Capítulo VI

Protocolos de control interno para la producción de semilla

El control interno mejora el proceso de producción de semillas de acuerdo con los estándares de la normativa nacional. Para la semilla de guandul, clasificada como *seleccionada* en la Resolución ICA No. 3888 de 2015, estos estándares se aplicarían principalmente a los parámetros de porcentaje de semilla pura y porcentaje de germinación. No obstante, se recomienda adoptar y seguir procedimientos y protocolos internos que estén en línea con las normativas nacionales e internacionales vigentes, o aquellas que las sustituyan, modifiquen o actualicen, como las establecidas por la FAO, ISTA, OCDE e ICA. Esto se hace con el propósito de mantener la calidad genética, física, fisiológica y sanitaria de la semilla.

En este documento se abordan los procesos analíticos estratégicos para el control interno de calidad de semilla de guandul. Si un productor no dispone de la infraestructura, reactivos, equipos o elementos necesarios para llevar a cabo el control interno de calidad de la semilla, tiene la opción de solicitar la

realización de los análisis a cualquiera de los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Análisis de Semillas (Red-LASE) del ICA de acuerdo con las tarifas vigentes y su portafolio de servicios[1].

4.1. Protocolo de prueba de pureza varietal

Objetivos

Verificar que el cultivo exprese una identidad varietal por medio de las características de la variedad que se pretende producir; determinar el porcentaje de pureza varietal del lote de semillas; asegurar la pureza varietal y prevenir circunstancias que perjudiquen la calidad de las semillas que se van a cosechar (por ejemplo, mezclas o malezas).

Descripción

El lote de producción de semillas sujeto a inspección debe ser examinado mediante al menos una inspección cuando las condiciones del cultivo son óptimas para evaluar la identidad y la pureza varietal. En el caso de las leguminosas, la etapa de desarrollo apropiada para la inspección es la floración, ya que en esta fase las características de las variedades son más visibles (OCDE, 2021).

Alcance

Esta herramienta está dirigida a profesionales, investigadores y productores que necesiten conocer la forma adecuada de determinar la pureza varietal de un lote de semillas de guandul. Los resultados se expresan en porcentaje (%) de acuerdo con la proporción de plantas de la especie de interés. El propósito es optimizar los procesos de control interno de calidad en la producción de semillas de alta calidad. Los conceptos generales y el resumen de los métodos, procedimientos y equipos aquí referenciados forman parte de las normativas internacionales establecidas por OCDE (2021).

1 Portafolio de servicios de la Red-LASE disponible en el siguiente enlace: https://www.ica.gov.co/areas/laboratorios/laboratorio-nacional-de-semillas

Definiciones

Identidad varietal: es la descripción de las características de la variedad con base en descriptores morfológicos y genéticos.

Pureza varietal: es la proporción de plantas o semillas de la población que cumple con lo descripción de la variedad.

Impurezas varietales: son plantas o semillas con características diferentes a las de la variedad.

Materiales y métodos

- Semilla de guandul
- Establecer un cultivo
- Descriptores genéticos para esta especie publicados por la Junta Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR, 1993).

Procedimiento

En el caso del guandul en Colombia no existe semilla registrada en el Registro Nacional de Cultivares del ICA, ni productores autorizados para comercializar semilla de calidad. Por esta razón, toda la semilla disponible y utilizada en el país es de origen local y tradicional y es propiedad de los agricultores. Todas las accesiones de guandul se obtuvieron de manera legal a través de la donación de 12 accesiones, como se muestra en la figura 10, por parte de productores. Estas accesiones fueron colectadas desde la planta madre en el momento de la madurez fisiológica, antes de la diseminación natural de las semillas, con el propósito de prevenir la contaminación genética. La información sobre estas accesiones se registró en un pasaporte que describe su identidad y origen, clasificación taxonómica, estado de la población (si es silvestre, de raza local, cultivar, etc.), donante, números de identificación y datos del sitio donde se recolectaron, incluyendo latitud, longitud y elevación.

Después de obtener las semillas, se inició un ciclo de producción en el Centro de Investigación Caribia para aumentar el material disponible y llevar a cabo la caracterización morfoagronómica. La valoración de las accesiones se realizó mediante la observación directa de sus estructuras vegetativas y reproductivas, lo que implicó registrar datos fenotípicos para describir los rasgos morfológicos fácilmente observables

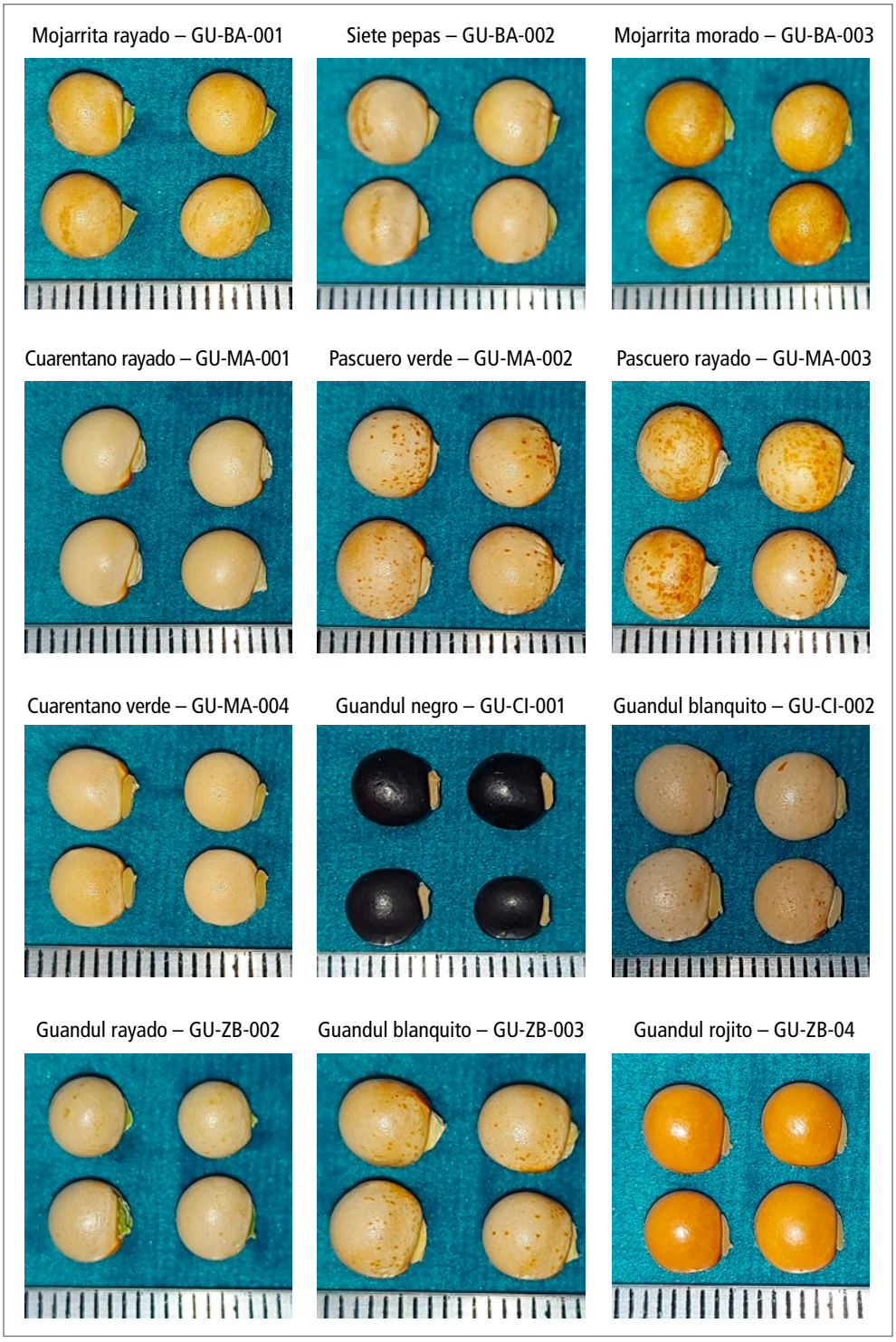

Figura 10. Genotipos de guandul de origen local en Atlántico y Magdalena.

y relativamente independientes del entorno. La evaluación inicial del material colectado se llevó a cabo siguiendo las pautas establecidas por el (IBPGR). Esta información se validó mediante parcelas de control establecidas en el Centro de Investigación Caribia de AGROSAVIA. Una vez identificadas las características de cada variedad, se procedió a identificar las plantas que no coincidían con el tipo deseado en el área de cultivo. Estas inspecciones de campo se realizaron durante la etapa de floración y fructificación. Con base en lo observado, se recomienda que la evaluación de cada planta incluya observar características como la pigmentación del cáliz, el color de la flor y la forma y color de la vaina.

Cuando se identifican las plantas fuera de tipo, es decir, aquellas que presentan características diferentes a las de la variedad de interés y se distinguen de las que sí corresponden (las puras), se cuantifican y se calcula su proporción en porcentaje en relación con el número total de plantas establecidas en el área evaluada. También es posible realizar esta prueba calculando la proporción en peso directamente con las semillas. Esto se aplica en casos en los que las características morfológicas de las semillas son considerablemente diferentes entre sí, como por ejemplo, en cuanto a su forma, patrón de coloración, color y tipo de hilum.

En este proceso, se toma una muestra representativa de la totalidad de las semillas almacenadas, a la cual se le toma el peso inicial. Luego, se separan las semillas que son consideradas fuera de tipo, es decir, que no coinciden con las características de interés (pertenecientes a otras variedades), y se registra su peso por separado. Asimismo, se pesan las semillas que se consideran puras de acuerdo con las características varietales deseadas. Después de esto, se calculan los porcentajes de los dos componentes en función de su peso.

Inspección de campo:

$$\% PV = \frac{NPP \times 100}{NTP}$$

Ecuación 1. Porcentaje de pureza varietal en campo.

PV: pureza varietal

NTP: número total de plantas

NPP: número de plantas puras

NPFT: número de plantas fuera de tipo

Inspección en laboratorio:

$$\% PV = \frac{PSP \times 100}{PMT}$$

Ecuación 2. Porcentaje de pureza varietal en laboratorio.

PV: pureza varietal

PMT: peso total muestra de trabajo

PSP: peso de semilla pura

PSFT: peso de semilla fuera de tipo

Resultados y análisis

Durante todo el desempeño del cultivo, se evaluaron las características morfológicas en cada etapa fenológica. Se utilizaron marcadores morfológicos como indicadores de la pureza varietal y se consideraron aspectos como la forma, la apariencia (el color o patrón de manchado) y el peso o tamaño de las semillas, tal como se recomienda en las directrices del IBPGR (1993). Además, se realizó una caracterización morfológica con base en lo propuesto por Arenas et al. (2022b).

El cálculo para determinar el porcentaje de pureza varietal se puede realizar utilizando los datos de una muestra de trabajo de la semilla almacenada de guandul que pesa 300 g. En este proceso, se registra el peso de cada componente una vez que se ha llevado a cabo la separación de las semillas fuera de tipo (5 g) y de las que se consideran puras (295 g). Al aplicar la fórmula correspondiente, se estima que el resultado del porcentaje de pureza varietal de la muestra corresponde a un 98,3 %.

$$PV = \frac{295\ g \times 100}{300\ g}$$

$$\% PV = \frac{29500}{300}$$

$$\% PV = 98{,}3$$

4.2. Protocolo de obtención de muestras para análisis de calidad

Objetivos

Obtener una muestra representativa de un lote de semillas de guandul y constituir muestras de trabajo para análisis de calidad.

Descripción

La toma de muestras de semillas exige un conocimiento profundo de las normas y métodos que se van a aplicar. Por ello, conocer los conceptos generales, métodos, procedimientos y equipos referenciados en las reglas internacionales adoptadas por ISTA permite establecer el tamaño de la muestra para realizar los análisis de laboratorio y así determinar la calidad del lote de semillas.

Alcance

Esta herramienta forma parte del esquema de aseguramiento de la calidad física y fisiológica de la semilla de guandul. Su objetivo es proporcionar a profesionales, investigadores y productores la información necesaria sobre cómo tomar una muestra representativa de un lote de semillas. Esto se hace de acuerdo con el número de muestras primarias y el tamaño máximo del lote establecido por ISTA para la especie (20.000 kg). El propósito de esta guía es optimizar los procesos de control interno de calidad en la producción de semillas de alta calidad.

Definiciones

Lote de semillas: se refiere a una cantidad de semillas homogéneas, identificables, de una misma variedad, con un origen e historia conocidos y que ha pasado por procesos dentro del esquema de producción ante el ICA.

Muestreo: es la metodología utilizada para obtener una muestra representativa del lote de semillas con el propósito de realizar análisis y evaluaciones.

Muestra primaria: una porción de semillas tomada de un lote de semillas.

Muestra compuesta: una porción de semillas resultante de la mezcla de muestras primarias.

Muestra enviada: es una muestra despachada a un laboratorio para su análisis.

Muestra de trabajo: es una muestra obtenida en el laboratorio a través de un método de reducción apropiado y a partir de la muestra enviada que se utiliza para realizar análisis de calidad.

Procedimiento

El lote de semillas estará representado por una pequeña cantidad de semillas (la muestra) que permita realizar los análisis en el laboratorio y obtener resultados sobre la calidad de las muestras enviadas para análisis. Por ejemplo, una muestra de 20.000 kg de semilla de guandul proveniente de un lote puede contener 166.666.666 semillas (con un peso de 1.000 semillas igual a 120 g). De esta cantidad, se deben enviar 1.000 g al laboratorio para hacer el análisis de calidad. En el laboratorio, se toman 300 g de esta muestra para llevar a cabo el análisis de pureza (2.500 semillas), mientras que los 700 g restantes se examinan para el conteo de otras semillas y la determinación del contenido de humedad. Además, se toman 400 semillas del componente de semilla pura clasificado en el análisis de pureza física para realizar el análisis de germinación.

El muestreador de semillas debe:

a) Asegurarse de que la muestra que se va a analizar (o la que será enviada al laboratorio de análisis de semillas), represente con precisión el lote de semillas en cuestión.

b) Verificar que el lote de semillas sea lo más uniforme posible (homogéneo) mediante la inspección de los envases unitarios.

c) Seguir el plan de muestreo en almacenamiento y la obtención de muestras de trabajo en el laboratorio para el análisis de calidad de acuerdo con lo especificado por ISTA y representado en la figura 11.

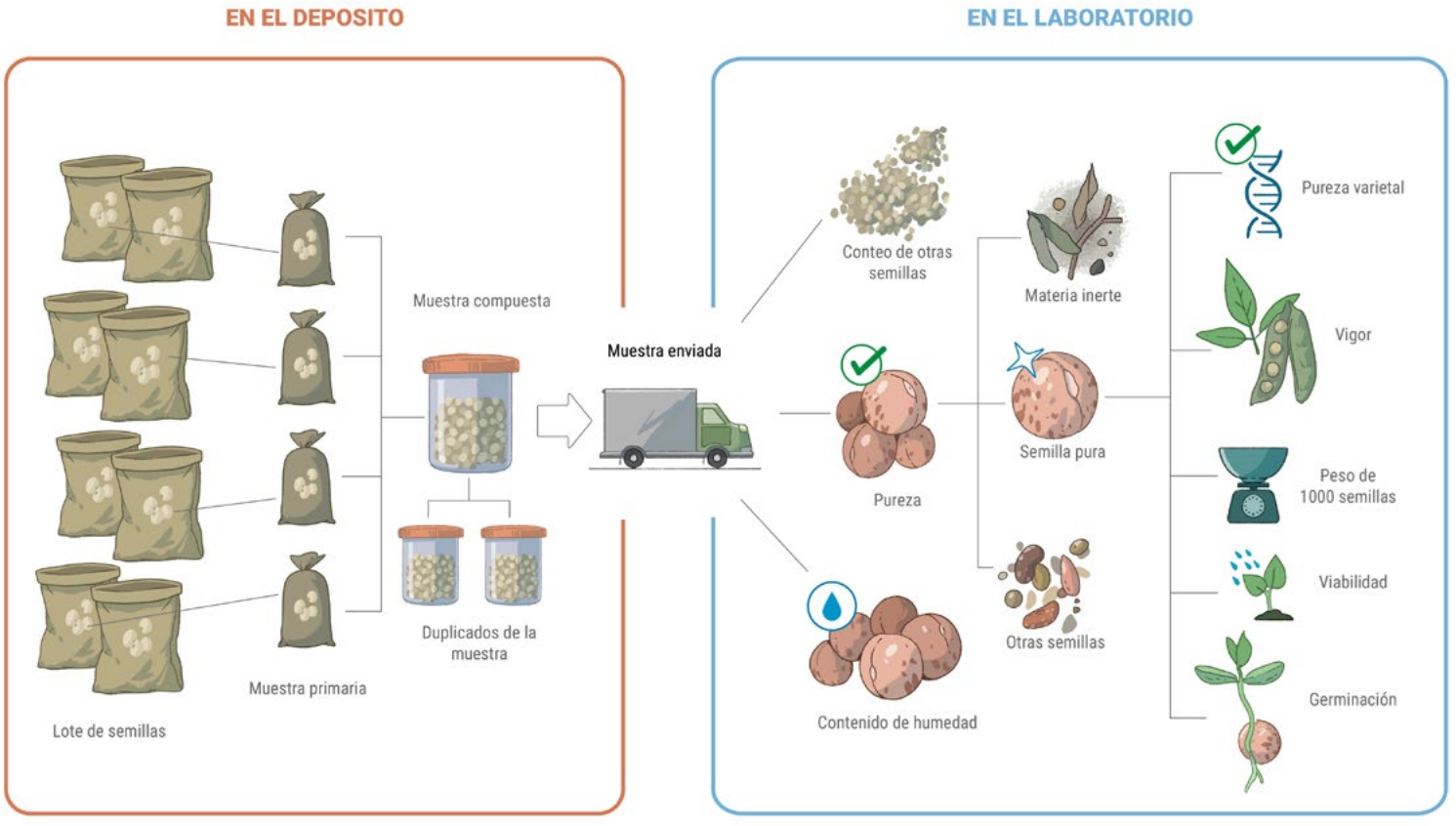

Figura 11. Plan de muestreo propuesto por el ISTA en el almacén y el laboratorio.

Fuente: Elaboración propia con base en FAO (2006) y FAO & AfricaSeeds (2019)

Es importante implementar la intensidad de muestreo adecuada para el tamaño del lote y el tipo de contenedor (bolsas, sacos o envases) en el que se almacene la semilla. Para el tamaño de la semilla del guandul se sugiere usar contenedores con capacidad de menos de 15 kg y considerar cada uno de estos como una unidad de muestreo, como se expresa en la tabla 20.

Tabla 20. Intensidad mínima de muestreo de lotes de semillas de guandul

Peso de cada contenedor en el lote de semillas	Número de contenedores	Número de la muestra primaria
Contenedores < 15 kg	1–4	3 de cada contenedor
	5-8	2 de cada contenedor
	9–15	1 de cada contenedor
	16-30	15 del lote de semillas
	31-59	20 del lote de semillas
	≥ 60	30 del lote de semillas

Fuente: Elaboración propia con base en FAO (2006) y FAO & AfricaSeeds (2019)

Los métodos más adecuados para obtener muestras de semillas de leguminosas son los manuales. Estos pueden mitigar el daño mecánico por golpes al que sería sometida la semilla si el procedimiento se realiza con herramientas como cuarteadores de suelo, divisores cónicos o centrífugos. Para realizar la toma de muestras primaria se recomienda el muestreo manual, en el cual se introduce la mano abierta en la bolsa para tomar la muestra y se retira con los dedos cerrados para continuar el proceso analítico, como se ilustra en la figura 12. Para obtener una muestra compuesta, se combinan las muestras primarias, y durante el proceso de muestreo, se verifica la homogeneidad de las muestras primarias.

Figura 12. Muestra primaria de semilla. a. Introducir la mano cerrada y abrirla dentro de la bolsa; b. Cerrar la mano con un puñado de semillas; c. Retirar la mano con el puño cerrado y la muestra de semillas.

Una muestra para enviar es aquella que se remite al laboratorio. En el caso del guandul, la muestra debe pesar mínimo 1.000 g. A partir de estos, deben obtenerse las muestras de trabajo mediante mezclas y reducciones que facilitarán el proceso de homogeneización para llevar a cabo los análisis de calidad, como se ilustra en la figura 13.

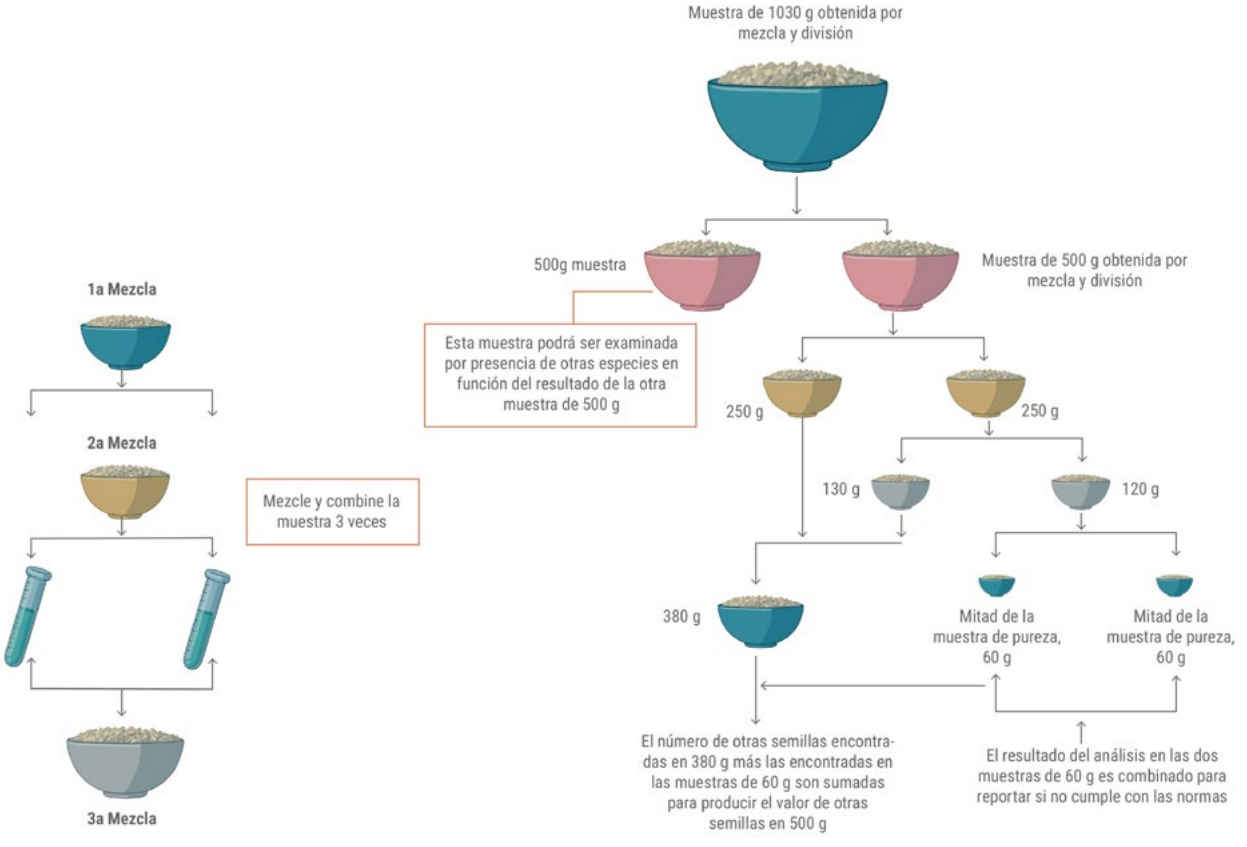

Figura 13. Procedimiento para obtener una muestra de trabajo para los análisis de calidad de semillas de guandul.

Fuente: Elaboración propia con base en FAO (2006) y FAO & AfricaSeeds (2019)

4.3. Protocolo de pureza física

Objetivo

Determinar la composición porcentual por peso de la muestra de análisis y, por deducción, la composición del lote de semillas, incluyendo la proporción de semilla pura, otras semillas y materia inerte.

Descripción

La muestra de análisis debe ser examinada de acuerdo con los requisitos generales establecidos en el reglamento del ISTA. La muestra de trabajo se divide en tres componentes: semilla pura, otras semillas y materia inerte. La cantidad o su porcentaje en peso debe determinarse con el método y equipos apropiados para la especie.

Alcance

Este documento es una herramienta del esquema de aseguramiento de la calidad física de semilla de guandul y se escribió con el objetivo de que profesionales, investigadores y productores conozcan la forma adecuada de determinar la composición física de un lote de semillas. Los resultados se expresan en el porcentaje de sus componentes para optimizar los procesos de control interno de calidad en la producción de semillas de calidad.

Definiciones

Semilla pura: en el caso del guandul, se consideran semillas puras aquellas que están intactas, con una porción del tegumento adherido y fragmentos de semillas de más de la mitad del tamaño original, siempre que una porción del tegumento permanezca adherida (ISTA, 2018).

Otras semillas: unidades de semilla de cualquier especie vegetal distinta a la de la semilla pura (guandul). Se tratan de identificar a nivel de especie, pero se reporta únicamente el género.

Materia inerte: unidades de semilla y toda la otra materia, por ejemplo:

- Los cotiledones separados son considerados materia inerte independientemente de si contienen o no el eje plúmula-radícula o conservan más de la mitad de la testa unida.
- Semillas de guandul y fragmentos de semillas totalmente sin tegumento.
- Fragmentos de las semillas puras (cotiledones y tegumentos) que sean iguales o menores a su tamaño original.
- Partículas de suelo, arena o piedras.
- Fragmentos de plantas como paja, tallos, hojas o flores.
- Insectos adultos vivos o muertos, pupas, ninfas, larvas o fragmentos de estos.
- Grumos de mohos u otro material extraño.

Materiales y equipos

- Mesa o mesón es el espacio adaptado para el análisis de pureza y es el principal instrumento. Preferiblemente, la superficie debe tener un color que contraste con el de las semillas.
- La lámpara de luz fría, las lupas y el estereoscopio suelen ser utilizados para la identificación exacta y la separación de semillas pequeñas y los fragmentos.
- Pinzas, cajas de Petri, bandejas contenedoras y brochas o pinceles.
- Balanza.

Procedimiento

Se debe identificar la muestra de trabajo con el código o nombre que se asignará durante el proceso de recepción (figura 43a). Luego, se separan las fracciones de semilla pura, otras semillas y materia inerte (figura 14b), y se determina el peso de la muestra de trabajo con una balanza analítica, en este caso, 960 g. De la misma manera, se pesan los demás componentes (figura 14c y 14d) para realizar el análisis de pureza física para semillas de guandul. Según ISTA (2018), para guandul, la muestra mínima corresponde a 300 g, y para ≥2.500 semillas, el peso máximo es de 1.000 g.

Figura 14. Proceso para realizar el análisis de pureza física. a. Identificación de la muestra de trabajo de semillas de guandul que pesan 960 g; b. Separación de la muestra de trabajo en las fracciones semilla pura, otras semillas y materia inerte; c. Otras semillas = Y (0,025 kg o 25 g); d. Materia inerte = Z (0,020 g o 20 g).

Resultados y análisis

Se expresan como un porcentaje con un decimal. El segundo decimal se redondea hacia abajo si es 4 o menos (30,34 será 30,3) y hacia arriba si es 5 o más (30,36 será 30,4). Además, el resultado de todos los componentes debe sumar 100 (tabla 21).

- Los porcentajes se calculan en función de la suma de los pesos de los componentes (semilla pura, otras semillas y materia inerte), no en relación con el peso inicial de la muestra de trabajo. Aun así, se debe comparar la suma de los pesos de los componentes con el peso inicial para verificar posibles pérdidas de material u otros errores.

- Los componentes con un valor calculado menor a 0,05 % se reportarán como "trazas".

- Los porcentajes de semilla pura, otras semillas y materia inerte se anotan en los espacios correspondientes del *Certificado de análisis*. Si el resultado de un componente es nulo se expresará como — 0 — en el espacio que le corresponda.

Tabla 21. álculo de resultados de análisis de pureza física de semillas de guandul.

Componentes	Peso (g)	Cálculo	Porcentaje (%)
Semilla pura	X = 915	(X × 100) ÷ W (915 × 100) ÷ 960	95,31
Otras semillas	Y = 25	(Y × 100) ÷ W (25 × 100) ÷ 960	2,60
Materia inerte	Z = 20	(Z × 100) ÷ W (20 × 100) ÷ 960	2,08
Total muestra de trabajo	W = 960	(W × 100) ÷ W (960 × 100) ÷ 960	100

Fuente: Elaboración propia

Se deben registrar el nombre latino de las especies de semilla pura, las clases de la materia inerte y el nombre latino de cada especie de otras semillas. Los resultados consolidados se anotan en la hoja de trabajo o el certificado de análisis, como se ejemplifica en la tabla 22.

Tabla 22. Cálculo y registro de resultados de análisis de pureza física

Responsable: Sheilla Moreno		**Año:** 2023	**Mes:** 06		**Día:** 17	
Componente	**Peso (g)**	**Porcentaje (%)**	**Descripción de otras semillas:** *Phaseolus*			
			Descripción de Materia inerte			
Muestra Trabajo:	960		Partes de plantas	X	Insectos	X
Semilla pura:	915	95,31	Partes de semillas	X	Tierra	
Materia Inerte:	25	2,60	Semillas vanas		Piedras	
Otras semillas:	20	2,08	Semillas sin tegumento	X	Polvo	
Total	960	100,0	Tegumento	X	Otros	
Observaciones:						

Fuente: Elaboración propia

4.4. Protocolo de determinación del contenido de humedad de semillas

Objetivo

Determinar, mediante el método de referencia, el contenido de agua o humedad presente en las semillas de guandul y expresarlo en porcentaje.

Descripción

La determinación del contenido de humedad es un proceso que califica la calidad de la semilla en cuanto a su atributo físico. Para llevar a cabo esta evaluación, se utiliza el método de referencia conocido como método del horno. Este procedimiento implica la medición de la pérdida de peso de una muestra de semilla que ha sido molida, tamizada y expuesta a una temperatura de 130 °C durante 1 hora.

Alcance

Este procedimiento se aplica dentro de las evaluaciones de calidad física de la semilla de guandul, con el propósito de determinar el grado de humedad en una muestra de semilla durante la cosecha y los procesos de beneficio y almacenamiento.

Definiciones

Humedad de una muestra de semillas: corresponde al contenido de agua de la muestra y se determina por la pérdida de peso de la muestra cuando se seca. Su valor se expresa en porcentaje del peso de la muestra original.

Muestra: unidades de una población de semillas que se manipulan para estimar las características del conjunto.

Materiales, equipos e infraestructura

- Muestra de semilla de guandul destinada al análisis de humedad, preferiblemente contenida en un recipiente hermético para evitar ganancia o pérdida de humedad ambiental.
- Recipientes metálicos resistentes a temperatura de 130 °C.
- Tamices metálicos con orificios de 4 mm y 2 mm.
- Molino.
- Horno eléctrico de convección mecánica con capacidad para alcanzar una temperatura de hasta 130 °C.
- Balanza electrónica con resolución de tres dígitos (0,001).
- Olla de secado.
- Gránulos de silica gel.

Procedimiento

El método de referencia para la determinación del contenido de humedad recomendado por ISTA es el método de horno (ISTA, 2016; Rao et al., 2007). Consiste en eliminar el agua de la semilla mediante calor durante un período específico, como se ilustra en la figura 15. Se toman dos submuestras de aproximadamente 10 g cada una (figura 15a), las cuales se muelen en un molino previamente ajustado (figura 15b). Posteriormente, se pasan por un juego de tamices de 4 mm y 2 mm (figura 15c), y el residuo resultante del molido que queda retenido en el tamiz de 2 mm (figura 15d) se utiliza como muestra. En este caso, el peso reportado de la muestra es de 4,5 g (figura 15e). La muestra se pone en un recipiente metálico que ha sido previamente pesado (P1) en una balanza

de tres decimales (figura 15f). Se registra el peso húmedo de la muestra molida junto con el recipiente en cada repetición. Luego, se ubican los recipientes destapados con las muestras molidas en una olla de secado que contiene sílice gel en el fondo (figura 15g). Después, los recipientes se sacan y se ponen en un horno previamente calentado a una temperatura de 130 °C durante 1 hora (figura 15h). Posteriormente, se retiran para llevar a cabo el proceso de preenfriamiento en la olla de secado durante 30 minutos (figura 15i). Finalmente, se pesan nuevamente los recipientes con la muestra de semilla secada al horno en la balanza de tres dígitos (P2).

Figura 15. Procedimiento para determinar el contenido de humedad en semillas de guandul. a. Pesaje de la muestra de semilla que se va a moler; b. Molienda de la muestra de semilla; c. Tamizado de la muestra de guandul; d. Residuo de la molienda en el tamiz de 2 mm; e. Pesaje del residuo del tamiz denominado 4,5 g; f. Pesaje del residuo del tamiz en recipiente metálico denominado P1 = 36,3; g. Extracción de la humedad de la muestra en olla con silica gel; h. Secado en horno de la muestra a 130 °C; i. Secado de la muestra en olla con silica gel por 30 minutos.

Resultados

El contenido de humedad (CH) se calcula para cada repetición y se expresa en porcentaje con un decimal. Se calcula mediante la ecuación 3 (ISTA, 2016). El resultado es el promedio de las dos repeticiones y no debe existir una diferencia de ±0,2; en caso de existir, la prueba debe ser repetida nuevamente.

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

Ecuación 3. Porcentaje de contenido de humedad.

P1: peso vacío del recipiente con tapa.

P2: peso del recipiente y muestra molida antes de secado.

P3: peso del recipiente y muestra después de secado.

En la tabla 23 se presenta un ejemplo con los datos del contenido de humedad de una muestra de guandul, con un porcentaje de humedad del 11,4 %.

Tabla 23. Ejemplo del registro de los datos de la evaluación del contenido de humedad en una muestra de semilla de guandul

Determinación del contenido de humedad					
Responsable: Luis Díaz			**Año:** 2023	**Mes:** 06	**Día:** 17
Tipo de Molido: Grueso		**Temperatura (°C):** 130		**Tiempo (h):** 1	
Repetición	**Peso recipiente P1 (g)**	**Peso húmedo P2 (g)**	**Peso seco P3 (g)**	**Humedad (%)**	**CH (%)**
1	36,621	40,790	40,309	11,5	**11,4**
2	35,699	39,960	39,479	11,3	

Tipo molido: Sin molido (NO); Fino o Grueso

Fuente: Elaboración propia

4.5. Protocolo de ensayos de germinación

Objetivos

Indicar las condiciones para realizar la evaluación de la calidad fisiológica de semillas de guandul mediante la prueba de germinación y determinar el poder germinativo de una muestra de semillas de guandul a través de esta prueba.

Descripción

El atributo de calidad fisiológica está relacionado con la capacidad que tienen las semillas para producir plántulas normales capaces de establecerse en campo. La forma adecuada de evaluar esto es a través de una prueba de germinación. Esta prueba consiste en poner las semillas en un sustrato y proporcionarles condiciones óptimas de temperatura, luz y humedad durante un período de tiempo corto que permita el crecimiento y desarrollo de las estructuras fundamentales de una plántula.

Alcance

Este protocolo tiene como objetivo describir la metodología y condiciones para evaluar la calidad fisiológica de una muestra de semillas de guandul mediante una prueba de germinación. Esta metodología puede ser aplicada por cualquier persona sin necesidad de un equipo complejo o un laboratorio de análisis de semillas, manteniendo al mismo tiempo la precisión técnica y asegurando la validez de los resultados.

Definiciones

Dicotiledónea: grupo de plantas en las cuales el embrión tiene dos cotiledones (Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero [INSPV], 1980).

Embrión: planta inicial contenida en la semilla, constituida de un eje y cotiledones (INSPV, 1980).

Epicótilo: parte de la plántula ubicada por encima de los cotiledones y debajo de la yema apical (INSPV, 1980).

Germinación: proceso biológico que conduce al desarrollo de una plántula a partir de una semilla. La germinación de una semilla es el surgimiento y desarrollo de la plántula hacia una etapa en que todos sus órganos y estructuras son capaces de desarrollar una planta normal bajo las condiciones de campo (INSPV, 1980).

Germinación hipogea: forma de germinación en la que los cotiledones permanecen al interior de la semilla en la parte baja de la plántula y la yema apical es elevada por el crecimiento del epicótilo (INSPV, 1980).

Imbibición: proceso físico-biológico que consiste en el ingreso del agua en la semilla (proceso físico de absorción) y su redistribución dentro de la misma (proceso biológico de adsorción).

Prueba de germinación: procedimientos realizados al embrión que se encuentra en un estado de latencia dentro de la semilla mediante cuales se reactiva el crecimiento y el desarrollo para formar una nueva plántula bajo las condiciones ambientales establecidas (Rao et al., 2007).

Plántula: planta joven desarrollada a partir del crecimiento del embrión de la semilla (INSPV, 1980).

Plántula normal: plántula en las que todas las estructuras fundamentales están completas, desarrolladas y sanas (INSPV, 1980).

Plántulas anormales: plántula que está dañada, con malformaciones o infectada a tal punto que impide su crecimiento normal (INSPV, 1980).

Semillas duras: presentan una cutícula seminal impermeable debido al alto contenido de lignina, lo cual impide el intercambio gaseoso y de humedad entre el embrión y el ambiente circundante. Este atributo es común en semillas de la familia Fabaceae, como se ha señalado previamente (Rao et al., 2007).

Semillas frescas: presentan una apariencia sana, limpia y firme y tienen la capacidad de absorber agua cuando se les suministra (Rao et al., 2007).

Semillas muertas: exhiben pérdida de calidad, firmeza y forma, ya que se decoloran, son suaves al tacto, en algunos casos están contaminadas y sus órganos vegetativos no se desarrollan (Rao et al., 2007).

Materiales y equipos

- Muestra de semilla pura de guandul obtenida a partir del *Protocolo de pureza física*. Debe contener un mínimo de 100 semillas y un máximo 400.
- Papel de germinación o toalla de papel, preferiblemente gruesa.
- Arena de río o suelo en caso de no contar con arena.
- Recipientes de plástico o aluminio rectangulares o cuadrados de una altura mínima de 10 cm con capacidad de 500 a 1.000 ml.
- Bolsa plástica con sello hermético.
- Cernidor, malla zaranda o tamiz con un tamaño de orificio 2 mm.
- Pinzas.
- Marcador, cinta de enmascarar, rotulador o cualquier elemento que permita identificar las muestras de evaluación.
- Termómetro de máximas y mínimas.
- Cuarto de germinación o cámara climática, con la capacidad de controlar temperatura y luz.

Procedimiento

La prueba de germinación para semillas de guandul contempla emplear papel o arena como sustrato, temperatura alterna de 20 a 30 °C o continua de 25 °C y luz por lo menos 8 horas al día. Las evaluaciones se realizan al cuarto y décimo día después de haber montado la prueba (ISTA, 2016; Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [MAPA], 2009). A continuación, se describen los requerimientos para cumplir con el objetivo del método de análisis.

Prueba de germinación en arena o suelo

Para el análisis de germinación de semillas de guandul se utiliza arena de río como sustrato (figura 16b). Se debe evitar la contaminación de la prueba por la presencia de semillas infectadas y, de esta forma, permitir una adecuada evaluación de las plántulas obtenidas. Es preferible utilizar arena de río cernida en una zaranda o tamiz de 2 mm (figura 16a) con el fin de proporcionar alta porosidad para retención de aire y agua que facilite el desarrollo de las raíces de las plántulas.

Después de garantizar las condiciones mencionadas previamente, se debe seguir el siguiente procedimiento con precisión:

1. Depositar arena en cuatro recipientes de plástico o aluminio hasta una altura de aproximadamente 3 cm.

2. Humedecer la arena con agua sin formar encharcamiento.

3. Luego, depositar la muestra de semilla pura de guandul obtenida en el *Protocolo de pureza física*.

4. Separar al azar en cuatro grupos de 25, 50 o 100 unidades, según la disponibilidad de semillas. No es necesario realizar selección de las mejores semillas, ya que es una muestra aleatoria.

5. Identificar cada recipiente con el nombre y repetición correspondiente de la muestra de semilla.

6. Ubicar y distribuir cada grupo de semillas en los recipientes con arena de manera que se mantenga una distancia equivalente a dos veces su tamaño entre cada semilla (figura 16c).

7. Tapar las semillas con una capa de arena de aproximadamente 1 cm.

8. Cubrir los recipientes durante los 2 primeros días de la prueba o mantenerlos dentro de una bolsa plástica con cierre hermético para mantener la humedad.

9. Ubicar los recipientes en la cámara climática previamente programada a la temperatura recomendada para las semillas de guandul. Establecer la temperatura alterna entre 20 °C y 30 °C significa que durante 16 h estará a 20 °C y durante 8 h a 30 °C. También se puede proporcionar una temperatura continua de 25 °C durante las 24 h del día.

10. En caso de no contar con un equipo que permita garantizar estas condiciones de temperatura, es posible ubicar los recipientes en un lugar donde la temperatura sea lo más cercana posible a la recomendada. En este caso, se sugiere monitorear la temperatura con un termómetro de máximas y mínimas.

11. Destapar los recipientes después de transcurridos dos días desde la siembra de las semillas y, si es necesario, adicionar agua durante el transcurso de la prueba para mantener la humedad adecuada.

Figura 16. Procedimiento del montaje de la prueba de germinación en arena de río para semillas de guandul. a. Tamizado de la arena de río en tamiz de 2 mm; b. Arena de río cernida y óptima para realizar prueba de germinación de guandul; c. Ubicación de las semillas para la prueba de germinación sobre arena de río.

Evaluación de la prueba

Las semillas de guandul pertenecen al grupo de las dicotiledóneas con germinación hipogea, lo cual significa que los cotiledones permanecen en el suelo dentro de la semilla mientras que la parte aérea de la planta o yema apical está por encima debido al alargamiento del epicótilo con desarrollo de hojas, lo que resulta en una plántula normal (figura 17). La raíz principal puede o no estar presente, o presentar deterioro y ser reemplazada por raíces secundarias (INSPV, 1980).

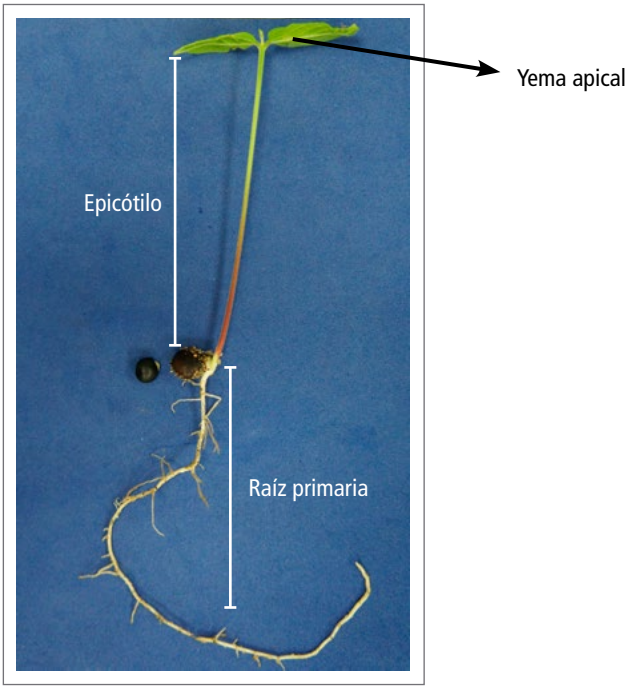

Figura 17. Características de la plántula normal de guandul.

Transcurridos 10 días desde el día siguiente a la siembra de las semillas de guandul en arena de río, se retiran cuidadosamente una por una las plántulas obtenidas (figura 18a) y se procede a evaluarlas para clasificarlas como normales o anormales. Una plántula se considera anormal si no desarrolla alguna de sus estructuras morfológicas o presenta algún defecto que impida su crecimiento en condiciones naturales. Estas plántulas anormales pueden caracterizarse por la ausencia del sistema radicular (raíz primaria y secundarias) (figura 18b), que puede estar necrótico, amarillo o blanco. Además, pueden presentar un epicótilo corto o grueso, retorcido en forma de espiral (figura 18c), con signos de ahilamiento o grietas profundas sin cicatrizar. También pueden estar rotas, atrapadas en la cubierta seminal, mostrar geotropismo negativo o estar descompuestas debido a una infección de la semilla (INSPV, 1980).

Para la evaluación de las semillas sin germinar, se recomienda utilizar un colador que permita el paso del sustrato y la retención de las semillas sin germinar (figura 18e). Según ISTA (2016) y Rao et al. (2007), estas se clasifican en frescas, duras, muertas y anormales (figura 18f). La diferencia en las dos primeras se encuentra en la capacidad de absorción de agua. Las semillas frescas pueden absorber agua, pero no germinan debido a un bloqueo, mientras que las semillas duras no pueden absorber agua debido a la impermeabilidad de su cubierta. Las semillas muertas, por otro lado, son blandas y presentan signos de descomposición. Por lo general, en las pruebas de germinación en arena, las semillas muertas se observan como grumos o aglomeraciones que parecen bolas de arena (figura 18d).

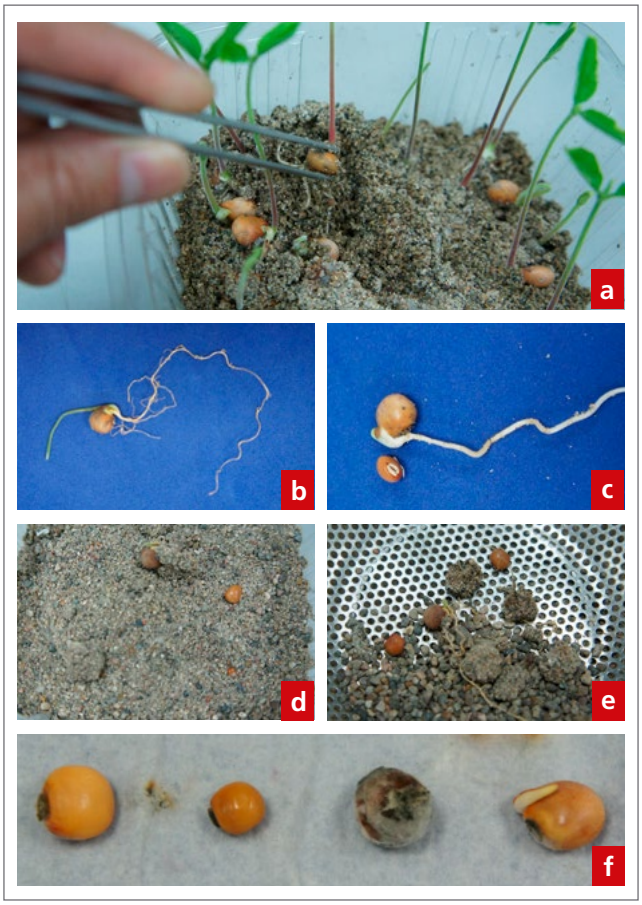

Figura 18. Evaluación de la prueba de germinación de guandul. a. Evaluación de plántulas de guandul a los 10 días de germinación; b. Plántula anormal de guandul, sin desarrollo de epicótilo ni yema apical; c. Plántula anormal de guandul con desarrollo débil del epicótilo y ausencia de yema apical; d. Semillas sin germinar en la prueba de germinación; e. Colado de las semillas que quedaron después de retirar las plántulas de la prueba de germinacón en arena; f. Semillas obtenidas en la evaluación, de izquierda a derecha: semillas frescas (SF), duras (SD), muertas (SM) y plántula anormal (PA).

Resultados

Los datos de plántulas normales, anormales, semillas frescas, duras y muertas se registran para cada repetición en la hoja de trabajo (tabla 19). El porcentaje de germinación se calcula tomando como base el número de plántulas normales utilizando la ecuación 4.

$$PG\ (\%) = \left(\frac{PNR1 + PN\ R2 + PN\ R3 + PN\ R4}{Total\ de\ semillas\ sembradas}\right) * 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de germinación.

PG: porcentaje de germinación PN: plántulas normales R: repetición

Ejemplo: para ilustrar el registro de datos y la aplicación de la fórmula para el cálculo del porcentaje de germinación, se toman los datos de la tabla 24, que corresponde a una prueba de semillas de guandul en arena con cuatro repeticiones de 50 semillas a una temperatura continua de 25 °C. El resultado del porcentaje de germinación fue 65 %.

$$PG\ (\%) = \left(\frac{30 + 35 + 35 + 30}{200}\right) * 100$$

$$PG\ (\%) = \left(\frac{130}{200}\right) *\ 100$$

$$PG\ (\%) = (0{,}65) * 100$$

$$PG\ (\%) = 65$$

Para calcular el porcentaje de las otras variables se aplica la misma fórmula sustituyendo los datos de cada una (plántulas anormales, semillas, frescas, duras y muertas) por repetición, tal como se muestra en el ejemplo de la tabla 24, así:

$$An\ (\%) = \left(\frac{PAnR1 + PAn\ R2 + PAn\ R3 + PAn\ R4}{Total\ de\ semillas\ sembradas}\right) * 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de otras variables.

$$An\ (\%) = \left(\frac{10 + 7 + 5 + 10}{200}\right) * 100$$

$$PAn\ (\%) = 16$$

$$SD\ (\%) = \left(\frac{SdR1 + SdR2 + SdR3 + SdR4}{Total\ de\ semillas\ sembradas}\right) * 100$$

SD: porcentaje de semillas duras SD: semillas duras R: repetición

$$SD\ (\%) = \left(\frac{5 + 4 + 5 + 4}{200}\right) * 100$$

$$SD\ (\%) = 9$$

$$SM\ (\%) = \left(\frac{SmR1 + SmR2 + SmR3 + SmR4}{Total\ de\ semillas\ sembradas}\right) * 100$$

SM: porcentaje de semillas muertas SM: semillas muertas R: repetición

$$SM\ (\%) = \left(\frac{5 + 4 + 5 + 6}{200}\right) * 100$$

$$SM\ (\%) = 10$$

Al finalizar la evaluación, la sumatoria de plántulas normales, anormales, semillas frescas, duras y muertas, debe ser igual al número de semillas analizadas en cada repetición. Asimismo, la suma del porcentaje de cada variable debe ser de 100.

Tabla 24. Registro de datos obtenidos en una prueba de germinación de semillas de guandul

Análisis de germinación									
Fecha inicio año: 2022		Mes: 06	Día: 20	Fecha finalización año: 2022			Mes: 06		Día: 30
No Repeticiones: 4	Semillas/ repetición: 50		Temperatura (°C): 25		Sustrato: arena		Días de evaluación: 10		
Evaluación Plántulas Normales					Plántula anormal	Semillas			Total
Repetición	Primera	Segunda	Tercera	Total		Frescas	Duras	Muertas	
1	30				10	0	5	5	50
2	35				7	0	4	4	50
3	35				5	0	5	5	50
4	30				10	0	4	6	50
Total	130				32	0	18	20	200
Porcentaje (%)	65				16	0	9	10	100
Germinación (%)			65		Responsable: Luis Díaz				

Sustratos: entre papel (EP); sobre papel (SP); suelo (S); arena (A)

Fuente: Elaboración propia

Prueba de germinación entre papel

De acuerdo con la normatividad ISTA, consiste en ubicar las semillas entre una doble capa de papel humedecida con capacidad para retener el agua y que permita que las raíces crezcan. El sustrato ideal para llevar a cabo la prueba es el papel de germinación que se caracteriza por no ser tóxico para las plantas, absorber y suministrar humedad suficiente para que las semillas germinen, ser resistente (no se deshace mientras se manipula y no lo penetran las raíces de las plántulas en desarrollo) y su pH entre 6 y 7.

A continuación, se encuentran las instrucciones para llevar a cabo la prueba de germinación:

1. Marcar el papel de manera que corresponda a una muestra y repetición única (figura 19a).

2. Humedecer el papel sin que se formen películas de agua. Si se utiliza papel de germinación, añadir agua en una cantidad equivalente a 2,5 veces el peso del papel.

3. Ubicar y distribuir las semillas sobre el papel marcado, de manera que la identificación se encuentre en la cara opuesta a donde se colocan las semillas. En la primera hilera, comenzar a 6 cm del borde superior y a 7 cm del borde lateral izquierdo del papel. La quinta hilera no debe estar a menos de 12 cm del borde inferior (figura 19b).

4. Cubrir las semillas con una segunda capa de papel (figura 19c).

5. Realizar un doblez a lo largo de uno de los extremos de la doble capa de papel para formar la base, evitando que las semillas se salgan del papel (figura 19d).

6. Fijar los rollos en uno de los extremos con una banda elástica.

7. Colocar los rollos de papel de forma vertical con la base en la parte inferior dentro de una bolsa con sello hermético que tenga medidas de 41,5 cm x 13,5 cm (figura 19e).

8. Llevar los rollos a una cámara climática programada para mantener una temperatura continua de 25°C durante las 24 horas del día. La temperatura puede programarse entre 20 y 35°C. Además, proporcionar un fotoperíodo de 12/12 horas con luz de día de 5000 K (figura 19f).

9. Como alternativa, si no se dispone de una cámara climática, ubicar los rollos en un ambiente donde la temperatura sea lo más cercana posible a la recomendada y monitorear la temperatura con un termómetro de máximas y mínimas.

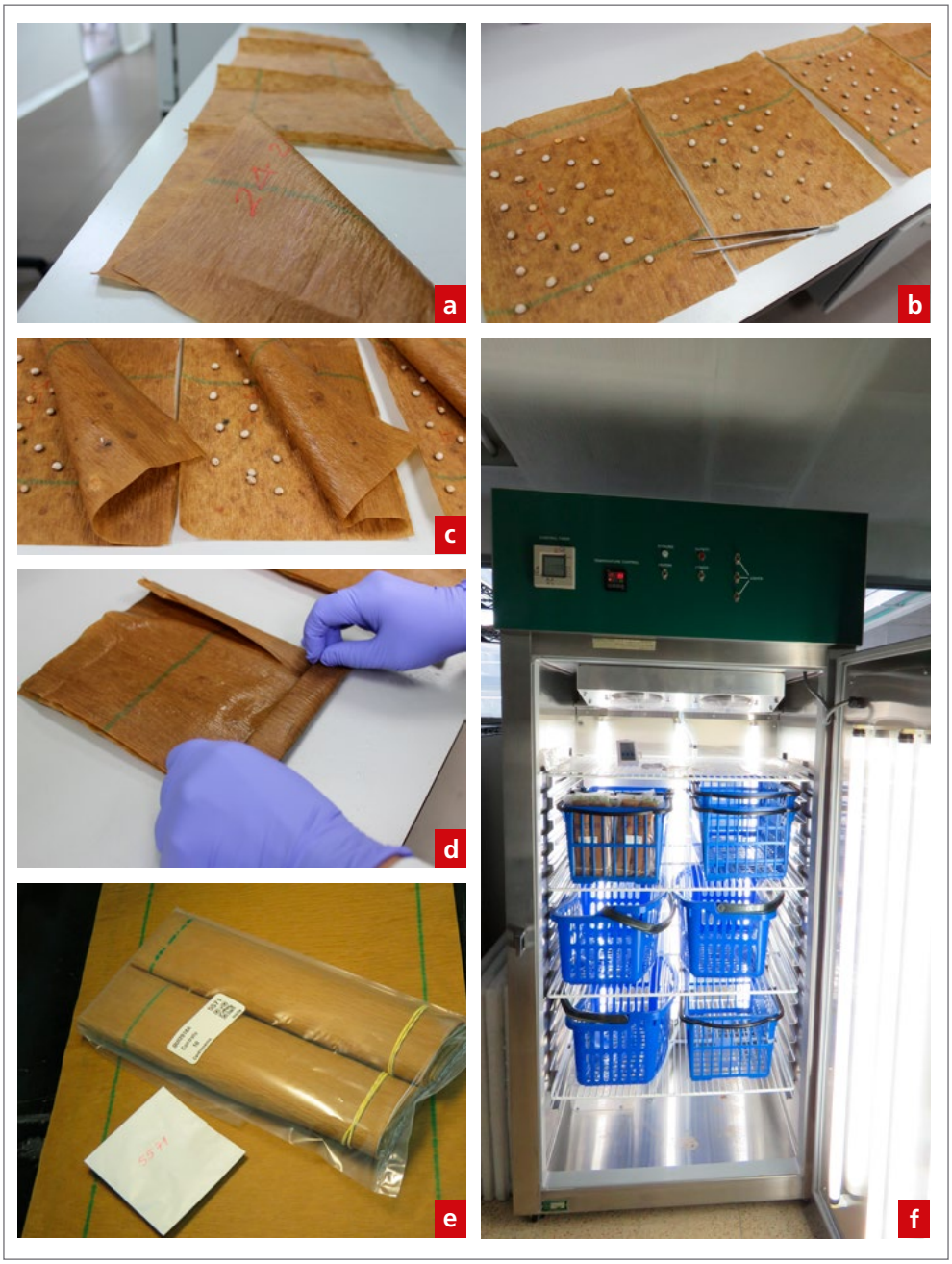

Figura 19. Procedimiento de prueba de germinación con semillas de guandul entre hojas de papel. a. Identificación o código de la muestra para análisis (número 24); b. Distribución de las semillas de guandul sobre las hojas de papel; c. Ubicación de la segunda capa de papel sobre las semillas de guandul; d. Un doblez vertical y enrollar horizontalmente del papel; e. Embolsar los rollos de papel y marcar con un código; f. Ubicación en cámara climática.

Evaluación de la prueba

Las evaluaciones para las semillas de guandul se realizan en el cuarto y décimo día después de la siembra cuando se utiliza papel como sustrato (según las directrices de ISTA). Para llevar a cabo la lectura de la prueba, se extraen los rollos de la bolsa, se despliegan y se abre la capa de papel sin romperla. En la primera evaluación (cuarto día después de la siembra), se retiran las plántulas normales, es decir, aquellas que cumplen con las características previamente descritas en cuanto a su raíz y parte aérea. Las plántulas anormales y las semillas que no han germinado se mantienen hasta el día décimo. No obstante, si existe riesgo de contaminación por semillas infectadas que puedan dañar las plántulas en desarrollo o contaminar la prueba, se recomienda retirarlas en cualquier momento. Después de completar la revisión, se vuelven a enrollar los rollos, se colocan en la bolsa y se regresan a la cámara o al lugar donde se esté llevando a cabo la prueba. En el día décimo, se realiza otra lectura y se retiran las plántulas normales, anormales y las semillas que no germinaron; estas se clasifican en frescas, duras y muertas (figura 20).

Figura 20. Semillas de guandul frescas, semillas duras, semillas muertas y plántula anormal obtenidas en la evaluación.

Resultados

Los datos de la evaluación para cada repetición se registran en la hoja de trabajo (tabla 25), tanto para el cuarto día en la columna de la primera evaluación como para el décimo día en la columna de la segunda evaluación. Los resultados correspondientes a las categorías de semilla (fresca, dura y muerta) se suman para ambas evaluaciones,

sin distinguir por día (tabla 25). El porcentaje de germinación se calcula tomando en cuenta el número total de plántulas normales y aplicando la misma fórmula mencionada en las pruebas de germinación con arena. De igual manera, el porcentaje se calcula para las plántulas anormales y para las semillas frescas, duras y muertas. Al finalizar la evaluación, la suma de estas variables debe ser igual al número de semillas analizadas en cada repetición y la suma total de los porcentajes de todas las categorías debe ser 100. Cuando se obtiene un porcentaje igual o superior a 5 % de semillas frescas, se recomienda realizar una evaluación adicional de la viabilidad de estas semillas mediante la prueba topográfica de tetrazolio (ISTA, 2016). En el caso de las semillas duras, se debe efectuar un pequeño corte en la cubierta seminal en el lado opuesto al embrión y permitir su germinación (ISTA, 2016; MAPA, 2009).

Tabla 25. Registro de datos obtenidos en la prueba de germinación en semillas de guandul realizada en papel

Datos correspondientes día 4 DDS

Datos correspondientes día 10 DDS

Análisis de germinación									
Fecha inicio año: 2022			Mes: 06	Día: 20	Fecha finalización año: 2022			Mes: 06	Día: 30
No Repeticiones: 4	Semillas/ repetición: 50		Temperatura (°C): 25		Sustrato: EP		Días de evaluación: 4; 10		
Evaluación Plántulas Normales					Plántulas Anormales	Semillas			Total
Repetición	Primera	Segunda	Tercera	Total		Frescas	Duras	Muertas	
1	22	11		33	12	0	2	3	50
2	19	10		29	12	2	0	7	50
3	22	12		34	13	0	0	3	50
4	24	10		34	10	0	2	4	50
TOTAL	87	43		130	47	2	4	17	200
PORCENTAJE (%)	44	22		65	24	1	2	8	100
GERMINACIÓN (%)			65		Responsable: Luis Díaz				

Sustratos: entre papel (EP); sobre papel (SP); suelo (S); Arena (A)

Fuente: Elaboración propia

Análisis de los resultados

Es fundamental asegurar la confiabilidad de los resultados, independientemente de la metodología utilizada. Por esta razón, ISTA (2016) ha establecido una diferencia máxima permitida entre repeticiones, la cual se calcula en función del porcentaje de germinación obtenido. Para determinar esta tolerancia, se hace referencia a la tabla 26. En esta tabla, se localiza el porcentaje de germinación obtenido y se consulta el valor máximo permitido en la columna "Tolerancia". Si la diferencia no excede este valor, la prueba se considera fiable. En caso contrario, si supera este valor, la prueba debe repetirse.

Tabla 26. Tolerancia máxima permitida entre repeticiones para una prueba de germinación de semillas de guandul con 4 repeticiones

Cuatro repeticiones de 100, 50 o 25 semillas		
Porcentaje de germinación (%)		Tolerancia
99	2	4
98	3	6
97	4	7
96	5	8
95	6	9
93-94	7-8	10
91-92	9-10	11
89-90	11-12	12
87-88	13-14	13
84-86	15-17	14
81-83	18-20	15
78-80	21-23	16
73-77	24-28	17
67-72	29-34	18
56-66	35-45	19
51-55	46-50	20

Fuente: ISTA (2016)

Ejemplo: en la prueba de germinación de semillas de guandul, el porcentaje para las cuatro repeticiones de 50 semillas fue:

Repetición 1: 66 %

Repetición 2: 58 %

Repetición 3: 68 %

Repetición 4: 68 %

Porcentaje promedio: 65 %

Máxima diferencia: 10 % (tomada entre la más alta y la más baja):

Tolerancia máxima permitida: 19 %

Conclusión: la prueba es aceptada por encontrarse entre el rango de tolerancia máxima permitida para el ensayo de germinación, según las normas establecidas por ISTA.

4.6. Protocolo de viabilidad por ensayo de tetrazolio

Objetivos

Determinar la viabilidad de una muestra de semillas de guandul aplicando la prueba topográfica de tetrazolio y conocer la viabilidad de semillas frescas o duras al final de una prueba de germinación.

Descripción

La prueba de viabilidad es un ensayo bioquímico que permite distinguir las partes vivas de una semilla al exponerlas al reactivo cloruro 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTZ). Cuando esta solución entra en contacto con el hidrógeno liberado por las células vivas, produce formazán, sustancia que tiñe los tejidos vivos de rojo, mientras que los tejidos muertos permanecen incoloros (ISTA, 2016). La viabilidad de la semilla se determina mediante el patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. La prueba de tetrazolio evalúa de manera indirecta la actividad respiratoria en las células de los tejidos que componen la semilla (Ruiz, 2009; ISTA, 2016).

Alcance

La prueba de viabilidad por tetrazolio se lleva a cabo cuando se pretende determinar rápidamente el potencial de germinación de una muestra de semillas de guandul o la viabilidad de semillas que no germinaron en la prueba de germinación, especialmente cuando la cantidad es significativa (ISTA, 2016; Rao et al., 2007).

Definiciones

Muestra: parte de una población que se utiliza para estimar las características del conjunto (FAO, 2014).

Prueba de tetrazolio: prueba de viabilidad en la que las semillas húmedas se sumergen en una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (FAO, 2014).

Prueba de viabilidad: análisis de una muestra de semillas de una accesión con la finalidad de estimar la viabilidad de la accesión completa (FAO, 2014).

Viabilidad de las semillas: capacidad de las semillas para germinar en condiciones favorables (FAO, 2014).

Materiales, equipos e infraestructura

Para realizar las pruebas de viabilidad de semillas de guandul, se requieren los siguientes elementos y equipos.

- Una muestra de semilla pura obtenida en la prueba de pureza física.
- Cajas de Petri.
- Cuchillas de afeitar o bisturí, mangos de bisturí y pinzas.
- Probeta, beaker y botella de vidrio ámbar.
- Toalla de papel o papel de germinación.
- Estereoscopio, lupa magnificadora y horno.
- Cloruro de 2,3,5,-trifenil-tetrazolio.
- Agua.

Procedimiento

A continuación, se detallan las instrucciones que se deben seguir para realizar el procedimiento adecuadamente.

1. Preparar una solución de tetrazolio al 0,5 %, utilizando 2,5 g del reactivo cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio en 500 ml de agua. Envasar esta solución en una botella o recipiente de vidrio, preferiblemente de color ámbar o cubierto con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz y almacenar en la nevera.

2. Ubicar las semillas entre dos capas de papel húmedo durante 18 horas a una temperatura de 25 °C (figura 21ª). La imbibición de las semillas permitirá una distribución uniforme del tetrazolio durante la evaluación (ISTA, 2016).

3. Realizar un corte longitudinal a través de los cotiledones de la semilla (figura 21b) o un corte transversal (figura 21c) para permitir que la semilla entre en contacto con la solución de tetrazolio al 0,5 %.

4. Sumergir las semillas cortadas en la solución de tetrazolio al 0,5 % (figura 21d) a una temperatura de 30 °C en oscuridad durante un período de tiempo que puede variar de 6 a 24 horas. La duración exacta depende de la uniformidad en la tinción de las semillas.

5. Una vez finalizado el tiempo de tinción, retirar las semillas de la solución de tetrazolio y lavarlas con abundante agua para eliminar los residuos de tetrazolio asegurándose de mantenerlas hidratadas durante este proceso de evaluación.

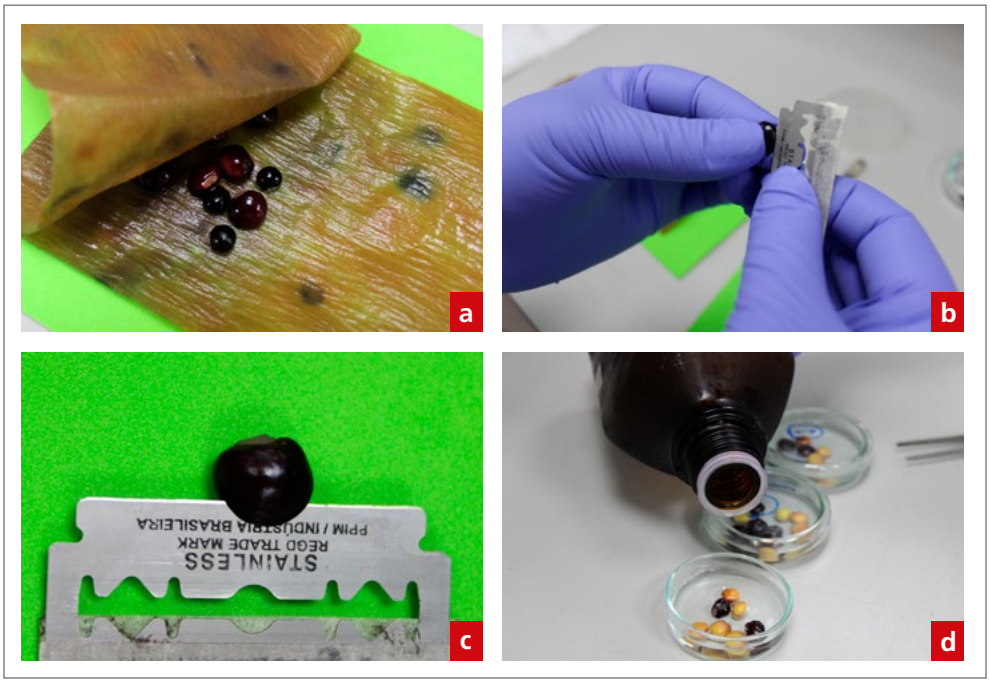

Figura 21. Procedimiento para la tinción de semillas con tetrazolio. a. Humedecimiento de semillas de guandul entre papel durante 18 h a 25 °C. b. Acondicionamiento de la semilla de guandul de manera previa a la tinción; c. Corte longitudinal a través de los cotiledones (izquierda), corte trasversal opuesto al embrión (derecha). d. Adición de solución de tetrazolio a las semillas de guandul acondicionadas.

Evaluación

A cada semilla de las cuatro repeticiones, se le elimina la cubierta seminal para facilitar la observación de los cotiledones y el embrión (figura 22).

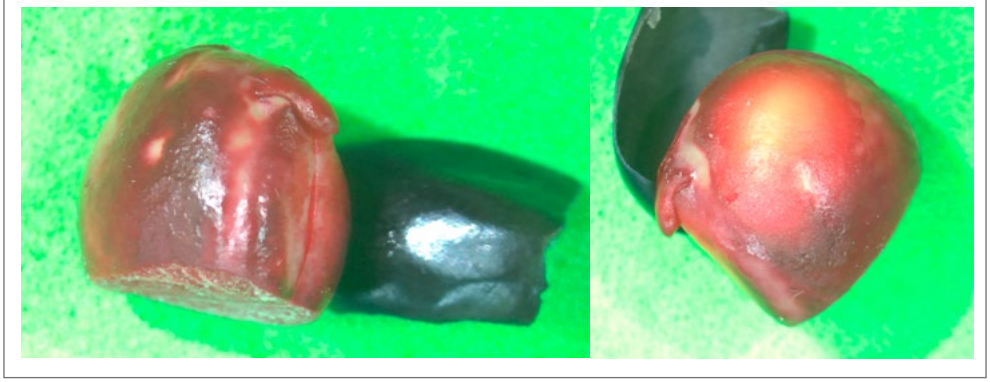

Figura 22. Eliminación de la cubierta seminal que deja visible los cotiledones y parte del embrión (radícula).

Con la ayuda de un estereoscopio, se puede observar el patrón de tinción del embrión y los cotiledones para determinar la viabilidad de cada semilla. Las semillas viables mostrarán una tinción uniforme del embrión y los cotiledones, lo que indica que tienen el potencial de producir plántulas normales, como se evidencia en las figuras 23a y 23b. Puede haber áreas que no presenten una tinción completa (figura 23c), pero aun así se consideran semillas viables, siempre y cuando el área teñida no supere las dos terceras partes de la radícula, medida desde la punta de la radícula o la parte media superior de los cotiledones (ISTA, 2016). Un tejido vigoroso mostrará una coloración roja tenue normal, mientras que una coloración intensa indicará que el tejido es débil (figuras 23d y 23e) debido a la difusión del tetrazolio en las membranas de las estructuras. En este caso, es importante revisar la región de la semilla que presenta esta condición. El tejido muerto (figura 23f) no mostrará ninguna tinción (Franca-Neto, 2019).

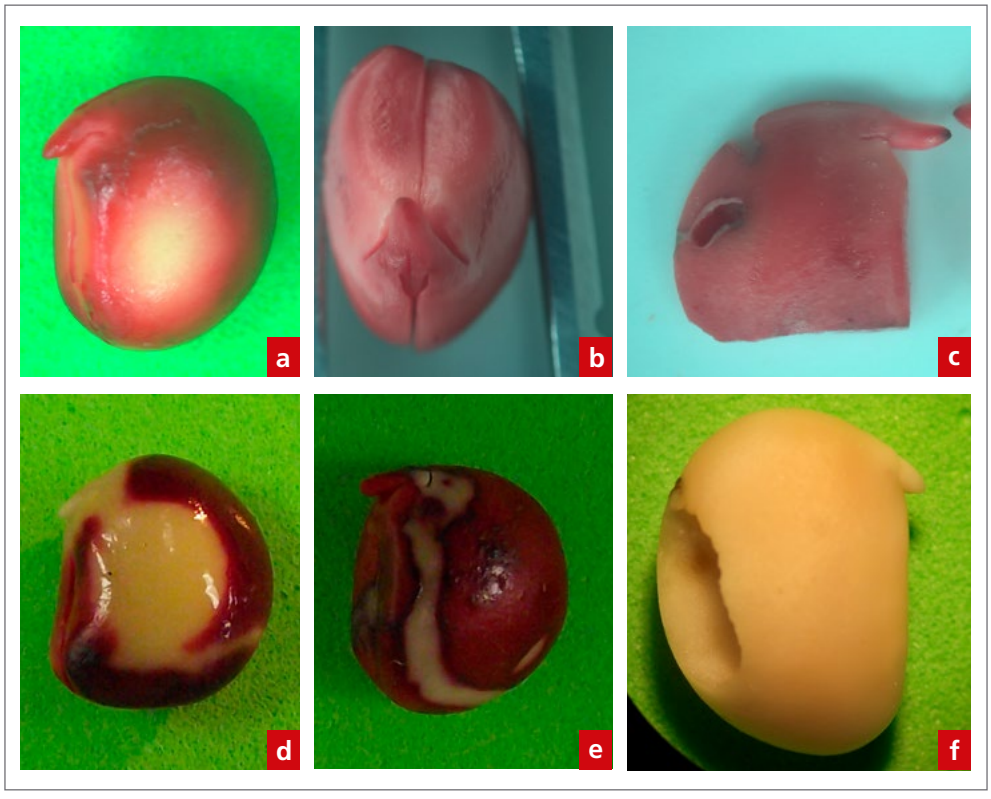

Figura 23. Tinción fuerte de los cotiledones de semillas de guandul en semillas no viables. a. Tinción uniforme de la semilla, detalle del cotiledón; b. Tinción uniforme de la semilla, detalle del embrión; c. Semilla viable sin tinción uniforme del cotiledón y con daño; d. Semilla no viable de guandul, con tinción parcial del cotiledón; e. Semilla no viable de guandul, con tinción fuerte del embrión; f. Semilla no viable de guandul, sin tinción completa.

Resultados

El valor de viabilidad por cada repetición se registra como se indica en la tabla 27. La viabilidad de una muestra de semillas de guandul se expresa como el porcentaje promedio de las cuatro repeticiones de las semillas consideradas como viables, como se indica en la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ Rn\ (\%) = \left(\frac{SVRn}{NSRn}\right) * 100$$

$$Viabilidad\ total\ (\%) = \frac{VR1 + VR2 + VR3 + VR4}{4}$$

$$Viabilidad\ R1(\%) = \left(\frac{30}{50}\right) * 100$$

$$Viabilidad\ R1\ (\%) = 60$$

Tabla 27. Registro de datos obtenidos en la prueba de viabilidad por tetrazolio

Viabilidad por tetrazolio		**Año: 2022**	**Mes: Junio**	**Día: 31**
Repeticiones: 4	**Semillas/ repetición: 50**	**Humedecimiento (h): 18**	**Concentración (%): 0,5**	**T(°C): 30**
Acondicionamiento: Corte longitudinal a través de los cotiledones				
Repetición 1: 60 %	**Repetición 2: 56 %**	**Repetición 3: 62 %**	**Repetición 4: 54 %**	**Viabilidad (%): 58 %**

Fuente: Elaboración propia

Para garantizar la confiabilidad de la prueba, se debe tener presente la diferencia máxima permitida entre repeticiones, denominada "Tolerancia", como se muestra en la tabla 28. Si la diferencia entre las repeticiones supera en valor la tolerancia, se recomienda repetir la prueba. El resultado se considera confiable si la diferencia entre las dos repeticiones no supera el valor máximo permitido de "Tolerancia" según se indica en la tabla 28.

Tabla 28. Tolerancia entre porcentajes para pruebas de viabilidad con tetrazolio

Porcentaje medio de viabilidad (%)		Tolerancia
99	2	5
98	3	6
97	4	7
96	5	8
95	6	9
93-94	7-8	10
91-92	9-10	11
89-90	11-12	12
87-88	13-14	13
84-86	15-17	14
81-83	18-20	15
78-80	21-23	16
73-77	24-28	17
67-72	29-34	18
56-66	35-45	19
51-55	46-50	20

Fuente: Elaboración propia con base en ISTA (2016)

Los resultados de todos los análisis de calidad realizados dentro del proceso de control interno deben quedar registrados para su trazabilidad. Para ello, se pueden diseñar y aplicar formatos como certificados de análisis u hojas de trabajo, como se muestra en la tabla 29. Esto permite un seguimiento oportuno y tomar decisiones a tiempo para lograr una mejora continua.

Tabla 29. Registro de resultados de análisis de calidad de semilla consolidado

AGROSAVIA
Corporación colombiana de investigación agropecuaria

Hoja de trabajo para control interno
Análisis de calidad de semilla sexual

Información sobre la muestra de análisis			
Cultivo: Guandul	**Especie:** *Cajanus cajan* (L) Huth.		**Lote:** CR2021B01
Categoría: Seleccionada	**Peso del Lote (Kg):** 1000		**Peso Muestra (g):** 1000
Productor: Daniel Macías Montoya		**Finca:** El Carmen	
Municipio: Zona Bananera	**Vereda:** La Tigra	**Departamento:** Magdalena	
Fecha Año: 2022	**Mes: 02**	**Día: 25**	**Responsable:**
Observaciones:			

Análisis de pureza física						
Responsable: Sheilla Moreno		**Año:** 2023	**Mes:** 06		**Día:** 17	
Componente	**Peso (g)**	**Porcentaje (%)**	**Descripción de otras semillas:** *Phaseolus*			
			Descripción de materia inerte			
Muestra Trabajo:	960		**Partes de plantas**	X	**Insectos**	X
Semilla pura:	915	95,31	**Partes de semillas**	X	**Tierra**	
Materia Inerte:	25	2,6	**Semillas vanas**		**Piedras**	
Otras semillas:	20	2,08	**Semillas sin tegumento**	X	**Polvo**	
Total	**960**	**100**	**Tegumento**	X	**Otros**	
Observaciones:						

Determinación del contenido de humedad					
Responsable: Luis Díaz			**Año:** 2023	**Mes:** 06	**Día:** 17
Tipo de molido: Grueso		**Temperatura (°C):** 130		**Tiempo (h):** 1	
Repetición	**Peso recipiente P1 (g)**	**Peso húmedo P2 (g)**	**Peso seco P3 (g)**	**Humedad (%)**	**CH (%)**
1	36,621	40,790	40,309	11,5	**11,4**
2	35,699	39,960	39,479	11,3	

Tipo molido: Sin molido (NO); Fino o Grueso

(Continúa)

(Continuación)

Análisis de germinación									
Fecha inicio año: 2022	**Mes:** 06	**Día:** 20	**Fecha finalización año:** 2022		**Mes:** 06	**Día:** 30			
No Repeticiones: 4	**Semillas/ repetición:** 50	**Temperatura (°C):** 25	**Sustrato:** EP		**Días de evaluación:** 4; 10				
Evaluación de plántulas Normales					**Plántulas Anormales**	**Semillas**			**Total**
Repetición	**Primera**	**Segunda**	**Tercera**	**Total**		**Frescas**	**Duras**	**Muertas**	
1	22	11		**33**	12	0	2	3	**50**
2	19	10		**29**	12	2	0	7	**50**
3	22	12		**34**	13	0	0	3	**50**
4	24	10		**34**	10	0	2	4	**50**
Total	**87**	**43**		**130**	**47**	**2**	**4**	**17**	**200**
Porcentaje (%)	**44**	**22**		**65**	**24**	**1**	**2**	**8**	**100**
Germinación (%)			**65**		**Responsable:** Luis Díaz				

Sustratos: Entre papel (EP); Sobre papel (SP); Suelo (S); Arena (A)

Viabilidad por tetrazolio		**Año:** 2022	**Mes:** Junio	**Día:** 31
Repeticiones: 4	**Semillas/ repetición:** 50	**Humedecimiento (h):** 18	**Concentración (%):** 0,5	**T(°C):** 30
Acondicionamiento: Corte longitudinal a través de los cotiledones				
Repetición 1: 60 %	**Repetición 2:** 56 %	**Repetición 3:** 62 %	**Repetición 4:** 54 %	**Viabilidad (%):** 58 %

Fuente: Elaboración propia

4.7. Protocolo de monitoreo y muestreo fitosanitario

Objetivos

Evaluar las poblaciones de insectos plaga, evaluar la incidencia y severidad de las enfermedades y establecer estrategias de manejo integrado de insectos plaga y enfermedades.

Descripción

Las estrategias de monitoreo y muestreo son dependientes de cada artrópodo plaga y patógeno. Además, son la principal herramienta para detectar de manera temprana los problemas ocasionados y manejarlos oportunamente.

Alcance

El monitoreo y el muestreo son herramientas del esquema de aseguramiento de la calidad sanitaria de la producción de semilla de guandul. Tienen como finalidad conocer el estado sanitario del cultivo, lo cual implica la evaluación de la evolución de las poblaciones de insectos plaga y la incidencia y severidad de las enfermedades. Esta información, a su vez, facilita el establecimiento de estrategias para el manejo integrado de estos problemas fitosanitarios.

Materiales y métodos

- Formato de monitoreo y planillero.
- Lupa de 10 X.
- Bolsas de plástico y de papel de diferentes tamaños.
- Marcador.
- Alcohol.
- Tijeras podadoras.
- Viales.

Procedimiento

Las siguientes son recomendaciones que se deben seguir para detectar tempranamente los artrópodos plaga y las enfermedades, lo que permite llevar a cabo un manejo oportuno de los mismos. El muestreo debe ser representativo de todas las áreas de producción de semilla y se debe hacer siguiendo las recomendaciones de la Resolución 3168 (ICA, 2015a), que establece un patrón de muestreo o monitoreo del insecto plaga o patógeno priorizado. En caso de que no exista un patrón establecido, se recomienda realizar el muestreo de forma equidistante, escalonado o en zigzag (figura 24).

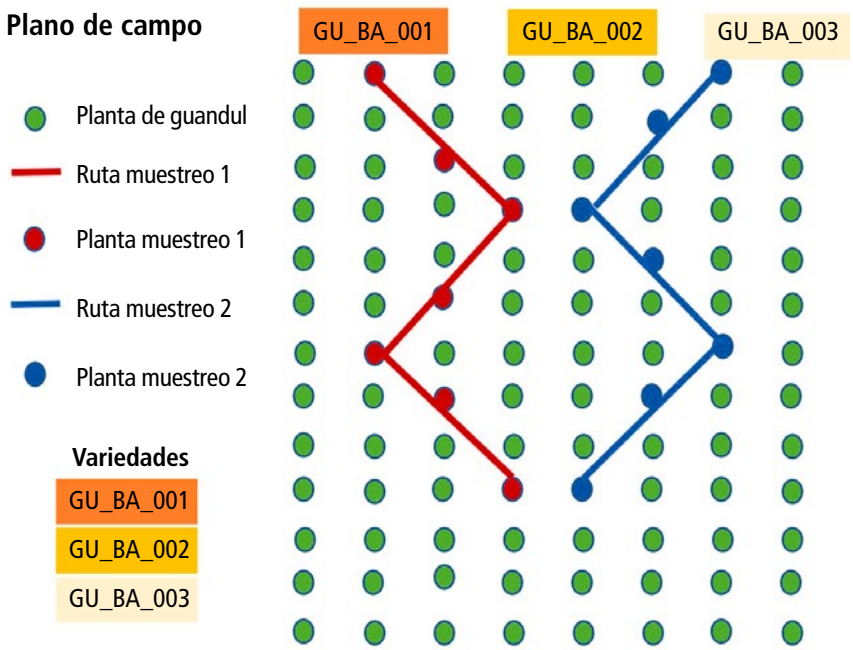

Figura 24. Tipo de muestreo en zigzag implementado en las evaluaciones sanitarias del lote de guandul establecido en el Centro de Investigación Caribia.

Fuente: Elaboración propia

- Examinar visualmente la presencia de los insectos plaga o patógenos.
- Identificar daños, signos y síntomas causados por el insecto plaga o patógeno y tomar un registro fotográfico del daño o la sintomatología asociada a la enfermedad.

- Revisar las partes de la planta en diferentes estadios de crecimiento, especialmente cuando la probabilidad de ocurrencia o presencia del daño ocasionado por el insecto plaga o patógeno sea mayor.

- Tomar una muestra del insecto plaga o de la sintomatología asociada a la enfermedad para su identificación. Estas muestras se deben guardar y mantener en condiciones óptimas para su posterior análisis, lo cual implica refrigerarlas, cubrirlas con papel o toallas absorbentes, colocarlas en bolsas plásticas y etiquetarlas de forma adecuada.

- Marcar las muestras tomadas con la siguiente información, como mínimo: fecha, hora, lugar donde se tomó la muestra, coordenadas del lugar donde se tomó la muestra, semilla, tipo de muestra y razón por la que se tomó la muestra.

- Remitir la muestra al laboratorio para realizar el análisis respectivo y registrar la fecha del envío.

- Recibir y analizar el reporte de laboratorio para tomar las medidas adecuadas de manejo, control o prevención y registrar la fecha de entrega de resultados.

- Diseñar un formato (tabla 30) para el monitoreo y muestreo que puede adecuarse a las necesidades de quien realiza las evaluaciones sanitarias, a la especie de semilla y a la recomendación dada por la autoridad sanitaria.

Tabla 30. Registro de monitoreo de los artrópodos plaga asociados al cultivo del guandul

N° planta	*Diaphaulica aulica*	*Naupactus* sp.	Tingidae	Arañita roja	*Trigona* sp.	*Melanagromyza* sp.	Lepidoptero	*Acanthoscelides* sp.
1								
2								
3								
4								
5								

Fuente: Elaboración propia