



UNIVERSIDAD  
**SAN FRANCISCO XAVIER**  
UNIVERSIDAD DIGNA



# PROTOCOLO

# PHASEOLUS





# Pruebas de Germinación

Las pruebas de germinación fueron realizadas según la Reglas Internacionales para el Análisis de las semillas ISTA 2016, en su capítulo V Análisis de germinación, son pruebas realizadas en laboratorio; el cual, consiste en colocar semillas en un sustrato húmedo, en nuestro caso utilizamos papel toalla en condiciones controladas de temperatura para que germinen y alcancen un nivel de desarrollo. De esta manera, se puede evaluar las estructuras esenciales de la planta, y determinar si son aptas para continuar con su crecimiento normal. El objeto del análisis de germinación es determinar el potencial de germinación de un lote de semillas que puede, a su vez, ser utilizado para comparar la calidad de los distintos lotes y también estimar el valor de la siembra en el campo.

Las pruebas en campo son normalmente insatisfactorias, ya que los resultados no se pueden repetir con confiabilidad. Por lo tanto, los métodos de laboratorio han evolucionado de manera que se controlen las condiciones externas para dar la germinación más regular, rápida y completa para la mayoría de las muestras de una singular especie. Las condiciones son estandarizadas para que los resultados de los análisis que se reproducen dentro de los límites estén lo más cerca posible a los determinados por la variación aleatoria de la muestra.

La germinación es un proceso fisiológico que finaliza con la emergencia del embrión que está contenido en la semilla. Este proceso es influenciado por factores externos e internos. Para que una semilla germine debe ocurrir un proceso de absorción de agua que es conocido como imbibición.

El resultado del análisis es reportado en porcentaje, independientemente de la cantidad de semillas que se utilizó para realizar la prueba. Este porcentaje indica la cantidad de plántulas que cuenta con las estructuras esenciales para continuar su crecimiento en condiciones favorables, a lo que se le llama: plántulas normales.

Para empezar con el trabajo de laboratorio se debe hacer una limpieza y desinfección de los mesones para evitar contaminaciones dentro de nuestro procedimiento.

## Germinación

El porcentaje de germinación reportado en el Certificado ISTA indica la proporción en número de semillas que han producido plántulas clasificadas como normales en las condiciones y dentro del período establecido en la Tabla 1, es decir, el porcentaje de plántulas normales

## Estructuras esenciales en la germinación

Una plántula, dependiendo de la especie que se está analizando, se compone de una combinación específica de algunas de las estructuras siguientes que son esenciales para el desarrollo satisfactorio de una planta:

- ✓ sistema de raíces (raíz primaria; en ciertos casos raíces seminales);
- ✓ eje del brote (hipocótilo, epicótilo, en ciertas Poaceae mesocótilo; yema terminal);
- ✓ cotiledones (de uno a varios);
- ✓ coleóptilo (en todas las Poaceae).

## Sustratos para la prueba de germinación

Los medios de cultivo utilizados para los análisis de germinación son productos que proporcionan suficiente espacio de poros para aire y agua, para el crecimiento del sistema radicular y para el contacto con soluciones (agua) necesarias para el crecimiento de la planta.

Con el papel como medio de base, se permite cualquier combinación de sustratos de cultivo prescrita en la Tabla 1, para esa especie, siempre que cada medio de cultivo está verificado y cumpla con las especificaciones establecidas.

## Especificaciones para los sustratos

Las siguientes especificaciones generales se aplican a todos los medios de cultivo y deben ser verificadas:

- ✓ **Composición:** el medio de cultivo puede ser papel, arena pura o mezclas de compuestos orgánicos con partículas minerales añadidas.

**Características de retención del agua:** cuando se agrega la cantidad apropiada de agua, las partículas del medio de cultivo deben tener la capacidad de retener el agua suficiente para proporcionar el movimiento continuo de agua a las semillas y plantas, sino también proporcionar suficiente espacio poroso para la aireación necesaria para la mejor germinación y el crecimiento de las raíces. El contenido de agua del medio de cultivo se debe ajustar para que corresponda a las necesidades de la especie que se está analizando, en base a la máxima capacidad de retención



de agua del medio. La retención de agua se expresa entonces como un porcentaje de la máxima retención.

- ✓ **pH:** el medio de cultivo debe tener un valor de pH dentro de la gama de 6,0-7,5 cuando se controla en el sustrato. Las mediciones de pH pueden ser reemplazadas por pruebas biológicas.
- ✓ **Conductividad:** la salinidad debe ser tan baja como sea posible y no más de 40 millisiemens por metro. Las mediciones de conductividad pueden ser reemplazadas por pruebas biológicas.
- ✓ **Limpieza y ausencia de toxicidad:** el medio de cultivo debe estar libre de semillas, hongos, bacterias o sustancias tóxicas, que pueden interferir con la germinación de semillas o el crecimiento o la evaluación de las plántulas.
- ✓ **Re-uso de sustratos:** se recomienda fuertemente que el medio de cultivo sólo se utilice una vez.

Mediciones alternativas: puede ser difícil de comprobar todas las especificaciones u obtener sustratos de cultivo de los proveedores con las especificaciones solicitadas. Está permitido sustituir la medida de la conductividad con pruebas biológicas como fitotoxicidad. De lo contrario, deben ser verificadas todas las características descritas.

### Papel como sustrato

El papel debe ser de madera, algodón u otra celulosa vegetal purificada. El papel puede tener la forma de filtros de papeles, papel secante o toallas. El papel debe ser tal que:

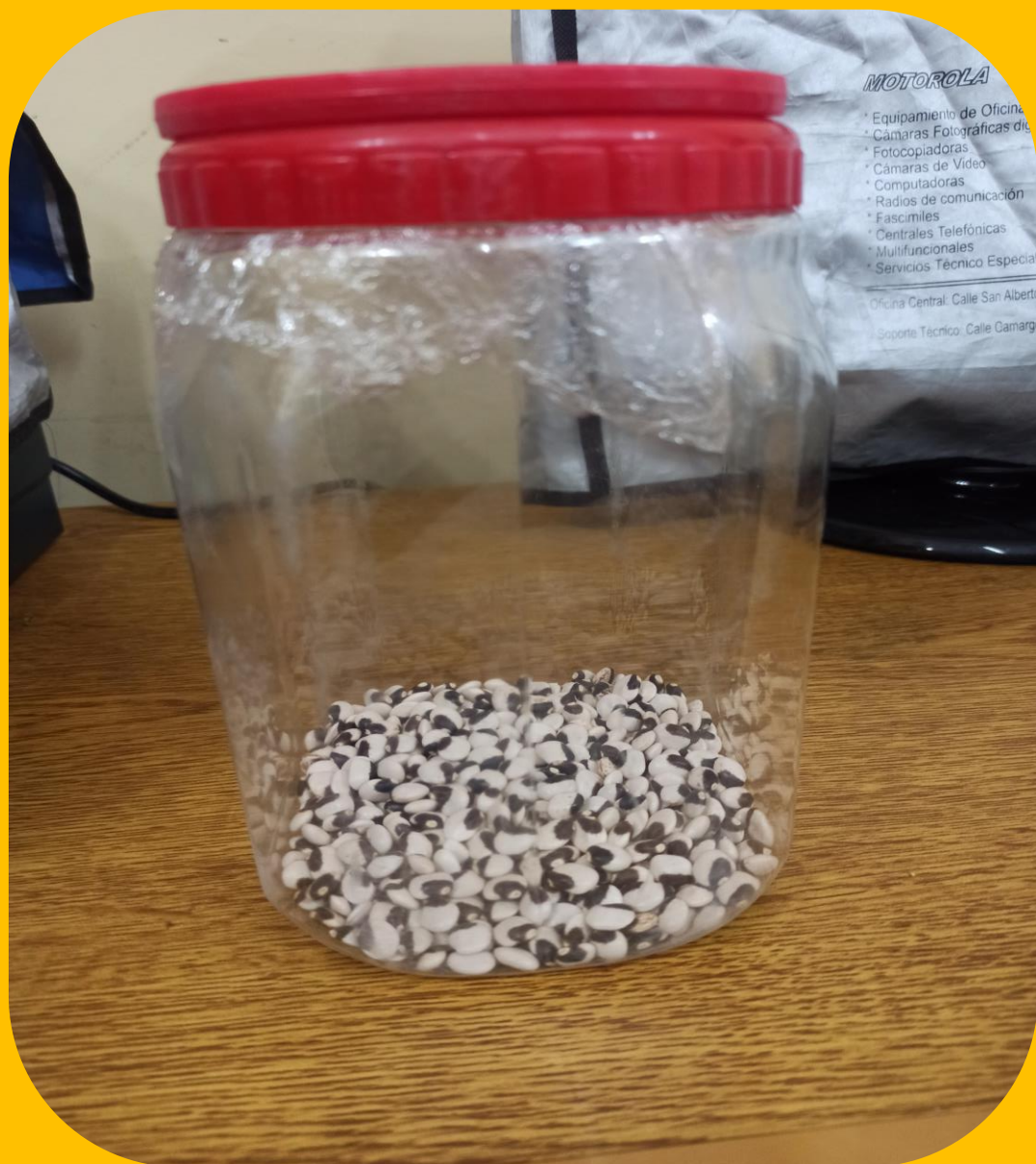
- ✓ las raíces de las plántulas crezcan sobre y no en él;
- ✓ posea una resistencia suficiente para que pueda resistir el desgarro cuando se manipula durante el análisis.

Para este trabajo de investigación fue utilizado el papel secante (de cocina), Papel Toalla Hogar de 22,8 X 22cm de tamaño, fabricado por la empresa COPELME y elaborado a partir de fibra virgen, para el cuidado de la contaminación y el pH.

### **Fase 1: Preparación y acondicionamiento de las semillas**

Se debe tener las accesiones que se utilizaran en el refrescamiento de las semillas, las cuales deben estar en buenas condiciones de almacenamiento; como ser: en envases o bolsas de yute cerradas herméticamente, poner las semillas a la sombra en un lugar seco y fresco para evitar la presencia de humedad, insectos y roedores.



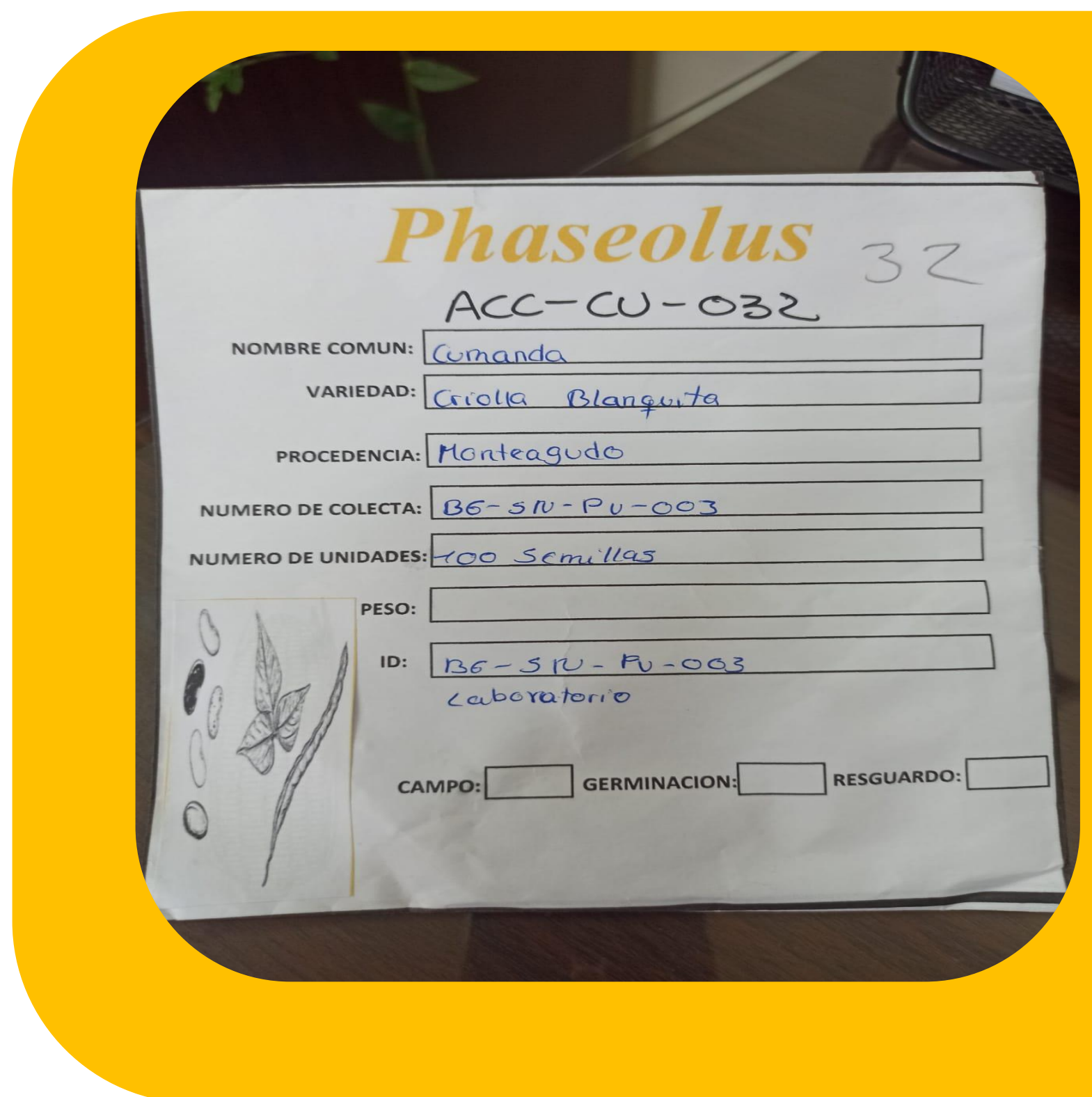


- Cada accesión deber estar bien rotulada teniendo en cuenta:
  - ✓ Numero de colecta
  - ✓ Nombre común
  - ✓ Nombre científico
  - ✓ Fecha de adquisición
  - ✓ Datos geográficos
  - ✓ Nombre del donante
  - ✓ Lugar de colecta
  
- Para el conteo de las semillas se debe poner un papel blanco, así poder diferenciar las semillas puras de las impurezas, otras semillas o semillas incompletas o partidas, posteriormente ir acomodando de 10 en 10 las semillas siempre verificando que no esté con gorgojo o polilla y que no hayan entrado al núcleo de la semilla.





- Una vez contadas las semillas ponemos en sobres, cada sobre tiene que contener 200 semillas en nuestro caso, pusimos 200 semillas para germinación y 200 semillas para campo. Además, cada sobre debe estar bien identificado con:
  - Nombre común
  - Variedad
  - Procedencia
  - Numero de colecta
  - Número de unidades
  - Peso
  - ID





## Fase 2: Pasos para la germinación

- Para cada accesión se debe cortar 12 toallas de papel, porque de cada accesión contiene 4 repeticiones.



- Se pesa el papel y de acuerdo al peso se multiplica por 3,5.





- El resultado del peso del papel toalla por 3,5 ese resultado es la cantidad de agua destilada que se debe utilizar.



- Una vez que se humedece bien el papel toalla se debe dejar reposar unos minutos para que el papel toalla absorba toda el agua.





- Se colocan dos capas de papel toalla y se dobla la parte superior en la que se escribe el código de la accesión más el número de rollo ej. ACC 105 – 1.

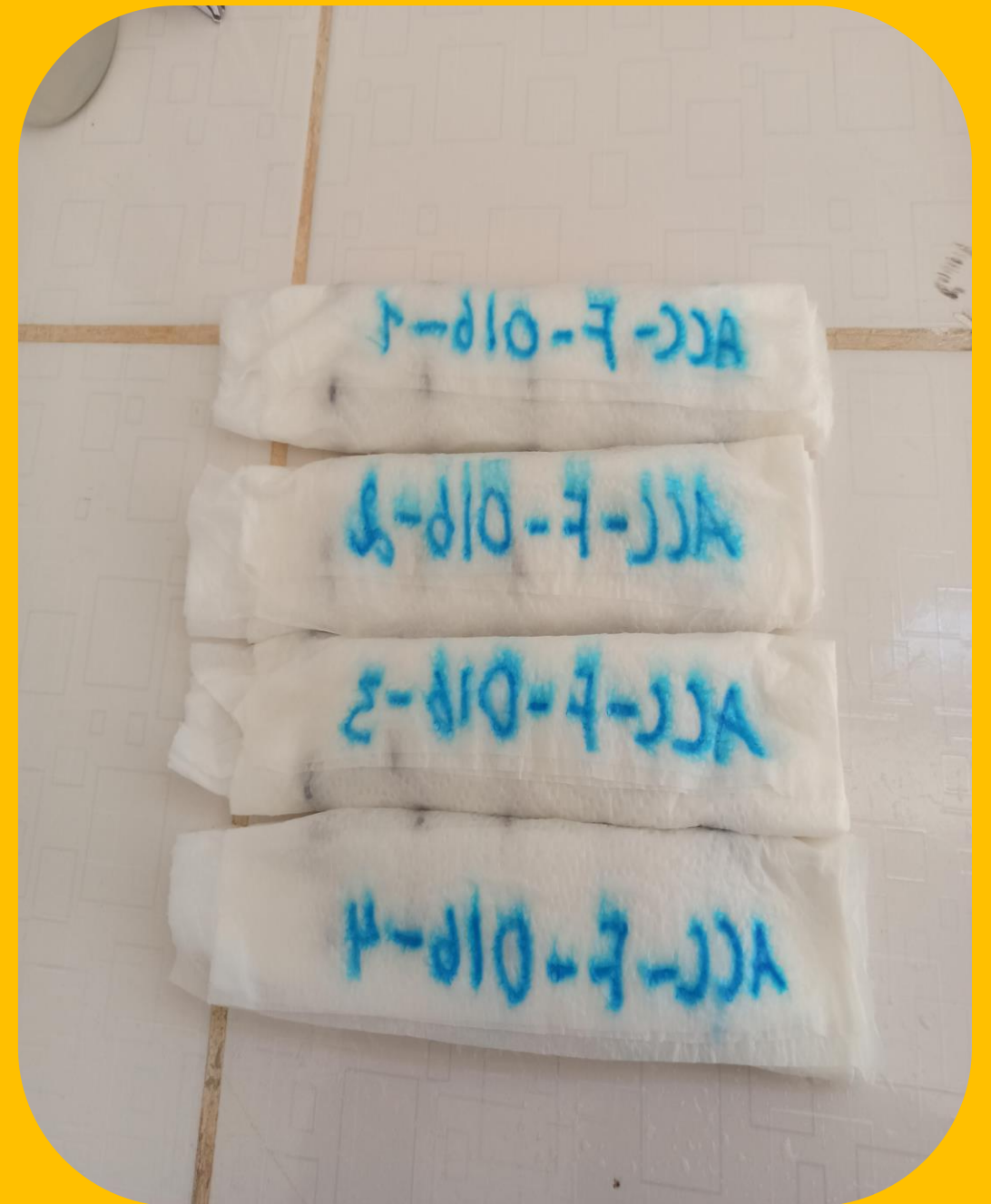


- **Fase 3:** disposición de las semillas en bandejas de germinación. Se desdobra y se dobla el lado izquierdo para empezar acomodar las semillas en filas de 5x5.





- Una vez acomodado las 25 semillas, se pone la última capa y se procede a doblar de manera que nos quede 4 rollos por cada accesión con el código de accesión visible.



#### **Fase 4:** Manejo en la cámara de germinación

- Se introduce en bandejas con inclinación de 45°





- Las bandejas van a la cámara de germinación a una temperatura de 20 a 25°C durante 9 días establecido según las reglas ISTA, 2016 para el cultivo frejol



### **Fase 5: Evaluación del porcentaje de germinación**

La evaluación del porcentaje de germinación se realizó según las especificaciones de ISTA 2016 con los parámetros de:

- Plántulas normales: Las plántulas normales muestran potencial de desarrollo continuo en plantas satisfactorias cuando se cultivan en tierra de buena calidad y en condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Para ser clasificada como normal una plántula debe cumplir con una de las siguientes categorías:

- ✚ Plántulas intactas: plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas, en proporción y con buena salud;
- ✚ Plántulas con defectos leves: plántulas que muestran ciertos defectos leves de sus estructuras esenciales, siempre que muestren un desarrollo satisfactorio y equilibrado de otro modo comparable al de las plántulas intactas de la misma prueba;
- ✚ Plántulas con infección secundaria: plántulas que es evidente habrían conformado con uno de los anteriores, pero que se han visto afectados por hongos o bacterias procedentes de fuentes distintas de la semilla madre.



- **Plántulas anormales:** Plántulas anormales no muestran el potencial de convertirse en una planta normal cuando se cultivan en tierra de buena calidad y en condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Las siguientes plantas se clasifican como anormales:

- ✚ Dañadas: plántulas con cualquiera de las estructuras esenciales que faltan o tan mal e irreparablemente dañadas que no se puede esperar un desarrollo equilibrado;

- ✚ Deformadas o desequilibradas: plántulas con desarrollo débil o alteraciones fisiológicas o en las que las estructuras esenciales se deforman o están fuera de proporción;

- ✚ Deterioradas: plántulas con cualquiera de sus estructuras esenciales tan enfermas o deterioradas como resultado de una infección primaria, que impiden el desarrollo normal.

- **Semillas no germinadas:** Cuando se ensaya en las condiciones dadas, las semillas que no han terminado por el final del periodo de análisis, se clasifican como sigue:

- ✚ Semillas duras: las semillas que se mantienen duras al final del período de análisis, porque no han absorbido el agua;

- ✚ Semillas frescas: las semillas, excepto las semillas duras, que debido a la inactividad no han podido germinar en las condiciones del análisis de germinación, pero permanecen limpias y firmes y tienen el potencial de convertirse en una de las plántulas normales;

- ✚ Semillas muertas: las semillas, que al final del período de análisis no son ni duras ni frescas ni han producido cualquier parte de una plántula;

- ✚ Otras categorías: en algunas circunstancias semillas vacías y sin germinar pueden clasificarse adicionalmente de acuerdo con las clases descritas.

➤ **Evaluación e instrumentos de evaluación**

Al 9no día se hace la evaluación según la tabla de porcentaje de germinación de ISTA, sacando los 4 rollos de papel y desprendiendo la capa de encima para proceder con el conteo de plantas normales, anormales y no germinadas.





- Todos los datos deben ser registrados en una planilla de control, para poder tener una base de datos con porcentajes.

**PLANILLA DE CONTROL DE VIABILIDAD  
PORCENTAJE DE GERMINACION PHASEOLUS**

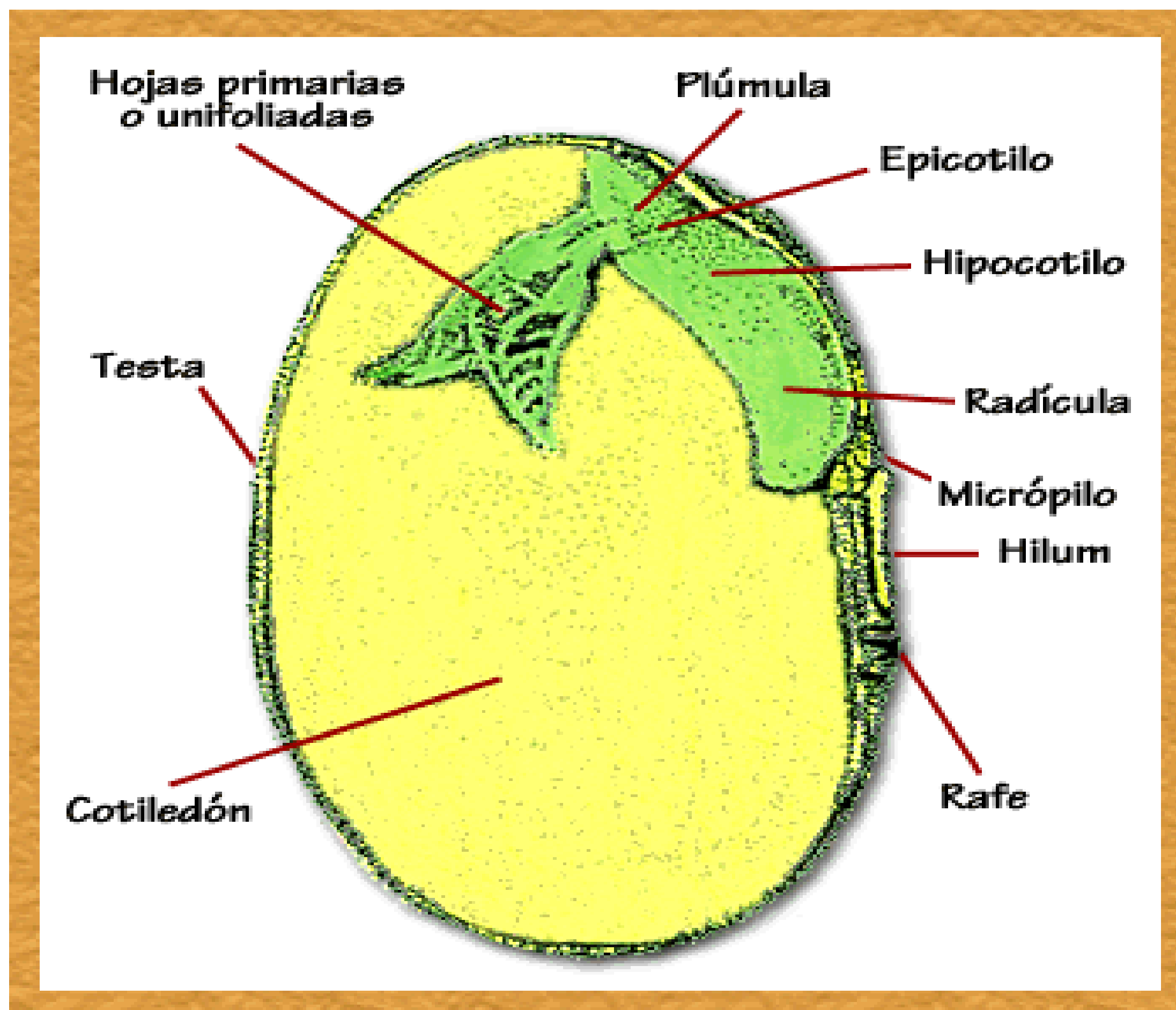
Fecha de siembra:		Variedad:				
fecha de conteo:		Temperatura:				
Método		Humedad:				
Accesión	Rollo	Plantulas normales	Plantulas anormales	No germinadas	Total	%



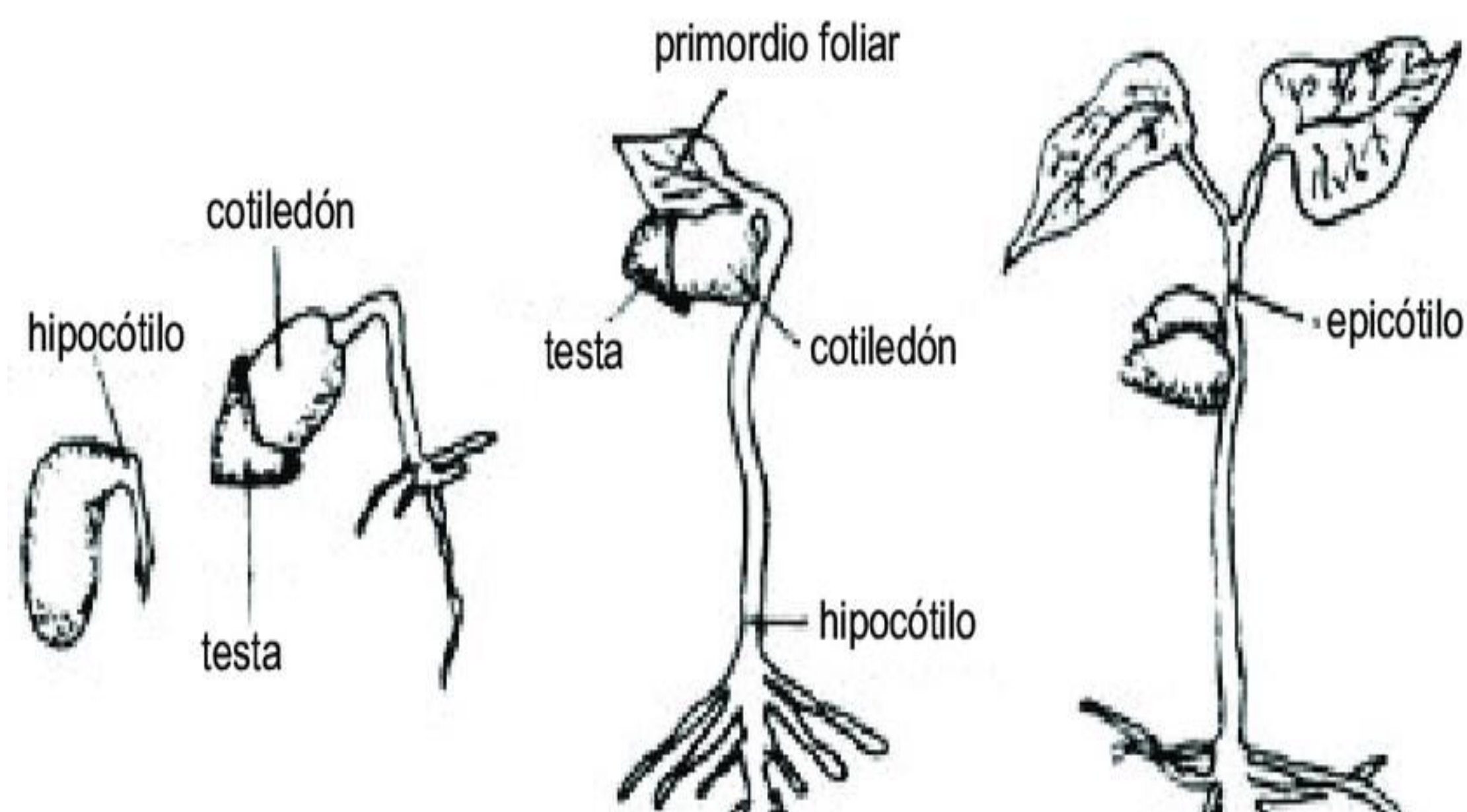
PLANILLA DE CONTROL DE VIABILIDAD  
PORCENTAJE DE GERMINACION PHASEOLUS

Fecha de siembra:	06/04/23		Variedad:	Comanda		
fecha de conteo:	14/04/23		Temperatura:	25°C		
Método:			Humedad:			
Accesión	Rollo	Plantulas normales	Plantulas anormales	No germinadas	Total	%
ACC-CU-024	1	17	7	2	25	
	2	10	12	3	25	
	3	13	10	2	25	
	4	8	17	0	25	
ACC-CU-021	1	8	17	0	25	
	2	4	20	1	25	
	3	8	15	2	25	
	4	6	18	1	25	
ACC-CU-025	1	1	22	2	25	
	2	4	18	3	25	
	3	9	15	1	25	
	4	0	23	2	25	
ACC-CU-002	1	8	12	5	25	
	2	9	12	4	25	
	3	5	14	6	25	
	4	2	18	5	25	
ACC-CU-032	1	14	11	0	25	
	2	12	12	1	25	
	3	14	19	2	25	
	4	14	9	2	25	
ACC-CU-003	1	10	14	1	25	
	2	16	9	0	25	
	3	3	19	3	25	
	4	6	18	1	25	





Fuente: [https://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/legumino/frejol/semillas.htm](https://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/semillas.htm)



Fuente: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-A-Germinacion-hipogea-en-haba-B-Germinacion-epigea-en-frijol-54\\_fig1\\_317520440](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-A-Germinacion-hipogea-en-haba-B-Germinacion-epigea-en-frijol-54_fig1_317520440)



**Tabla 1.- Recomendaciones para la prueba de análisis de Phaseolus (*Phaseolus vulgaris*)**

Especies	Sustrato	Temperatura °C	Primer conteo (día)	Conteo final (día)	Recomendaciones
<i>Phaseolus vulgaris</i>	BP - S	20 ↔ 25; 20 - 30	5	9	Sustrato húmedo Si al final aún presenta semillas duras hacer prueba de tetrazolio

**Fuente:** International Seed Testing Association ISTA 2016.

\*Según las reglas internacionales para el análisis de semillas (ISTA, 216) interpretamos los siguientes símbolos y abreviaturas presente en la Tabla 1.

↔ = Temperatura alterna; Primera temperatura 16 horas, segunda temperatura 8 horas.

BP = Entre papel

S= Arena

### **Bibliografía**

- [https://vri.umayor.cl/images/ISTA\\_Rules\\_2016\\_Spanish.pdf](https://vri.umayor.cl/images/ISTA_Rules_2016_Spanish.pdf)
- [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-A-Germinacion-hipogea-en-haba-B-Germinacion-epigea-en-frijol-54\\_fig1\\_317520440](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-A-Germinacion-hipogea-en-haba-B-Germinacion-epigea-en-frijol-54_fig1_317520440)
- [https://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/legumino/frejol/semillas.htm](https://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/semillas.htm)