificación*).

Datos de pasaporte: Información básica sobre el origen de una accesión, que incluye datos como el sitio donde se colectó, el pedigrí u otra información relevante que ayude a identificarla.

Deriva genética: Cambios en la composición genética de una población cuando el número de individuos se reduce por debajo de la frecuencia de ciertos alelos dentro de ella.

Descriptor: Rasgo, característica o atributo de una accesión, que se puede identificar y medir, y que se utiliza para facilitar la clasificación, el almacenamiento, la recuperación y el uso de datos.

Desecador: Recipiente de vidrio de poca altura con tapa de cierre hermético, que contiene un agente desecante como el gel de sílice o el cloruro de calcio, sobre el cual se coloca el material que se va a secar dispuesto sobre una plataforma perforada.

Distribución: Proceso mediante el cual se suministran muestras de accesiones de germoplasma a mejoradores y otros usuarios.

Diversidad genética: Variedad de rasgos genéticos que resultan en características diferenciadoras.

Documentación: Colección organizada de registros que describen la estructura, el propósito, el funcionamiento, el mantenimiento y los requerimientos de datos.

Donante: Institución o individuo responsable de donar germoplasma.

Dormancia: Estado en el cual ciertas semillas vivas no germinan,

incluso en condiciones que normalmente se considerarían apropiadas.

Duplicado de seguridad: Duplicado de una colección base que se almacena en condiciones similares, para conservación a largo plazo, pero en un sitio diferente para evitar la pérdida accidental del material de la colección base.

Estándar de regeneración: Porcentaje de viabilidad de las semillas al cual o por debajo del cual se debe regenerar la accesión para producir semillas frescas.

Evaluación: Registro de aquellas características en cuya expresión con frecuencia influyen factores ambientales.

Exogamia: Cruzamientos naturales o controlados entre individuos no relacionados. La exogamia también se refiere a una especie con barreras específicas para autofecundarse o que muestra tal depresión endógama que los individuos endógamos nunca alcanzan la madurez.

Exploración: Actividad consistente en buscar diversidad genética en el campo.

Fenotipo: Apariencia externa de una planta que resulta de la interacción de su composición genética (genotipo) con el medio ambiente.

Folículo: Fruto seco de una sola célula, de muchas semillas, que consiste en un solo carpelo, dehiscente por la sutura ventral.

Fruto dehiscente: Fruto que se abre en la madurez para esparcir sus semillas (ver *folículo*, *cápsula*).

Fruto indehiscente: Fruto que no se abre en la madurez (ver también *aquenio*).

Funículo: Filamento por el cual un óvulo o semilla se adhiere a la pared del fruto.

Gel de sílice: Compuesto químico inerte que absorbe agua de su entorno y la elimina mediante la evaporación cuando se lo calienta.

Genotipo: Constitución genética de una planta u organismo.

Germinación: Proceso biológico que conduce al desarrollo de una

plántula a partir de una semilla. La emergencia de la radícula es el primer signo visible de germinación pero después de ella puede no presentarse crecimiento alguno o presentarse un desarrollo anormal. Según las normas de la ISTA, sólo se consideran germinadas las plántulas que muestran una morfología normal.

Germinación normal: Germinación en la cual las plántulas muestran todas sus estructuras esenciales de raíces y brotes, y son capaces de desarrollarse en plantas maduras, en condiciones favorables.

Germoplasma: Material genético que forma la base física de la herencia biológica y que se transmite de una generación a la siguiente a través de células de germinación.

Humedad absoluta: Cantidad de vapor de agua presente en una unidad de volumen de aire que por lo general se expresa en kilogramos por metro cúbico.

Humedad relativa (HR): Medida de la cantidad de agua presente en el aire, en comparación con la mayor cantidad posible de agua que pueda contener el aire a una determinada temperatura, expresada como un porcentaje. Es diferente a la humedad absoluta, que es la cantidad de vapor de agua presente en una unidad de volumen de aire, que por lo general se expresa en kilogramos por metro cúbico.

Humidificación: Proceso en el cual el contenido de humedad de semillas muy secas se eleva poniéndolas en un ambiente húmedo. La humidificación ayuda a evitar que las semillas se dañen por una rápida absorción de agua.

Intervalo de monitoreo: Período de almacenamiento entre pruebas de monitoreo.

Inventario: Listado de las muestras (incluyendo sus características) que se almacena en un banco de germoplasma.

Isoterma: Un gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad de las semillas y el porcentaje de humedad relativa (ver también *isoterma de sorción*).

Isoterma de sorción: Ver *isoterma*.

Lista de descriptores: Colección de todos los descriptores de un cultivo o especie.

Línea de mejoramiento: Grupo de organismos diploides o poliploides de idéntico pedigrí que se diferencian de otros individuos de la misma especie por un fenotipo o genotipo único.

Madurez de masa: Etapa en el desarrollo de una planta en la cual las semillas alcanzan su peso seco máximo.

Monitoreo: Verificación periódica de la cantidad y viabilidad de las accesiones de una colección.

Muestra: Parte de una población utilizada para determinar las características de toda la población.

Muestra aleatoria: Muestra de un grupo más grande, retirada al azar.

Muestra más original (MMO): Muestra de semillas que ha pasado por el menor número de regeneraciones desde que el banco adquirió el material y que se recomienda para almacenamiento como colección base. Puede referirse también a una submuestra del lote original de semillas o a una muestra del primer ciclo de regeneración si ésta fue necesaria antes de almacenar el lote de semilla original.

Multiplicación: Muestra representativa de una accesión que se cultiva para incrementar la cantidad de material conservado para distribución.

Número de accesión: Número de identificación único que el curador asigna a una accesión cuando la ingresa a una colección. Este número nunca se debe asignar a otra accesión.

Organismo modificado genéticamente (OMG): Organismo cuyo material genético se ha alterado deliberadamente. (Ver también *planta transgénica*).

Patógeno: Microorganismo vivo, como un virus, una bacteria o un hongo, que causa una enfermedad en otro organismo.

Pedigrí: Registro de la ascendencia de una línea o variedad genética.

Plaga: Organismo que se considera perjudicial o nocivo.

Planta transgénica: Planta que se ha manipulado genéticamente mediante técnicas de ADN recombinante para darle nuevas

características. Las plantas transgénicas se producen agregando uno o más genes a un genoma vegetal, utilizando un proceso llamado transformación.

Población: Grupo de plantas o animales que tienen rasgos comunes y comparten un área o región geográfica.

Polinización: Proceso en el cual se transfiere polen de una antera a un estigma receptor por medio de agentes polinizadores como el viento, los insectos, las aves, los murciélagos, o por la apertura de la misma flor.

Potencial del agua: Potencial químico del agua para producir reacción o movimiento. El potencial del agua es importante en el secado de las semillas porque mide la capacidad de movimiento del agua. El agua siempre se mueve de áreas con un potencial de agua alto a áreas con un potencial de agua bajo.

Propágulo: Cualquier estructura con la capacidad de originar una nueva planta mediante la reproducción sexual o asexual (vegetativa). Se incluyen en esta categoría semillas, esporas y cualquier parte del cuerpo vegetal capaz de crecer independientemente cuando se lo separa del progenitor.

Prueba de germinación: Procedimiento para determinar el porcentaje de semillas capaces de germinar en un conjunto dado de condiciones.

Prueba de germinación secuencial: Serie de diferentes pruebas de semillas en la cual la decisión de seguir o no evaluando las semillas depende del resultado acumulado.

Prueba de tetrazolio: Prueba para verificar la viabilidad de una semilla, en la cual se sumergen semillas húmedas en una solución de cloruro de trifeníl tetrazolio.

Prueba de viabilidad: Prueba realizada a una muestra de semillas de una accesión, diseñada para calcular la viabilidad de toda la accesión.

Raza: Variedad nativa de un cultivo que ha evolucionado durante muchos años de selección por parte de los agricultores y que se ha adaptado a las condiciones locales. Las razas o variedades nativas son por lo general genéticamente heterogéneas.

Regeneración: Cultivo de una accesión de semillas para obtener una muestra fresca con alta viabilidad y numerosas semillas.

Región micropilar: Punto de una semilla que fue el orificio (poro) del óvulo.

Semilla dura: Semilla que no se embebe ni germina cuando se la coloca en un medio húmedo porque es impermeable al agua.

Semilla ortodoxa: Semilla que se puede secar a un bajo contenido de humedad y almacenar a temperaturas bajas, sin dañarse, para incrementar su longevidad.

Semilla recalcitrante: Semilla que pierde viabilidad cuando se la seca o almacena a temperaturas bajas.

Silicua: Fruto seco, dehiscente, elongado, compuesto de dos carpelos separados por una división que sostiene las semillas.

Sistema para el manejo de bases de datos: Unidad de software que controla la organización, el almacenamiento, la recuperación, la seguridad y la integridad de los datos en una base de datos. Este sistema acepta solicitudes e indica al sistema operativo que transfiera los datos apropiados a un formato de solicitud. Los principales distribuidores de este tipo de sistemas son Oracle, IBM, Microsoft y Sybase. MySQL es un producto muy popular, de amplia distribución.

Solarización: Método no tóxico para eliminar malezas y plagas que consiste en cubrir el suelo con capas de plástico transparente y dejar que el sol cree suficiente calor.

Transformación: Alteración genética de una célula que resulta de la introducción, absorción y expresión de ADN extraño.

Transgén: Gen que se utiliza en la transformación (ver *planta transgénica*).

Trilla: Proceso de golpear las plantas con una máquina o con la mano para separar las semillas.

Unidad base: Número de semillas que se requiere para asegurar la implementación exitosa de un procedimiento como el registro o la regeneración.

Variiedad: División reconocida de una especie, que sigue en la

clasificación bajo subespecie. Se distingue por características tales como el color de la flor, el color de la hoja y el tamaño de la planta madura. El término es sinónimo de *cultivar*.

Variedad obsoleta: Variedad vegetal que ya no se cultiva de manera comercial.

Viabilidad de las semillas: Capacidad de las semillas para germinar en condiciones favorables.

Vida en almacenamiento: Número de años que una semilla se puede almacenar antes de que se muera.

ANEXO IV

Equipo especializado para bancos de germoplasma de semillas

(La lista no es muy completa y la mención del nombre de los proveedores no constituye necesariamente respaldo a sus productos)

No	Producto	Especificación/Propósito	Proveedor
1	Aparato para destilación	Agua destilada para pruebas de germinación, etc.	<p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono.: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 549 1700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171 2699347 / 2699267 Fax: (91) 171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax:(1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>

2	Balanza analítica	Pesa hasta con cuatro decimales; se requiere para calcular el contenido de humedad de las semillas en muestras pequeñas	<p>Mettler-Toledo (Schweiz) AG Im Langacher CH-8606 CH-8606 Greifensee Suiza Teléfono: (41) 1 944 45 45 Fax: (41) 1 944 45 10 Correo electrónico: info.ch@mt.com Página de internet: www.mt.com</p> <p>Ohaus Corporation P.O. Box 2033 19A Chapin Road Pine Brook, NJ 07058 EUA Teléfono: (1) 973 377 9000 Fax: (1) 973 593 0359 Correo electrónico: Sales@Ohaus.com Página de internet: www.ohaus.com</p> <p>Sartorius AG Weender Landstrasse 94-108 D-37075 Goettingen Alemania Teléfono: (49) 551 308 0 Fax: (49) 551 308 3289 Correo electrónico: wt.sales@sartoriuscorp.com Página de internet: www.sartorius.com</p> <p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 549 1700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467-6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171-2699347 / 2699267 Fax: (91) 171-2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800-524-0018 Fax: (1) 856-467-3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>
---	-------------------	---	---

3	Balanza para determinación de humedad	Combina el calor con tecnología de peso de alta precisión para ofrecer un método rápido y exacto para determinar la humedad	<p>Mettler-Toledo (Schweiz) AG Im Langacher CH-8606 Greifensee Suiza Teléfono: (41) 1 944 45 45 Fax: (41) 1 944 45 10 Correo electrónico: info.ch@mt.com Página de internet: www.mt.com</p> <p>Ohaus Corporation P.O. Box 2033 19A Chapin Road Pine Brook, NJ 07058 EUA Teléfono: (1) 973 377 9000 Fax: (1) 973 593 0359 Correo electrónico: Sales@Ohaus.com Página de internet: www.ohaus.com</p> <p>Sartorius AG Weender Landstrasse 94-108 D-37075 Goettingen Alemania Teléfono: (49) 551 308 0 Fax: (49) 551 308 3289 Correo electrónico: wt.sales@sartoriuscorp.com Página de internet: www.sartorius.com</p> <p>Hoffman Manufacturing Co. 353 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p>
4	Bandejas de almacenamiento (metálicas/plásticas)	Deben resistir temperaturas bajo cero	Proveedores locales

5	Báscula electrónica	Registra el peso hasta con dos decimales; se requiere en varias etapas del manejo de las semillas	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 5491700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91)171 2699347 / 2699267 Fax: (91)171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax: (1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>
---	---------------------	---	---

6	Cámara de germinación (Germinadora)	Proporciona niveles muy altos de HR, iluminado, con control de ciclo diario que permite selección independiente de temperaturas y luz día/noche	<p>Controlled Environments Limited 590 Berry Street Winnipeg, Manitoba Canadá R3H 0R9 Teléfono.: (1) 204 786 6451 Fax: (1) 204 783 7736 Correo electrónico: sales@conviron.com Página de internet: www.conviron.com</p> <p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany, OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022, W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Weiss Gallenkemp Ltd. Willowbank House 84 Station Road Marlow Buckinghamshire SL7 1NX Reino Unido Teléfono: (44) 1494 43 43 24 Fax: (44) 1494 43 43 Página de internet: www.weisstechnik.co.uk</p>
---	-------------------------------------	---	--

7	Cámara / cuarto de secado	Deshumidificadores de absorción giratorios con equipo de refrigeración secundario para proporcionar un ambiente de 15°-20°C y 15-20% de HR para el secado de las semillas	<p>Bry-Air Inc. 10793 St. Rt. 37W Sunbury, Ohio 43074 EUA Teléfono: (1) 740 965 2974 Fax: (1) 740 965 5470 Correo electrónico: bryair1@aol.com Página de internet: www.bry-air.com</p> <p>Hoffman Manufacturing Co. 353 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Huurre Group Oy. PO Box 127 FIN-33101 Tampere Finlandia Teléfono: (358) 20 5555 11 Fax: (358) 20 5555 360 Correo electrónico: info@huurre.com Página de internet: www.huurre.com</p> <p>Munters Limited Blackstone Road Huntingdon Cambridgeshire PE29 6EE Reino Unido Teléfono.: (44) 1480 432243 Fax: (44) 1480 413147 Correo electrónico: info@munters.co.uk Página de internet: www.munters.com</p> <p>Watford Refrigeration & Air Conditioning Ltd. Wiggenhall Industrial Estate Watford WD1 8AW Reino Unido Teléfono: (44) 1923 227726 Fax: (44) 1923 233525 Correo electrónico: sales@watref.co.uk Página de internet: www.watref.co.uk</p>
8	Congelador (horizontal/vertical)	Congeladores domésticos estándar que trabajan a -20°C, para conservación de semillas a largo plazo	Disponible localmente (e.g., Revco, Kelvinator, Westinghouse y otros)

9	Contador de semillas	Cuenta un número predeterminado de semillas o registra un conteo sobre una porción previamente pesada o medida de manera volumétrica	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road, P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91)171 2699347 / 2699267 Fax: (91)171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p>
10	Cribas de diferentes tamaños	Limpieza y separación de las semillas	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91)171 2699347 / 2699267 Fax: (91)171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p>

<p>11</p>	<p>Cuartos fríos - mediano / largo plazo</p>	<p>Módulos de almacenamiento en frío fabricados a base de paneles de poliuretano aislante; los paneles deben ser de 150 mm de espesor y estar contruidos para almacenamiento a largo plazo (-20°C) o de 75 mm de espesor, para almacenamiento a mediano plazo (+5°C); de piso aislado y de resistencia para trabajo pesado, con puerta con bisagra; aislamiento térmico para almacenamiento a largo plazo, provisto de cortina de tiras de PVC transparentes; sistema de refrigeración para proporcionar ambiente controlado ajustable de -20°C a 10°C; sistema de deshumidificación para proporcionar 30-40% de HR cuando se requiera; panel de control que muestre la temperatura y la HR, dispuesto en la parte externa.</p>	<p>BMIL International, Inc. 61 Broadway Suite 1900 New York NY 10006-2701 EUA Teléfono: (1) 212 898 9699 Fax: (1) 212 514 9234 Correo electrónico: bmil@bmil.com Página de internet: www.bmil.com</p> <p>Huurre Group Oy. PO Box 127 FIN-33101 Tampere Finlandia Teléfono: (358) 20 5555 11 Fax: (358) 20 5555 360 Correo electrónico: info@huurre.com Página de internet: www.huurre.com</p> <p>Foster Refrigerator Oldmedow Road King's Lynn Norfolk, PE30 4JU Reino Unido Teléfono: (44) 1553 691122 Fax: (44) 1553 691447 E-mail: sales@foster-uk.com Página de internet: www.fosterrefrigerator.co.uk</p> <p>Watford Refrigeration & Air Conditioning Ltd. Wiggshall Industrial Estate Watford, WD1 8AW, UK Reino Unido Teléfono: (44) 1923 227726 Fax: (44) 1923 233525 Correo electrónico: sales@watref.co.uk Página de internet: www.watref.co.uk</p>
<p>12</p>	<p>Deshumidificador</p>	<p>De tipo giratorio con gel de sílice activado de alto desempeño u otra rueda desecante.</p>	<p>Bry-Air Inc. 10793 St. Rt. 37W Sunbury, Ohio 43074 EUA Teléfono: (1) 740 965 2974 Fax: 740 965 5470 Correo electrónico: bryair1@aol.com Página de internet: www.bry-air.com</p> <p>Munters Limited, Blackstone Road Huntingdon Cambridgeshire PE29 6EE Reino Unido Teléfono: (44) 1480 432243 Fax: (44) 1480 413147 Correo electrónico: info@munters.co.uk Página de internet: www.munters.com</p>

13	Divisor de semillas	Para preparar muestras representativas a partir de muestras compuestas	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91)171 2699347 / 2699267 Fax: (91)171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p>
14	Estanterías (móviles/ fijas)	Marco móvil de acero galvanizado con recubrimiento de PVC, preferiblemente similar a los estantes de una biblioteca	<p>Crown Industrial 213 Michelle Court San Francisco, CA 94080 EUA Teléfono: (1) 650 952 5150 Fax : (1) 650 873 1495 Correo electrónico: autodora@crown-industrial.com Página de internet: www.mobileshelving.net</p> <p>Montel 225, 4th Avenue, C.P 130 Montmagny, Québec G5V 3S5 Canadá Teléfono: (1) 877 935 0236 Fax: (1) 418 248 7266 Correo electrónico: system@montel.com Página de internet: www.montel.com</p>

<p>15</p>	<p>Horno (mecánico / de convección por gravedad)</p>	<p>Rango de temperatura de 30°–200°C, con ventilador de convección y controlador de temperatura con termostato ajustable y cronómetro</p>	<p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 549 1700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Drive Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Correo electrónico: sales@fishersci.com Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171 2699347 / 2699267 Fax: (91) 171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax: (1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>
-----------	--	---	--

<p>16</p>	<p>Incubadora</p>	<p>Con control de ciclo diario que permite seleccionar temperaturas día / noche de forma independiente</p>	<p>Percival Scientific, Inc 505 research Drive Perry, Iowa 50220 EUA Teléfono: (1) 515 465 9363 Fax: (1) 515 465 9464 Correo electrónico: info@percival-scientific.com Página de internet: www.percival-scientific.com</p> <p>Weiss Gallenkemp Ltd Willowbank House 84 Station Road Marlow Buckinghamshire SL7 1NX Reino Unido Teléfono: (44) 1494 43 43 24 Fax: (44) 1494 43 43 Página de internet: www.weisstechnik.co.uk</p> <p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 549 1700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax: (1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>
<p>17</p>	<p>Instrumentos para registrar datos</p>	<p>Registro continuo de datos de temperatura y HR en cuartos fríos y congeladores y para registrar observaciones de campo.</p>	<p>OAKTON Instruments P.O. Box 5136 Vernon Hills, IL 60061 EUA Teléfono: (1) 888 462 5866 Fax: (1) 847 247 2984 Correo electrónico: info@4oakton.com Página de internet: www.4oakton.com</p>

	<p>c. Campo (sobres para semillas, bolsas de polinización, rótulos, etc.)</p> <p>d. Químicos (cloruro de tetrazolio, agar, desecantes, etc.)</p>		<p>A.P. Burt & Sons Severn Paper Mill Portishead Bristol BS20 7DJ Reino Unido Teléfono: (44) 1275 842454 Fax: (44) 1275 84 96 13</p> <p>PBS International Salter Road Scarborough YO11 3UZ Reino Unido Teléfono: (44) 1723 584091 Fax: (44) 1723 581664 Correo electrónico: pbs@duraweld.co.uk Página de internet: www.pbs.co.uk</p> <p>M/S Ajay Kumar & Co. C-149 Moti nagar Nueva Delhi 100 015 India Teléfono: (91) 11 5100776 Fax: (91) 11 5441950</p> <p>Sigma-Aldrich Servicio al cliente PO Box 14508 St. Louis, MO 63178 EUA (Ver página de internet para otros países) Teléfono: (1) 800 325 3010 Fax: (1) 800 325 5052 Página de internet: www.sigmaaldrich.com</p> <p>Merck Chemicals Ltd. Boulevard Industrial Park Padge Road, Beeston Nottingham NG9 2JR Reino Unido Teléfono: (44) 115 9430840 Fax: (44) 115 9574237 Correo electrónico: information@merckchem.co.uk</p>
19	Lámpara con lente	Limpieza de semillas	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany, OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022, W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p>

<p>20</p>	<p>Máquina para sellar (bolsas de aluminio/ latas)</p>	<p>Máquinas de calor constante que utilizan controladores termostáticos para mantener la barra a una determinada temperatura; sirven para sellar bolsas de aluminio laminadas y de otros materiales, elaboradas de capas de película plástica con diferentes propiedades y puntos de fusión</p>	<p>Bolsas de aluminio Audion Elektro BV P.O. Box 389 1380 AJ WEESP Países Bajos Teléfono: (31) 294 491717 Fax: (31) 294 491761 Correo electrónico: holland@audion.nl Página de internet: www.aud.com</p> <p>Hulme-Martin Tavak 317 Guildford Road Bisley Woking Surrey GU24 9BB Reino Unido Teléfono: (44) 1483 476767 Fax: (44) 1483 486343 Página de internet: www.hulmemartin.co.uk</p> <p>Sellador de latas: Embarcadero Home Cannery 2026 Livingston Street Oakland, CA 94606 EUA Teléfono: (1) 510 535 2311 Fax: (1) 510 535 2235 Correo electrónico: contact_ehcan@hotmail.com Página de internet: www.ehcan.com</p>
<p>21</p>	<p>Microscopio estereoscópico</p>	<p>Determinación de la calidad y sanidad de las semillas</p>	<p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 549 1700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171 2699347 / 2699267 Fax: (91) 171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax: (1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>

26	Soplador de semillas	Limpieza de semillas - separa el material liviano de las semillas	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany, OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171 2699347 / 2699267 Fax: (91) 171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p>
27	Tablas para contar semillas	Para contar y espaciar semillas grandes en un medio de siembra	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany, OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p>

<p>28</p>	<p>Tablero para determinación de pureza</p>	<p>Limpieza de semillas</p>	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany, OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p> <p>Osaw Industrial Products Pvt. Ltd. Osaw Complex, Jagadhri Road P.O. Box No. 42 Ambala Cantt. - 133 001 Haryana India Teléfono: (91) 171 2699347 / 2699267 Fax: (91) 171 2699222 / 2699102 Correo electrónico: eenquiry@indosaw.com</p>
<p>29</p>	<p>Termohigrómetro, higrotermógrafo</p>	<p>Para monitorear la temperatura y la HR en cuarto fríos</p>	<p>Cole-Parmer Instruments Co. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061-1844 EUA Teléfono: (1) 847 549 7600 Fax: (1) 847 5491700 Correo electrónico: sales@coleparmer.com Página de internet: www.coleparmer.com</p> <p>Fisher Scientific 2000 Park Land Dr. Pittsburg, PA 15275-9943 EUA Teléfono: (1) 973 467 6511 Fax: (1) 800 926 1166 Página de internet: www.fishersci.com</p> <p>Thomas Scientific P.O. Box 99 Swedesboro, NJ 08085 EUA Teléfono: (1) 800 524 0018 Fax: (1) 856 467 3087 Correo electrónico: global@thomassci.com Página de internet: www.thomassci.com</p>

30	Trilladora mecánica	Diseñada para trillar plantas y espigas de cereales de grano pequeño	<p>Hoffman Manufacturing Co. 353, 29th Ave. S.W. P.O. Box 547 Albany OR 97321 EUA Teléfono: (1) 541 926 2920 Fax: (1) 541 926 3949 Correo electrónico: info@hoffmanmfg.com Página de internet: www.hoffmanmfg.com</p> <p>Seedburo Equipment Co. 1022 W. Jackson Blvd. Chicago, IL 60607 EUA Teléfono: (1) 312 738 3700 Fax: (1) 312 738 5329 Correo electrónico: sales@seedburo.com Página de internet: www.seedburo.com</p>
----	---------------------	--	--

ANEXO V

Acrónimos

- AAG** acuerdo de adquisición de germoplasma
- ACIAR** Australian Centre for International Agricultural Research
- ACP** placa recubierta de antígeno (antigen-coated plate)
- ADN** ácido desoxirribonucleico
- AOSA** Association of Official Seed Analysts
- ARN** ácido ribonucleico
- ARS** Agricultural Research Service
- ATM** Acuerdo Estándar de Transferencia de Materiales para especies incluidas en el Anexo I del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura
- CDB** Convenio sobre la Diversidad Biológica
- CGN** Centre for Genetic Resources, Los Países Bajos
- CHS** contenido de humedad de las semillas
- CIPF** Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
- CITES** Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres
- CTA** Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale ACP-UE
- ELISA** Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas
- FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- GCAI** Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional
- GPS** sistema de posicionamiento global

GRPC	Comité de Políticas para los Recursos Genéticos
HR	humedad relativa
HRe	humedad relativa en equilibrio
IBPGR	Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (en la actualidad, Bioversity International)
ILRI	International Livestock Research Institute
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute (en la actualidad, Bioversity International)
ISTA	International Seed-Testing Association
MMO	muestra más original
NCM	membrana de nitrocelulosa
NORGEN	North American Network on Plant Genetic Resources
NPGS	National Plant Germplasm System
OMG	organismo modificado genéticamente
PBST	solución tampón de fosfato salino con Tween
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PROCINORTE	Programa de Cooperación Técnica del Instituto Interamericano de Cooperación en Agricultura (IICA) para la Región Norte
RFGAA	recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura
SPGRC	SADC Plant Genetic Resources Centre
TBIA	inmunoensayo de manchas de tejido
UPOV	Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales
WorldVeg	AVRDC—The World Vegetable Center



El IPGRI y el INIBAP
operan bajo el nombre
de Bioersity International
y están auspiciados
por el GCIAI

ISBN 978-92-9043-757-4 (para la versión en español)
ISBN 978-92-9043-740-6 (para la versión en inglés)