



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**MAESTRÍA EN CULTIVOS INTENSIVOS**

**“Generación de tecnologías para mejorar  
la germinación de semillas de  
*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.”**

Tesis presentada para acceder al título de Magíster en Cultivos Intensivos. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral.

**Tesista:** Ing. Agr. (Esp.) Marcela Andrea Catraro

**Directora:** Dra. Ing. Agr. Patricia Cecilia Flores

**Co-Director:** Dr. Ing. Agr. Norberto Francisco Gariglio

**Dedicada a mi abuela, Elva Antonia “Porota” Di Tomaso de Catraro, que me cuida desde el cielo**

**... por creer en mí siempre,**

**... por darme sus manos y su corazón,**

**y por ser mi mayor admiradora.**

### **Agradecimientos**

A mi directora, Dra. Ing. Agr. Patricia C. Flores, por su acompañamiento, apoyo constante y dedicación cálida y comprometida tanto en esta tesis en particular como en mi desarrollo profesional.

A mi Co-director Dr. Norberto F. Gariglio, por su compromiso, colaboración y por sus palabras cálidas de aliento durante todo este camino.

A mis compañeros de trabajo, Ings. Agrs. Damián Poggi, Agustín Quadrelli, Melisa Defagot y Andrea Leone, por brindarme su ayuda, soporte y por ser realmente buenos compañeros en todo el sentido de la palabra.

A mi amiga y colega Ing. Agr. Paola Gabriel por abrirme las puertas de su hogar y de su corazón y por brindarme su apoyo a cada paso.

Al Ing. Agr. Leonardo García del INTA EEA San Pedro, por colaborar conmigo siempre con la mejor predisposición y desinteresadamente.

Al Dr. Roque Craviotto y todo el personal del Laboratorio de semillas del INTA EEA Oliveros, Dra. Miriam Arango, Ing. Agr. (MSc.) Carina Gallo y Marta Montero, por aportar desinteresadamente sus experiencias para mi desarrollo profesional.

A mis padres, Ernesto y María del Carmen, por brindarme con su amor todo lo esencial de la vida para poder desarrollarme plena y libremente.

A mis hermanos, Alejandra, Sebastián, Ana y María Celeste, por ser mis pares, cómplices y compañeros y por enseñarme lo que es amar sin condiciones.

A mis primos, cuñados y sobrinos, por estar presentes y ser parte de todos mis momentos.

A mis amigas, las de toda la vida, por ser mi cable a tierra y el mejor escape de la rutina.

A mi compañero de vida, mi amor, Ezequiel Luna, por ser mi sostén, por dar todo de sí para que yo logre desarrollarme en todos los sentidos y por poder volar juntos cada día.

A mis hijos Benjamín y Julián, por llegar y darle sentido a todo. Por mostrarme que “**TODOS LOS ÉXITOS SON RELATIVOS EN COMPARACIÓN CON EL AMOR QUE SIENTO POR ELLOS**”.

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	1
Agradecimientos.....	2
Índice General.....	3
Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
1. Caracterización de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.....	11
1. 1. Importancia de la especie en la producción cítrica.....	11
1. 2. Descripción taxonómica y morfológica.....	11
1. 3. Requerimientos agro-climáticos de la especie .....	12
1. 4. Características de su semilla.....	12
2. Reproducción de portainjertos mediante semillas.....	14
3. Acondicionado y almacenamiento de semillas.....	15
4. Calidad de semilla.....	15
4.1 Prueba de germinación estándar .....	16
4. 2 Prueba de Vigor: IVG, TMG y Conductividad Eléctrica.....	16
4.3 Patrones de plántulas normales y anormales.....	18
4.4 Prueba de Viabilidad por Tetrazolio.....	19
Formulación de problema.....	22
Objetivo general.....	23
Objetivos Específicos.....	23
Material y Métodos.....	24
Capítulo I: “Escarificado químico y evaluación de su efecto sobre el proceso de imbibición y el vigor de las semillas”.....	25
Material y Métodos.....	26

<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo II: “Patrones de plántulas normales y anormales de Poncirus trifoliata (L.) Raf.”.....</b>	<b>36</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>37</b>
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo III: “Prueba de Viabilidad Topográfica por Tetrazolio en Poncirus trifoliata (L.) Raf.”.....</b>	<b>44</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>45</b>
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>47</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO: Normativa Fitosanitaria para la producción de plantas cítricas en Argentina.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Hoja de P. trifoliata</i> .....	11
<i>Figura 2: Fruto y semillas de P.trifoliata</i> .....	11
<i>Figura 3: Germinación de semillas de P.trifoliata pertenecientes al mismo lote a los 60 días en cámara</i> .....	12
<i>Figura 4: Semillas enteras de P.trifoliata</i> .....	12
<i>Figura I-1: Escarificado químico Oliveira et al. (67) (a); Escarificado químico Grasso et al.(43) (b)</i> .....	27
<i>Figura I-2: Escarificado químico (a); Tegumentos despegados y en suspensión (b)</i> .....	27
<i>Figura I-3: Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S (Laboratorio de semillas EEA INTA Oliveros)</i> .....	29
<i>Figura I-4: Curvas de regresión ajustadas a diferentes modelos según la evolución de la imbibición de semillas de Poncirus trifoliata (L.) Raf. sometidas a distintos tratamientos de remoción de sus tegumentos: T1,2: Pelado manual (; sin testa ni tegmen) Regresión no lineal- modelo hiperbólico; T2,2: pelado químico con hipoclorito de sodio (sin testa) Regresión lineal; T3,2: control sin pelar (con ambos tegumentos) Regresión no lineal - modelo exponencial</i> .....	32
<i>Figura I-5: Importancia de los tegumentos seminales en la restricción del proceso de imbibición. Testa limitation corresponde a la limitación a la imbibición del tratamiento sin pelar (T3,2) respecto al pelado manualmente (T1,2). Tegmen limitation corresponde a la limitación a la imbibición del tratamiento de pelado químico (T2,2) con respecto al pelado manual (T1,2)</i> .....	33
<i>Figura I-6: Semillas del mismo lote sometidas a los 3 tratamientos luego de 5 días en cámara de germinación en rollos de papel húmedo (a) pelado manual; (b) pelado químico; (c) sin pelar</i> .....	34
<i>Figura II-1: Plántula normal vigorosa (Strong)</i> .....	39
<i>Figura II-2: Plántulas normales originadas de una semilla poliembriónica</i> .....	39
<i>Figura II-3: Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves</i> .....	39
<i>Figura II-4: Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves y mancha necrótica</i> .....	39
<i>Figura II-5: Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves y sistema del tallo retrasado</i> .....	39

<i>Figura II-6: Raíz atrofiada</i> .....	42
<i>Figura II-7: Ausencia de sistema tallo y raíz atrofiada</i> .....	42
<i>Figura II-8: Raíz mazuda (tipo stubby)</i> .....	42
<i>Figura II-9: Raíz ausente</i> .....	42
<i>Figura II-10: Raíz retrasada con hendidura longitudinal</i> .....	42
<i>Figura II-11: Raíz podrida</i> .....	42
<i>Figura II-12: Epicótilo bifurcado y raíz con geotropismo negativo</i> .....	42
<i>Figura II-13: Raíz con constricción e infección primaria</i> .....	42
<i>Figura II-14: Raíz vítrea</i> .....	42
<i>Figura II-15: Raíz en banco con constricción</i> .....	42
<i>Figura II-16: Raíz retorcida</i> .....	42
<i>Figura II-17: Raíz rota</i> .....	42
<i>Figura II-18: Fototropismo negativo y raíz podrida</i> .....	42
<i>Figura II-19: Raíz en banco</i> .....	42
<i>Figura II-20: Bifurcación por yema terminal dañada</i> .....	42
<i>Figura II-21: Plántula blanca o ahilada</i> .....	42
<i>Figura III-1: Equipamiento para la determinación de viabilidad mediante la prueba topográfica de TZ en laboratorio de semillas del INTA Oliveros</i> .....	46
<i>Figura III-2: Efecto de la incubación en sal de TZ a una concentración del 1% por 18 h (a) y 24 h (b) en semillas de P. trifoliata según lo recomendado por los manuales AOSA (10) e ISTA (48)</i> .....	47
<i>Figura III-3: Interacción entre el tiempo de incubación y la concentración de sal de TZ para el % de viabilidad</i> .....	48
<i>Figura III-4: Porcentaje de Viabilidad obtenido en los diferentes tratamientos según la interpretación de las distintas tinciones logradas. PQ: pelado químico; SP: sin pelar. Los valores siguiendo la abreviación PQ y SP indican la concentración de la sal de TZ y el tiempo de incubación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según ANOVA y Comparación de medias a través del test de Tukey con un nivel de significación <math>p &lt; 0.05</math>.</i> .....	49

<i>Figura III-5: Imágenes de los tratamientos evaluados en semillas peladas químicamente y sin pelar, en función de la concentración de la sal de TZ y tiempo de incubación .....</i>	<i>50</i>
<i>Figura III-6: PRUEBA TOPOGRÁFICA DE TETRAZOLIO EN Poncirus trifoliata (L.) Raf. EN ESQUEMAS.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura III-7: PRUEBA TOPOGRÁFICA DE TETRAZOLIO EN Poncirus trifoliata (L.) Raf. EN IMÁGENES.....</i>	<i>53</i>



**ÍNDICE DE TABLAS**

<i>Tabla I-1: Influencia de los diferentes tratamientos de escarificado químico de semillas sobre el Tiempo Medio de Germinación (TMG) y el Índice de Velocidad de Germinación de Poncirus trifoliata. Valores promedio de 4 repeticiones por tratamiento.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla I-2: Vigor de las semillas expresados a través del test de conductividad eléctrica y del tiempo medio de germinación (TMG) para semillas de Poncirus trifoliata sometidas a diferentes tratamientos de pelado. Datos promedio de 100 repeticiones por tratamiento.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla II-2. Descripción de Plántulas Anormales de la especie Poncirus trifoliata.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla II-1. Descripción de Plántulas Normales de la especie Poncirus trifoliata.....</i>	<i>40</i>

## RESUMEN

*Poncirus trifoliata* (L.) Raf., es el portainjerto más importante en la producción de cítricos de la Región del Litoral Argentino. Se propaga por semillas que presentan dormición física conferida por sus tegumentos. Los objetivos de esta investigación fueron seleccionar el método de escarificado químico más adecuado y ajustar pruebas para la determinación de la calidad fisiológica de semillas de *Poncirus trifoliata* para mejorar la productividad de los viveros de plantas cítricas bajo cubierta. Se llevaron a cabo diferentes experimentos. En el primero de ellos se evaluó la efectividad de tres tratamientos de escarificado químico para desprender los tegumentos de las semillas y su posterior efecto sobre el vigor. Para la determinación del vigor se utilizaron los índices de velocidad de germinación (IVG) y tiempo medio de germinación máxima (TMG). En un segundo experimento se comparó el efecto del escarificado químico más efectivo determinado en el primer experimento, en relación a semillas peladas manualmente y semillas sin pelar, de modo de evaluar el vigor de las semillas, y el rol de los tegumentos seminales en el proceso de imbibición. Al finalizar las diferentes pruebas de germinación efectuadas en los experimentos anteriores, se procedió a clasificar a las plántulas de *Poncirus trifoliata* en dos categorías: normales y anormales. También, se realizó un experimento preliminar para evaluar la concentración y tiempo de incubación de la prueba de viabilidad por tetrazolio (TZ) propuestos por las distintas asociaciones de analistas de semillas, y en base a los resultados obtenidos se definieron los tratamientos para ajustar la técnica de TZ para la especie. Las semillas fueron consideradas viables o no viables según las diferentes tinciones, elaborándose patrones topográficos de viabilidad en esquemas e imágenes fotográficas. El escarificado químico con hipoclorito de sodio fue el método más efectivo para eliminar la testa de las semillas, favoreciendo una mayor y más rápida imbibición respecto a las semillas enteras, mejorando también los parámetros de vigor. Este método es sencillo, práctico y fehaciente para ser utilizado por los productores viveristas y por los analistas de semillas. El test de vigor de conductividad eléctrica no aportó información adicional respecto a los parámetros TMG e IVG. Se describieron patrones de plántulas de *Poncirus trifoliata* para las categorías de plántulas normales vigorosas, plántulas normales débiles y plántulas anormales. Se observaron con mayor frecuencia anomalías del sistema radical como raíz primaria retorcida, atrofiada, mazuda (tipo stubby) y raíz primaria ausente. Se determinó como la metodología más adecuada para realizar la prueba de TZ la utilización de una concentración del 0,2% de la sal TZ, 5 h de incubación y semillas sin pelar de modo de optimizar los recursos implicados. Además, se determinaron los patrones topográficos de tinción para semillas viables y no viables.

**Palabras claves:** *Poncirus trifoliata*, vigor, escarificado químico, plántulas normales y anormales, viabilidad por tetrazolio.

## ABSTRACT

*Poncirus trifoliata* is the most important rootstock in citrus production in Argentina's Litoral. Its seeds present a slow and uneven germination due a physical dormancy associated to the presence of seed coats. The objectives of this research were to select the most appropriate chemical scarification method and to adjust tests for the determination of the physiological quality of *Poncirus trifoliata* seeds to improve the productivity of the nurseries of citrus plants under cover. A first experiment was conducted to assess the efficiency of three chemical scarification methods and the effect of these methods on seed vigor. Vigor was determined with the germination velocity index (GVI) and the mean time to maximum germination (MTMG). A second experiment was conducted to assess seed vigor and the role of seed coats in imbibition. To do this, the most effective chemical scarification method identified in the first experiment was compared with manual removal of both seed coats, and no removal of seed coats. Germination percentage and the vigor indices GVI, MTMG and the Conductivity Test (CT) were determined. At the end of the germination tests of the previous experiments, the seedlings were classified into two categories: normal and abnormal. Also, a preliminary experiment was carried out to evaluate the concentration and incubation time of the tetrazolium viability test (TZ) proposed by the associations of seed analysts, and the treatments to adjust the TZ test were defined based on the results obtained. The seeds were considered viable or non viable according to the different stains, elaborating topographic viability patterns in images. Scarification with sodium hypochlorite showed the best results. The imbibition curve of seeds with both seed coats showed a linear weight evolution, while seeds with only the testa removed or with both testa and tegmen removed showed an exponential weight evolution. The CT showed that chemically scarified seeds had no significant increase in conductivity compared to seeds with no seed coat removal. However, the high conductivity values in seeds with both seed coats manually removed showed a higher risk of deterioration in seeds subjected to this procedure. Patterns of seedlings were described for the categories of normal (vigorous and weak) and abnormal seedlings. It was determined as the most appropriate methodology to perform the TZ test the use of a concentration of 0.2% of the TZ salt, 5 h of incubation and unpeeled seeds to optimize the resources involved. **Key words:** *Poncirus trifoliata*, vigor, chemical scarification, normal and abnormal seedlings, viability.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Caracterización de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

#### 1. 1. Importancia de la especie en la producción citrícola

La citricultura Argentina se encuentra en expansión, con un incremento aproximado del 3% anual en los últimos 20 años. Esta actividad tiene una gran importancia económico-social para las distintas regiones productoras.

*Poncirus trifoliata*, comúnmente llamado trifolio, originario del Centro y Norte de China, es considerado el portainjerto más importante para la producción citrícola de la Región del Litoral Argentino. En la provincia de Entre Ríos, su uso en plantaciones comerciales supera el 90%, mientras que en Santa Fe y Buenos Aires es del 100% (5).

Es el pie que le entrega a su copa la mayor eficiencia productiva por m<sup>3</sup>. La fruta toma excelente color y tersura de piel, alto contenido de jugo y sólidos solubles, y buen tamaño (69). A su vez confiere mayor precocidad que cualquier otro utilizado hasta el momento, es el más longevo y su naturaleza caducifolia le transmite a la copa resistencia al frío, por lo tanto es utilizado en zonas con inviernos marcados donde hay elevado riesgo de heladas y se emplea especialmente para el mercado de fruta fresca (5; 69).

#### 1. 2. Descripción taxonómica y morfológica:



Figura 1: Hoja de *P.trifoliata*.



Figura 2: Fruto y semillas de *P.trifoliata*.

El trifolio es una especie perteneciente al Orden *Geraniales*, Familia *Rutáceas* y Género *Poncirus*. Se encuentra estrechamente emparentado con el género *Citrus* (4). Es una planta con hábito de crecimiento arbustivo y numerosas ramas que forman una copa cerrada con hojas

trifoliadas y caducas (Fig. 1). Posee espinas solitarias, fuertes, generalmente rectas, achatadas y muy afiladas. Las flores son hermafroditas, de color blanco y de tamaño variable. Florece en primavera, cuando aún la planta no tiene hojas. El fruto es un hesperidio de forma globosa de 3 a 5 cm de

diámetro, de color amarillo-anaranjado, pubescente y con una fragancia característica (Fig. 2). Posee de 3 a 6 carpelos con alrededor de 50 semillas, grandes y de baja poliembrionía (15%) (5; 19).

### 1. 3. Requerimientos agro-climáticos de la especie:

*Poncirus trifoliata* es una especie muy longeva, se adapta muy bien a distintos tipos de suelos, pero prospera mejor en aquellos con pH entre 5 y 6. Tolera suelos pesados, siempre que no sean anegadizos. No tolera los suelos calcáreos ni salinos, ni períodos prolongados de sequía. Es muy sensible al viroide Exocortis, pero resistente al virus de la Tristeza y tolerante a la Psorosis y a la Cachexia. Es resistente a la gomosis del pie y a los nemátodos. Es afectado por los denominados declinamientos como el blight en Florida, el marchitamiento repentino de Uruguay y fruta bolita de Argentina (5; 69).

### 1. 4. Características de su semilla



Figura 3: Germinación de semillas de *P.trifoliata* pertenecientes al mismo lote a los 60 días en cámara.



Figura 4: Semillas enteras de *P.trifoliata*

La germinación de las semillas es de tipo hipogea (78). Es esta especie este proceso es muy lento y desuniforme pudiendo llegar a tardar entre 15 y 60 días para completarse (Fig. 3).

Las semillas de los géneros *Citrus* y *Poncirus* presentan dos tegumentos (Fig. 4). Uno interno, llamado tegmen, que es delgado y membranoso y otro externo llamado testa que es más duro y grueso que el anterior y presenta diferentes cantidades de lignina según la especie. Ambos son muy similares en su estructura celular, están compuestos por la epidermis de la pared del óvulo y sustancias del endosperma y la nucela en distintas proporciones (17; 38).

La desuniformidad que presentan los cítricos en su germinación es consecuencia de un tipo de latencia física debido a que los tegumentos actúan como una barrera a la imbibición de agua y la difusión de gases. Además de promoviendo de esta manera la putrefacción de las semillas y las dificultades que presentan en el proceso de germinación. También pueden presentar algún inhibidor del desarrollo del embrión (66; 67; 68; 78; 83). Probablemente las semillas de trébol posean este tipo de latencia física debido a alguna característica genética asociada a su carácter caducifolio ya que este es un mecanismo de defensa de las plantas a condiciones ambientales adversas (bajas temperaturas) (78).

Una característica de las semillas de los cítricos es que pierden su poder germinativo antes que las semillas de muchas otras especies. La calidad de las mismas puede verse afectada por factores de pre cosecha (sequías prolongadas, heladas, etc.) como así también por factores post cosecha (exposición al calor, al sol o la sequedad y al almacenamiento prolongado) (12).

Según *Roberts* (73) de acuerdo al comportamiento de las semillas en el almacenamiento se pueden distinguir dos categorías, ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas pueden sufrir desecación hasta contenidos muy bajos de humedad (2-5%) dependiendo de la especie, aunque existe una relación negativa entre el contenido de humedad y la longevidad (29; 30). Otra característica de este grupo de semillas es que pueden almacenarse durante largos periodos a bajas temperaturas sin sufrir daño (32).

Las semillas recalcitrantes son aquellas que sufren daño al deshidratarse y no pueden sobrevivir con contenidos de humedad inferiores a entre un 15 a un 50% (33; 42). Por lo tanto estas semillas no toleran tiempos prolongados de almacenamiento (32). Este tipo de semillas se diseminan en condición húmeda y metabólicamente activas (51; 58), perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (52).

Las semillas de las especies pertenecientes a los géneros *Citrus* y *Poncirus* muestran baja tolerancia a la desecación y exhiben comportamiento de almacenamiento recalcitrante o intermedio (53; 82).

## 2. Reproducción de portainjerto mediante semillas

A partir de la normativa vigente para la producción de especies cítricas en vivero, en la que se establecen las medidas fitosanitarias respecto al material de propagación de cítricos (Resolución Senasa 930/2009 – Ver ANEXO), se presenta una problemática sobre el manejo del mismo ya que se modifican factores del proceso productivo lo cual implica un incremento en los costos y por ende toma importancia la determinación de calidad de semillas para obtener el mejor aprovechamiento (11; 62).

La producción de plantas cítricas comienza con la obtención, almacenamiento y posterior siembra de la semilla de los portainjertos.

Los frutos de trifolio en la Región Litoral de la Argentina maduran en el mes de mayo, momento en cual se extraen las semillas para preparar los próximos almácigos. El origen y la sanidad de las semillas deben estar debidamente certificados por el INASE.

La utilización de semillas para la obtención de portainjertos es una excelente técnica para la eliminación natural de virosis y bacteriosis ya que éstas no presentan formación de vasos conductores suficientes para la traslocación de patógenos hacia los embriones nucelares (21). Asimismo, no existen evidencias de transmisión de *Candidatus liberibacter spp.* (HLB) a través de semillas en cítricos. Muchas especies y cultivares de los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* son capaces de reproducirse agámicamente por apomixia o poliembrionía, formando varios embriones a partir de la diferenciación de células de la nucela (38). En *Poncirus trifoliata* la poliembrionía varía entre un 15 y un 70% (19; 69).

Los almácigos cítricos bajo cubierta plástica en bandejas o cajones germinadores, requieren de condiciones ambientales óptimas (sustrato apropiado, riego, fertilizaciones, pulverizaciones fitosanitarias oportunas y mayor temperatura) que permitan lograr en menor tiempo plantines con buen desarrollo y vigor (71).

Para superar la latencia que confieren los tegumentos de las semillas y así aumentar la tasa de germinación y la uniformidad de emergencia de plántulas pueden utilizarse tratamientos como inmersión en agua a diferentes temperaturas, calor seco y húmedo, también tratamientos químicos con enzimas o solventes orgánicos, sustancias estimuladoras de la germinación y reguladores de

crecimiento (47; 78). Entre los compuestos químicos que pueden ser utilizados se mencionan el hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico en solución y a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de exposición (43; 67).

### **3. Acondicionado y almacenamiento de semillas**

Se define como almacenamiento al proceso por el cual se conservan las semillas viables desde el momento de la recolección hasta el momento de su siembra (46).

El deterioro de las semillas almacenadas es influenciado por la variedad, presencia de patógenos, humedad y temperatura del aire (55; 59) y por los tratamientos químicos, la manipulación y tipo de almacenamiento (64; 22).

La mayoría de las semillas se conservan bien si se las almacena con bajo contenido de humedad interna, pero las semillas recalcitrantes como las de *Poncirus trifoliata*, no toleran la pérdida de humedad y pierden rápidamente su viabilidad, lo cual afecta su capacidad de almacenamiento (21). Las semillas de trifolios pueden almacenarse sin perder su calidad fisiológica por siete meses cuando se almacenan con un 25-30% de humedad interna, acondicionadas con fungicidas, en bolsas impermeables y en cámara a 5°C (1; 21; 75).

### **4. Calidad de semilla**

Se entiende por calidad de semillas a una serie de cualidades o atributos que éstas deben reunir en conjunto y no en forma aislada. Dentro de estos atributos se encuentran la pureza físico-botánica, buen estado sanitario, alto grado de uniformidad, alta viabilidad y alto vigor. Estos atributos son evaluados a través de distintas pruebas (3; 13; 35).

En el contexto de las semillas la calidad puede subdividirse en cuatro cualidades básicas: genética, fisiológica, sanitaria y física. Cada una de ellas aporta su capacidad para originar plantas productivas. La debilidad en cualquiera de ellas introduce un factor limitante y como consecuencia plantas poco productivas. La mejor genética no puede expresar su verdadero potencial si la semilla está fisiológicamente deteriorada mostrando mala germinación (72).

Este trabajo se centra en la calidad fisiológica de las semillas de *P. trifoliata*. La calidad



fisiológica es la capacidad de la semilla para germinar, emerger y dar origen a plantas uniformes y vigorosas. En el momento que la semilla madura llega a la máxima vitalidad. A partir de ese momento comienza a envejecer o perder vigor porque la semilla continúa respirando y gastando energía para mantener sus funciones vitales. El nivel extremo de envejecimiento es la muerte o pérdida de la capacidad para dar una planta normal y vigorosa (2; 3; 35).

Previo a la siembra debe analizarse la calidad fisiológica de las semillas para determinar su viabilidad, poder germinativo y vigor.

#### **4.1 Prueba de germinación estándar**

La Prueba de germinación estándar determina el potencial máximo de germinación de un lote de semillas bajo condiciones ambientales controladas de laboratorio y se expresa como porcentaje de plántulas normales (36). Cuando la semilla madura, llega a la máxima vitalidad y a partir de ese momento comienza a envejecer debido al gasto energético necesario para mantener las funciones vitales (44). La prueba de germinación estándar no permite estimar adecuadamente este deterioro natural y progresivo, así como tampoco permite calcular la rapidez y uniformidad de germinación y emergencia. Por estos motivos no constituye una medida adecuada del potencial de las semillas (13; 26).

Se utiliza para determinar la proporción de semillas que son específicamente capaces de germinar y se expresa como porcentaje de plántulas normales. Este parámetro hace referencia a la máxima capacidad genética de la semilla evaluada ya que se realiza en óptimas condiciones artificiales, permitiendo que las mismas expresen su máximo potencial de germinación y de producción de plántulas normales (36; 37).

#### **4.2 Pruebas de Vigor: IVG, TMG y Conductividad Eléctrica**

El vigor es definido como el conjunto de propiedades de la semilla que determinan su potencial para una emergencia rápida y uniforme, y para el desarrollo de plántulas normales bajo un amplio rango de condiciones de campo (8; 16). Es por ello que a la calidad fisiológica de las semillas se la denomina comúnmente vigor de la semilla (18). Entre las pruebas para determinar el vigor de las semillas se encuentran el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) y el Índice de Tiempo Medio de

Germinación máxima (TMG) que se interpretan como la velocidad máxima hipotética que se obtendría si todas las semillas germinasen en los primeros días después de la siembra (76), y el tiempo medio necesario para que ocurra el máximo de germinación (28), respectivamente. Estas pruebas se constituyen en mejores indicadores del potencial de las semillas para producir plántulas normales que la prueba de germinación estándar, ya que son más sensibles para expresar al deterioro natural y progresivo de las semillas (35; 37; 45).

La Prueba de Conductividad Eléctrica se caracteriza por ser un ensayo no subjetivo que junto con la Prueba Topográfica por Tetrazolio, es el ensayo bioquímico más usado para la determinación de la calidad fisiológica de las semillas (41).

La pérdida de la integridad de las membranas celulares es la primera manifestación de la reducción o pérdida de calidad de las semillas. La variación de la permeabilidad de las membranas permite detectar el grado de deterioro de las semillas y su consecuente pérdida de viabilidad y vigor (15; 26). Las semillas deterioradas liberan mayor cantidad de sustancias como iones y azúcares que aquellas que no lo están, indicando una mayor permeabilidad de sus membranas (79).

La cantidad de exudados liberados por las semillas al agua de imbibición puede ser influenciada por varios factores entre los cuales podemos nombrar: el estado de madurez al momento de la cosecha, el genotipo, el tamaño, la edad de la semilla, por daños en el tegumento de las semillas, por la temperatura del agua y el tiempo de imbibición, entre otros (81). Si bien el deterioro es un proceso irreversible, un manejo correcto y eficiente de las condiciones ambientales de almacenamiento permiten reducir su velocidad (39).

La Prueba de Conductividad Eléctrica se basa en la medición de la conductividad eléctrica de la solución de inmersión de las semillas, lo cual permite distinguir aquellas semillas de la muestra que poseen un gran deterioro de aquellas semillas con buena integridad de las membranas celulares (39).

Para realizar esta prueba puede utilizarse el Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S. Este equipo consta de: a) un cabezal multielectrodo con 100 pares de electrodos de acero inoxidable, b) una bandeja de lixiviación/incubación con 100 celdas, c) una bandeja de lavado del cabezal, d) una bomba dosificadora / lavadora que comanda un dosificador múltiple y permite regular la cantidad de agua que arrojan los picos del dosificador y la circulación de agua dentro de la bandeja lavadora, e) un

dosificador con 10 picos para el llenado simultáneo de 10 celdas, f) una comunicación a una PC, g) un programa de medición y manipuleo de datos que permite expresar los resultados en: Conductividad eléctrica de cada semilla (100 semillas totales) expresada en microsiemens por centímetro ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y en microsiemens por centímetro por gramo ( $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{gr}$ ); Conductividad Media del Lote ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); valores de Poder Germinativo y Vigor (expresados en %). Además, permite obtener datos estadísticos como desvío estándar, gráficos de mediciones individuales, histogramas de frecuencia relativa y acumulada (24).

Las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA) validan la Prueba de Conductividad Eléctrica Masal únicamente para la especie *Pisum sativum* (50). Sin embargo existen referencias de la utilización de esta prueba para la determinación de vigor de semillas en diversas especies entre las cuales encontramos al híbrido *Citrumelo swingle* (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* Raf.) (22).

#### **4.3 Patrones de plántulas normales y anormales**

En la Prueba de Germinación Estándar, los resultados se expresan en Porcentaje de Plántulas Normales (50). En esta categoría para la determinación del vigor las plántulas se clasifican según su crecimiento y anomalías admitidas en normales vigorosas, normales débiles y anormales. Así mismo, en las pruebas de vigor los resultados también se refieren al número de plántulas normales (63), para lo cual es fundamental disponer de patrones de plántulas normales y anormales para la correcta realización de las pruebas de germinación en *Poncirus trifoliata*.

En algunas especies se dispone de estos patrones como los descritos en AOSA (9) para semillas de algodón, frijoles, maní y soja o en *Aspidosperma* (3) y en *Juglans nigra* (35). Sin embargo, no se dispone hasta la actualidad de estos patrones para *Poncirus trifoliata*.

En *Poncirus trifoliata*, al tratarse de una especie de germinación hipogea, existen cuatro zonas claves para realizar la evaluación morfológica de plántulas: el sistema radical, el epicótilo, la yema terminal y los cotiledones. Durante la germinación, cada una de estas zonas debe estar esencialmente libre de defectos visuales (9; 50).

Según ISTA una plántula normal es aquella que muestra el potencial para continuar desarrollándose en plantas aceptables cuando crecen en suelo de buena calidad y bajo condiciones

favorables de humedad temperatura y luz (40). La misma presenta todas las estructuras necesarias para un buen crecimiento y desarrollo. Es importante destacar que dentro de las plántulas normales existen diferencias estructurales y fisiológicas entre las mismas y esto se identifica mediante una subclasificación de las plántulas normales en dos categorías: vigorosas y débiles. Se proporciona así un medio para distinguir entre plántulas libres de lesiones y plántulas que tienen deficiencias. Entre estas deficiencias se puede mencionar la ausencia de raíz primaria, lesiones en el epicótilo, ausencia de un cotiledón, necrosis en uno o ambos cotiledones y plántulas poco desarrolladas, entre otras (9; 40).

Por el contrario, una plántula anormal no muestra el potencial para continuar desarrollándose en futuras plantas aceptables cuando crecen en suelos de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad temperatura y luz (40). Esta se caracteriza por la pérdida de una o más de sus estructuras esenciales, que puede ser la raíz, la plúmula o la yema terminal.

#### **4.4 Prueba Topográfica de Viabilidad por Tetrazolio**

La prueba topográfica de “Viabilidad por Tetrazolio” (TZ) (56) es utilizada para el análisis de semillas de numerosas especies. Constituye un instrumento de diagnóstico que provee una rápida evaluación de la viabilidad de las semillas (35; 47; 57; 60).

Se basa en la capacidad bioquímica de los tejidos vivos que causan la reducción cuantitativa de la sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio. La solución de la sal de tetrazolio que es inicialmente transparente e incolora, se transforma en una sustancia no difusa de color rojo de diversas intensidades llamada formazona mediante su reducción por los cationes hidrógeno producidos en los tejidos vivos de la semilla. Esto produce distinta coloración en ciertas áreas de la semilla y permite diferenciar los tejidos vivos y sanos de aquellos débiles, deteriorados y muertos (3; 13; 31; 35).

Según ISTA una semilla viable debe mostrar coloración en todos los tejidos necesarios para producir una plántula normal, según las especies se permiten pequeñas áreas no coloreadas o no teñidas en algunos de esos tejidos. Una semilla no viable muestra deficiencias y/o anomalías de tal naturaleza que impide su desarrollo en plántula normal, la semilla presenta tejidos importantes sin teñir o con coloraciones atípicas (12). Los colores que pueden presentarse son rosado, rojo intenso,

blanco, amarillo y marrón. Todas las tonalidades rosadas se corresponden con tejidos vivos y sanos. El rojo intenso denota un incremento en la respiración de los tejidos y puede corresponderse con tejidos deteriorados. Los tejidos sin tinción, opacos, de color amarillo o marrón o con falta de turgencia se corresponden con tejidos muertos (3; 25). Es así que las semillas totalmente teñidas son consideradas viables, aquellas totalmente sin teñir son no viables y las parcialmente teñidas pueden considerarse viables o no viables dependiendo de la proporción y la posición de los tejidos sin teñir o necróticos que presenten y también del tamaño y profundidad e intensidad del color (12).

Es importante realizar un correcto pre-acondicionamiento de las semillas para asegurar una correcta hidratación de los tejidos que permita lograr una buena tinción (12; 70). Las semillas embebidas son menos frágiles que las secas, por lo que se pueden cortar, pinchar o pelar con mayor facilidad, el teñido es más parejo lo que facilita la evaluación (12). Para ello, las semillas de algunas especies pueden ser hidratadas rápidamente sumergiéndolas directamente en agua sin sufrir daño (por ej. Maíz o sorgo) y otras deben ser hidratadas lentamente sobre o entre papeles húmedos (por ej. quebracho o arveja). La hidratación lenta se recomienda en especies propensas a fracturarse si se sumergen directamente en agua, se realiza en semillas grandes, viejas o muy secas para evitar que los tejidos se dañen debido a una rápida imbibición (3; 12; 70). El manual AOSA (10) recomienda para las semillas de especies de la familia *Rutáceas* sumergirlas en agua a 21°C durante 18 h.

Las semillas una vez pre-acondicionadas deben pasar por una preparación para la tinción, ya que en muchas especies es necesario exponer los tejidos antes de la tinción para favorecer la penetración de la solución de tetrazolio y facilitar la evaluación. En los manuales se describen procedimientos estandarizados para la exposición de los tejidos en cada familia o especie, entre estos se encuentra la remoción de cubierta seminal, perforado de las semillas, corte longitudinal, corte transversal, incisión transversal, y la escisión de embriones (12). Para la familia *Rutáceas*, AOSA (10) establece realizar un corte longitudinal con bisturí a través de la mitad del embrión y  $\frac{3}{4}$  del endosperma.

La prueba debe realizarse en total oscuridad, ya que la reacción que se produce dentro de los tejidos es sensible a la luz. Luego de la incubación en la solución de TZ, pueden observarse diferentes intensidades de tinciones debido a la velocidad de absorción de la solución, cuanto más rápida sea ésta, más intensa será la coloración de los tejidos. Igualmente, esto no modifica el resultado, siempre

que los tejidos se observen turgentes y brillantes. Las tinciones muy oscuras deben evitarse modificando la concentración de la sal, el tiempo de incubación y/o la temperatura de la misma (31).

Esta prueba de viabilidad no solo nos revela aspectos esenciales para conocer la calidad del lote, sino que también puede servir de guía para evaluar lotes de semillas con dormición profunda o con presencia de algún tipo de latencia que muestran una germinación lenta que dificulta realizar las pruebas de germinación pero que no debe confundirse con una mala calidad, y también para detectar daños de cosecha y procesamiento (calor, mecánicos, por insectos) (12; 74).

Por tal motivo, es de interés que los patrones de tinción presenten una elevada correlación con las pruebas de germinación y de vigor tal como se observó en nogal negro (35) y en roble (18).

La Viabilidad es claramente independiente de la realización de la Prueba de Germinación, sin embargo no habrá diferencias significativas entre ambas cuando las semillas no están dormidas, duras, o se ha eliminado la dormición, no están infectadas o han sido desinfectadas, no han sido tratadas en el campo, procesamiento o almacenamiento con productos químicos nocivos, no han brotado durante el almacenamiento, no se deterioraron durante la prueba de germinación y germinaron en condiciones óptimas (12).

Para la utilización agronómica de la prueba de Tetrazolio debe determinarse el protocolo de preparación, las condiciones de incubación (tiempo, temperatura y concentración) y los patrones de evaluación para cada especie en particular (47).

Existen antecedentes de ésta prueba para determinar viabilidad en semillas de la familia *Rutáceas*, y del género *Poncirus*. Sin embargo los protocolos propuestos varían en el tiempo de incubación y en la concentración de la sal de tetrazolio (10; 22; 60; 80). Carvalho et al. (22) utilizaron para la prueba de TZ en *Citrumelo swingle* una concentración de 0,5% de TZ durante 6 h. ISTA (48) propone para el género *Poncirus* un tiempo de incubación de 6 a 24 h y una concentración entre 0,1 y 1%, mientras que AOSA (10) sugiere para la familia *Rutáceas* un tiempo de exposición a la sal de 18 h y una concentración del 1%.

Una combinación adecuada de la concentración, del tiempo y la temperatura de incubación permitirá tinciones nítidas para poder determinar el estado fisiológico de los tejidos y estructuras de las semillas de una manera más rápida, económica y eficiente (25).

AOSA (10) describe los patrones de semillas viables y no viables para los géneros *Citrus*, *Dictamnus* y *Ruta* dentro de la familia *Rutáceas*, pero no para el género *Poncirus*.

### FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a la normativa vigente que rige sobre la producción en viveros cítricos, el manejo de las semillas y de los plantines se ha modificado sustancialmente. Surge así la necesidad de contar con herramientas prácticas para la determinación de la calidad de lotes de semillas de trifolio que puedan utilizarse para maximizar la eficiencia de la producción en viveros cítricos.

Existen pruebas rápidas, como las pruebas bioquímicas de tetrazolio y conductividad eléctrica, mediante las cuales puede evaluarse la calidad fisiológica de las semillas, no obstante no existen protocolos específicos para la utilización de estas técnicas en semillas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Asimismo dentro de las pruebas de vigor, hay otra categoría que evalúa el porcentaje de plántulas normales (vigorosas y débiles) y anormales, pero hasta el momento no están descritas para la especie en estudio.

La técnica de escarificación química de semillas de *P. trifoliata* es una herramienta útil y eficaz para disminuir el tiempo de germinación y en consecuencia minimizar el tiempo de obtención de portainjertos cítricos, pero es indispensable determinar cual es el método mas sencillo y práctico para realizarla y cuantificar el efecto que la misma ocasiona sobre la calidad fisiológica de las semillas.

## OBJETIVO GENERAL

Seleccionar el método de escarificado químico más adecuado y ajustar pruebas para la determinación de la calidad fisiológica de semillas de *Poncirus trifoliata* con la finalidad de mejorar la productividad de los viveros de plantas cítricas bajo cubierta.

### Objetivos específicos:

## CAPÍTULO I

Seleccionar las técnicas de escarificado químico más eficientes

Evaluar su efecto sobre el proceso de imbibición y vigor de las semillas.

## CAPÍTULO II

Elaborar patrones de plántulas normales y anormales de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

## CAPÍTULO III

1. Determinar la concentración y el tiempo de incubación en tetrazolium que permiten obtener la tinción más adecuada para evaluar viabilidad de las semillas.
2. Observar la influencia del escarificado químico sobre la tinción en la prueba de tetrazolium.
3. Obtener patrones de tinción de semillas viables y no viables de la especie.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar y fechas de la experiencia**

El presente trabajo se realizó durante el año 2017, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario - Campo Experimental J. Villarino. Localidad de Zavalla, provincia de Santa Fe, Argentina.

Las diferentes pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal, el laboratorio de Biología y la cámara de germinación de la cátedra de Mejoramiento Vegetal y Producción de Semillas de la FCA-UNR y en los laboratorios de semillas del la Estación Experimental INTA Oliveros.

### **Obtención de las semillas**

Las semillas utilizadas en los diferentes experimentos eran material de propagación certificados en su sanidad y proporcionado por el Centro de Incremento Regional de Material Cítrico (CIR) de INTA San Pedro.

En el mes de mayo de 2017 fueron cosechados los frutos maduros al azar de un lote de 4 plantas formando una muestra homogeneizada del mismo. Luego se les extrajo las semillas y las mismas fueron almacenadas hasta agosto de 2017, momento en el que se realizaron los diferentes ensayos.

Para la extracción de las semillas se procedió a realizar un corte poco profundo en la zona ecuatorial de los frutos para evitar dañar las semillas. Luego se tomaron las dos mitades y se las giró en sentido contrario para separarlas y se presionaron para extraer todas las semillas. Esto se debe realizar teniendo la precaución de desinfectar las herramientas y los recipientes utilizados. Posteriormente se les realizaron tres lavados en un tamiz de trama gruesa para separar las semillas del jugo y la pulpa del fruto y se las frotó suavemente con un poco de arena para quitar el mucílago que las recubre. Luego se enjuagaron y se dejaron orear al aire. Inmediatamente se almacenan en bolsas de papel de 1 kg envueltas a su vez en bolsas plásticas impermeables y se llevaron a cámara fría a 5°C hasta el momento de su utilización.

## **CAPITULO I**

**“Escarificado químico y evaluación de su efecto  
sobre el proceso de imbibición y el vigor de las  
semillas”**

# CAPITULO I

## MATERIALES Y MÉTODOS

En un primer experimento se evaluó la efectividad de tres tratamientos de escarificado químico para desprender los tegumentos de las semillas de *Poncirus*, y su posterior efecto sobre el vigor de las semillas.

El primer tratamiento (T1,1) consistió en sumergir las semillas en agitación constante por 45 minutos a temperatura ambiente en una solución de 0,5 L de hipoclorito de sodio (NaClO) al 12%, 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) y 20 g de hidróxido de sodio (NaOH), disueltos en 1 L de agua (Fig. I-1a). Se utilizó 1 L de esta solución por cada 50 g de semillas. Por último se realizó un frotado de las semillas unas con otras en un lienzo para completar el desprendimiento de los tegumentos (67).

El segundo tratamiento (T2,1) consistió en remojar las semillas en agua durante 12 h, luego escurrirlas y lavarlas por 1 a 2 minutos con una solución de hidróxido de calcio al 5%, y posteriormente enjuagarlas con abundante agua. Luego, se colocaron las semillas en una solución compuesta por 0,5 L de hipoclorito de sodio al 4% en 1 L de agua destilada (Fig. I-1b), cuyo pH se ajustó a un valor entre 11,5 – 12 por medio del uso de una solución concentrada de hidróxido de sodio. Se mantuvo en una proporción de 1,5 L de solución por cada Kg de semillas. Se controló el pH durante todo el proceso (en caso de que el mismo bajase a valores menores a 11, se ajustó con la solución de hidróxido de sodio). Se colocó en baño María a 35 °C hasta que se verificó el desprendimiento de la testa (aprox. 2,5 h). Luego las semillas se colaron y lavaron con agua corriente, y se frotaron sobre un lienzo para despegar los tegumentos (43).

El tercer tratamiento (T3,1) se basó en la experiencia preliminar de García (comunicación personal). El procedimiento consistió en remojar las semillas en agua durante 12 h. Luego, se colocaron en una solución de concentración 50% v/v de hipoclorito de sodio al 5% en agua destilada a una temperatura de 36 °C, removiendo cada media hora hasta constatar el desprendimiento de los tegumentos (Fig. I-2). Se utilizó una proporción de 4 L de solución por cada Kg de semillas (aproximadamente 4000 semillas Kg<sup>-1</sup>). El proceso de pelado tuvo una duración aproximada de 2,5 h.



*Figura I-1: Escarificado químico Oliveira et al. (67) (a); Escarificado químico Grasso et al. (43) (b)*



*Figura I-2: Escarificado químico (a); Tegumentos despegados y en suspensión (b).*

Para la determinación del vigor se utilizaron los índices de velocidad de germinación (IVG) y tiempo medio de germinación (TMG), para lo cual las semillas fueron llevadas a cámara de germinación en rollos de papel húmedo, colocando los mismos en forma vertical, a una temperatura de 25 °C y luz constante. Diariamente se verificó la germinación (protrusión de la radícula a través de los tegumentos) durante 30 días, calculándose los índices de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$IVG = (\sum C_i / (\sum C_i * T_i)) (\sum C_i / N) 100 \quad (76).$$

$$TMG = (\sum C_i * T_i / (\sum C_i)) (N / \sum C_i) \quad (28).$$

Donde:

$C_i$  = número de semillas germinadas por día.

$T_i$  = período (en días) desde el comienzo del ensayo.

$N$  = Número total de semillas utilizadas en la muestra.

Con los datos anteriores también se calculó el porcentaje de germinación en base a la fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = (N^\circ \text{ semillas germinadas} / N^\circ \text{ total de semillas}) \times 100$$

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 repeticiones de 50 semillas cada una.

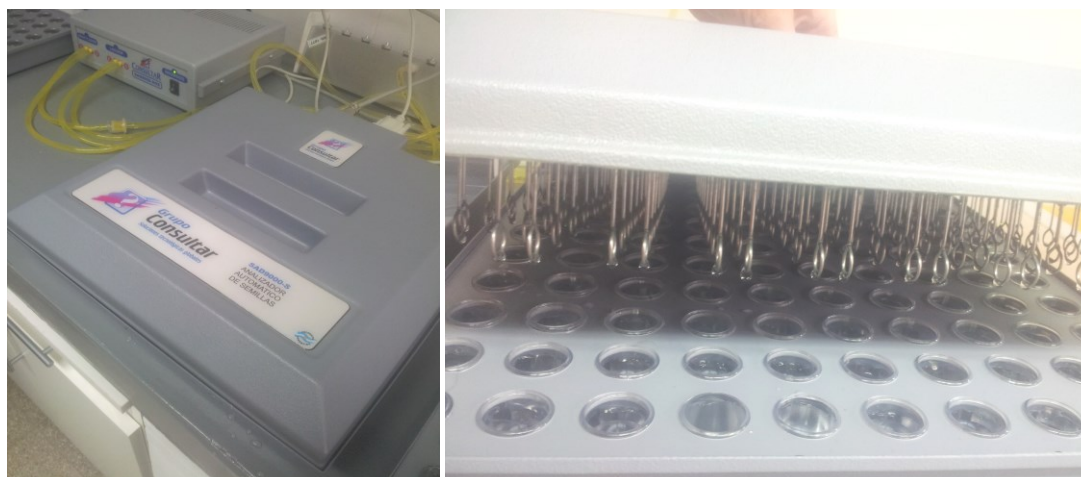
En un segundo experimento se comparó el efecto del escarificado químico más efectivo del primer experimento en relación a semillas peladas manualmente y semillas sin pelar de modo de evaluar el vigor de las semillas, y el rol de los tegumentos seminales en el proceso de imbibición. Se utilizaron siempre semillas de un mismo lote homogéneo.

Para ello se elaboraron las curvas de imbibición en función de tres tratamientos: T1,2; semillas peladas manualmente (sin ambos tegumentos), T2,2; semillas peladas químicamente (sin testa) y T3,2; semillas con ambos tegumentos (testigo). El pelado manual se efectuó realizando una incisión con bisturí en la zona distal del eje embrionario de la semilla y luego se retiraron ambos tegumentos. Previo a la imbibición se realizó un pesaje inicial de las muestras, luego se colocaron en recipientes con 50 cm<sup>3</sup> de agua destilada y se cubrieron con film. Se evaluó la evolución del peso en fresco de las muestras de semillas con balanza analítica marca OHAUS modelo Scout Pro SP 4001, a períodos de 4 h durante 6 días.

Previo al ensayo de imbibición se determinó la relación de peso semilla/tegumentos para cada tratamiento comparando el pesaje de cada muestra de semillas antes y después de realizar el pelado.

El ensayo de imbibición se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA) con dos repeticiones de 50 semillas para cada tratamiento. A los datos registrados se les realizó el análisis de regresión y se establecieron modelos gráficos para obtener las curvas de tendencia para cada tratamiento.

En el segundo experimento, además de determinar el porcentaje de germinación y los índices de vigor IVG y TMG descriptos para el primer experimento, también se determinó el vigor de las semillas mediante la Prueba de Conductividad Eléctrica individual de las semillas (Fig. I-3). Para realizar las mediciones se utilizó un analizador automático de semillas SAD 9000-S, equipado con un cabezal multielectrodo con 100 pares de electrodos de acero inoxidable y una bandeja de lixiviación/incubación con 100 celdas (6; 24).



*Figura I-3: Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S (Laboratorio de semillas EEA INTA Oliveros).*

Como primer paso, se pesaron las semillas en lotes de 100 unidades y luego se calculó el peso promedio por semilla para poder expresar la medición de Conductividad Eléctrica media del lote en  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . Pevio a la medición, se realizó un lavado cuidadoso de las celdas de cada bandeja con agua deionizada. Luego se agregaron 8 ml de agua deionizada en cada celda con el dosificador múltiple que posee el analizador y se sumergió una semilla en cada celda hasta completar las 100 celdas de la bandeja de incubación. Para evitar la posible evaporación y/o contaminación del agua, se cubrió cada bandeja con polietileno y luego se llevó a cámara a 25°C durante 24 horas. Finalizada la incubación se procedió a realizar la medición.

En este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 100 repeticiones por tratamiento ya que el analizador realiza una medición individual de cada celda de la bandeja de incubación.

En todos los casos, los datos se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat (27), realizándose el Análisis de la Variancia y la Comparación de las medias de los tratamientos a través del test de Tukey con un nivel de significación de 0,05. La normalidad de los residuos fue verificada mediante test de hipótesis y métodos gráficos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer experimento se demostró que el tratamiento de escarificado con hipoclorito de sodio (T3,1) permitió alcanzar el IVG más elevado y el TMG más bajo, aunque en este último caso no presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento T2,1. El porcentaje de germinación fue elevado en todos los tratamientos (Tabla I-1). Además, la técnica de pelado químico en solución con hipoclorito de sodio fue la más eficiente permitiendo eliminar la testa con facilidad y rapidez (Fig. I-2), sin necesidad de realizar operaciones adicionales.

En cambio, en los otros tratamientos (Fig. I-1) fue necesario recurrir al frotado posterior en un lienzo para provocar el desprendimiento de los tegumentos, lo cual también fue expresado por sus autores (43; 67).

*Tabla I-1: Influencia de los diferentes tratamientos de escarificado químico de semillas sobre el Tiempo Medio de Germinación (TMG) y el Índice de Velocidad de Germinación de Poncirus trifoliata. Valores promedio de 4 repeticiones por tratamiento.*

Tratamientos	TMG (días)	IVG (%)	Germinación (%)
T1,1	9,38 b	10,78 c	94,0 a
T2,1	6,20 a	16,13 b	97,5 a
T3,1	5,28 a	18,96 a	98,5 a

*T1,1: Oliveira et al. (67); T2,1: Grasso et al. (48); T3,1: García . Letras diferentes en las filas y columnas indican diferencias significativas según ANOVA y Comparación de medias a través del test de Tukey con un nivel de significación  $p < 0,05$ .*

Oliveira *et al.* (67) determinaron que el hipoclorito de sodio es el principal compuesto dentro de la solución que ellos utilizaron para el escarificado químico de semillas, lo cual queda corroborado en nuestro experimento. Por lo tanto, se demostró que no es necesario emplear otros compuestos químicos como el hidróxido de sodio o el ácido clorhídrico. El hidróxido de sodio se emplea como solución buffer para mantener el pH de la solución en 11 (54). El hipoclorito de sodio (5%) viene formulado a ese pH, y a las concentraciones, temperaturas, tiempos de reacción, y relación semilla/solución utilizadas en este trabajo, no mostró variaciones en el pH.

La utilización de ácido clorhídrico se propone como agente corrosivo para degradar el tegumento (67). Sin embargo, su inclusión no fue efectiva, ya que con sólo utilizar hipoclorito de sodio se obtuvieron los mejores valores de IVG y TMG (Tabla I-1).

En el segundo experimento se observó que las semillas peladas manualmente (T2, 1) iniciaron la imbibición con un peso promedio de 11,15 g, las sin testa (pelado químico; T2, 2), con 11,60 g, y las sin pelar (T3, 2), con 12,20 g. La diferencia de los pesos iniciales de los tres tratamientos se debió a la presencia o no de los tegumentos. Ambos tegumentos representaron un 8,6% del peso total de la semilla y cada uno de ellos por separado representó el 4,9% y el 3,7%, para la testa y el tegmen, respectivamente.

La curva de imbibición de las semillas sin pelar se ajustó a un modelo de regresión no lineal - exponencial, mientras que en las semillas escarificadas químicamente (sin testa) la ganancia de peso fue lineal. Por su parte, la imbibición de las semillas peladas manualmente (sin testa ni tegmen) se ajustó a un modelo no lineal - hiperbólico (Fig. I-4). La ganancia de peso al final del experimento, luego de 140 h de imbibición, fue de 0,5 g para las semillas sin pelar, 1,6 g para las semillas peladas químicamente, y de 1,95 g para las semillas peladas manualmente (Fig. I-4). Las semillas peladas manualmente mostraron una saturación del proceso de absorción de agua luego de 72 horas, momento a partir del cual no se observó un aumento de peso considerable entre mediciones.

La limitación que impuso la testa al proceso de imbibición hasta las 90 h fue en promedio del 65%, correspondiéndole el resto al tegmen, en relación a las semillas sin tegumentos (Fig. I-5).



La testa protege al embrión de las condiciones ambientales adversas, pero también afecta negativamente al proceso de imbibición impidiendo el inicio de las reacciones bioquímicas que finalizan en el proceso de germinación (15; 61; 65).

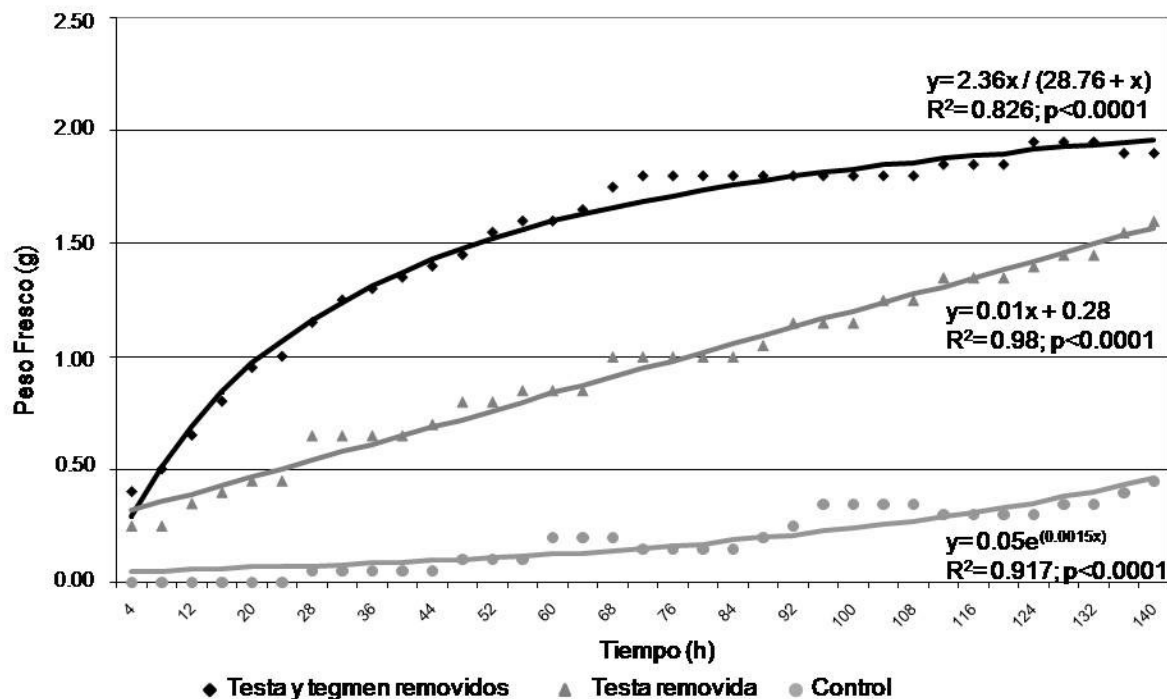
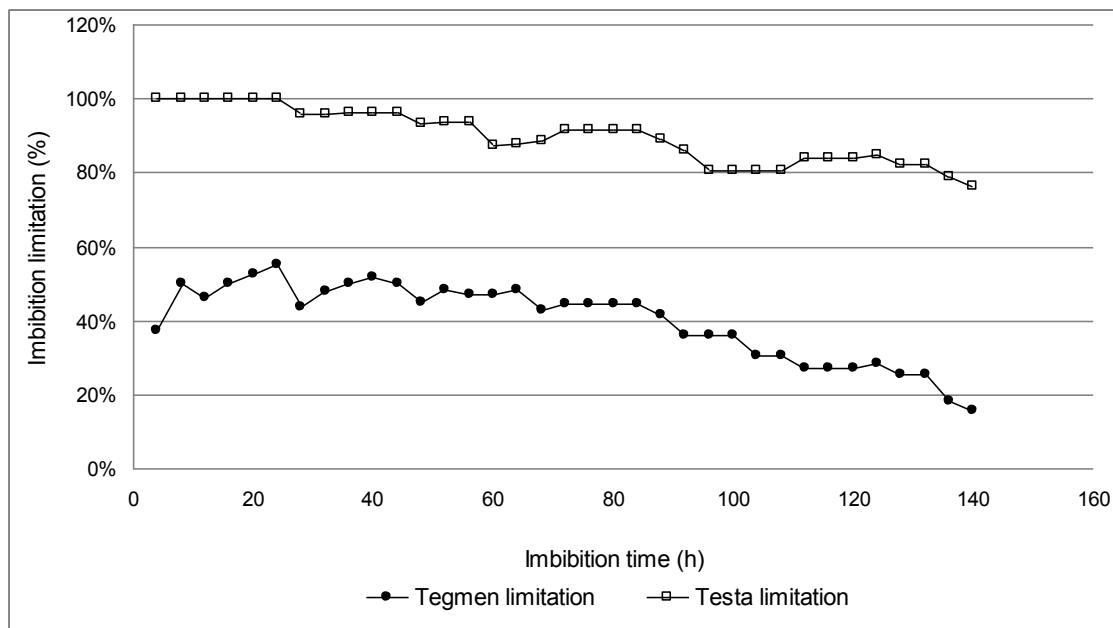


Figura I-4: Curvas de regresión ajustadas a diferentes modelos según la evolución de la imbibición de semillas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. sometidas a distintos tratamientos de remoción de sus tegumentos: T1,2: Pelado manual (; sin testa ni tegmen) Regresión no lineal- modelo hiperbólico; T2,2: pelado químico con hipoclorito de sodio (sin testa) Regresión lineal; T3,2: control sin pelar (con ambos tegumentos) Regresión no lineal - modelo exponencial.

Existen autores que afirman que la principal barrera física a la germinación de los cítricos es el tegmen (83), mientras que otros sostienen que son ambos tegumentos los que dificultan la imbibición (38; 66). En este trabajo podemos afirmar que en presencia de ambos tegumentos la limitación a la imbibición que ejerce la testa es siempre superior a la del tegmen, al menos hasta las 140 h evaluadas en este ensayo (Fig. I-5). Esto pudo evidenciarse ya que, la eliminación de la testa resultó suficiente para aumentar notablemente el proceso de imbibición, y por lo tanto para superar la dificultad que presentan estas semillas para germinar.

En la prueba de vigor de acuerdo al test de Conductividad Eléctrica se observó que el escarificado químico no aumentó de manera significativa el parámetro de conductividad eléctrica en relación a las semillas sin pelar (Tabla I-2). En cambio, en el tratamiento de pelado manual los valores de C.E. fueron muy elevados, al menos 271% superior en comparación al promedio de los demás tratamientos, lo que evidencia que aquellas semillas que carecen de ambos tegumentos presentan una elevada lixiviación de iones (Tabla I-2).



*Figura I-5: Importancia de los tegumentos seminales en la restricción del proceso de imbibición. Testa limitation corresponde a la limitación a la imbibición del tratamiento sin pelar (T3,2) respecto al pelado manualmente (T1,2). Tegmen limitation corresponde a la limitación a la imbibición del tratamiento de pelado químico (T2,2) con respecto al pelado manual (T1,2).*

A pesar de los valores elevados de conductividad eléctrica, las semillas peladas manualmente fueron las que mostraron el menor TMG. Este parámetro fue 4,5 veces superior en las semillas sin pelar. El pelado químico disminuyó el valor de TMG en aproximadamente 10 días respecto a las semillas sin pelar, aunque fue casi 2 días mayor respecto del tratamiento de pelado manual (Tabla I-2), lo cual puede ser explicado por la evolución de las curvas de imbibición (Fig. I-4).

El IVG fue muy diferente para cada tratamiento apareciendo como el parámetro más sensible a los mismos (Tabla I-2). Los cambios en sus valores fueron similares a las diferencias de imbibición entre tratamientos. De este modo los tratamientos con pelado químico y manual presentaron valores de

imbibición y de IVG que triplicaron y cuadruplicaron a los de las semillas control, respectivamente (Fig. I-6).

La prueba de germinación estándar mostró valores elevados para los tres tratamientos, aunque significativamente menores en las semillas sin pelar (Tabla I-2). El test de conductividad eléctrica no aportó información adicional respecto a los parámetros TMG e IVG, salvo el de indicar un mayor riesgo de conservación de las semillas sin tegumentos.



*Figura I-6: Semillas del mismo lote sometidas a los 3 tratamientos luego de 5 días en cámara de germinación en rollos de papel húmedo (a) pelado manual; (b) pelado químico; (c) sin pelar.*

Si bien con el pelado manual se aceleró el proceso de germinación, también se registró una elevada liberación de iones, por lo que es de esperar que las semillas sin sus tegumentos sean más propensas a perder rápidamente su calidad fisiológica si no son colocadas a germinar a la brevedad. Así mismo, esta técnica no resultaría práctica para ser utilizada por el productor viverista.

*Tabla I-2: Vigor de las semillas expresados a través del test de conductividad eléctrica y del tiempo medio de germinación (TMG) para semillas de *Poncirus trifoliata* sometidas a diferentes tratamientos de pelado. Datos promedio de 100 repeticiones por tratamiento.*

Tratamientos	CE ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ )	TMG Días	IVG (%)	Germinación (%)
Pelado manual (T1,2)	27,64 b	3,48 a	28,78 a	98,00 a
Pelado químico (T2,2)	9,52 a	5,28 b	18,96 b	98,50 a
Sin pelar (T3,2)	5,38 a	15,81 c	6,33 c	89,00 b

*Letras diferentes en las filas y columnas indican diferencias significativas según ANOVA y Comparación de medias a través del test de Tukey con un nivel de significación  $p < 0,05$ .*

## **CAPITULO II**

**“Patrones de plántulas normales y anormales de**

***Poncirus trifoliata* (L.) Raf.”**

## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

Al finalizar las diferentes Pruebas de Germinación efectuadas en los experimentos del primer capítulo, se procedió a clasificar a las plántulas de *Poncirus trifoliata* en dos categorías, normales y anormales. Ésta clasificación se efectuó a través de la evaluación morfológica del sistema radical, cotiledones y epicótilo, no incluyéndose al hipocótilo como un factor de evaluación debido a que es una especie de germinación hipogea (8).

Las plántulas normales se subdividieron, a su vez, en dos categorías según el vigor: normales vigorosas (*strong*) y normales débiles (*weak*). Se consideran plántulas normales vigorosas solo aquellas intactas, libres de lesiones y sin ningún tipo de deficiencia o anomalía. Aquellas que presentaron alguna deficiencia o irregularidad pero que, aún así, pueden ser consideradas normales se clasificaron como plántulas normales débiles (7; 49).

Se describieron las siguientes categorías de plántulas:

- I. Normales Vigorosas (plántulas sin anomalías).
- II. Normales Débiles (defectos aceptables).
- III. Anormales con defectos del sistema radical.
- IV. Anormales con defectos del sistema tallo.
- V. Anormales con defectos generales.

Se realizaron tablas descriptivas en donde se enumeraron las características que deben tener las plántulas para pertenecer a cada una de las categorías antes mencionadas teniendo en cuenta los criterios de evaluación desarrollados por ISTA (50).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Plántulas Normales

En la Tabla II-1 se describen las plántulas normales considerando la integridad y morfología de sus estructuras esenciales.

Tabla II-1. Descripción de Plántulas Normales de la especie *Poncirus trifoliata*

PLÁNTULAS NORMALES		
I- NORMALES VIGOROSAS (Strong)		
Plántula sin anomalías	Raíz primaria presente, sana, completa, extensa y con buen desarrollo. Epicótilo, yema terminal y hojas primarias presentes, sanos, completos y bien desarrollados. Puede presentar más de una plántula por semilla.	Figs. II-1 y II- 2
II- NORMALES DEBILES (Weak)		
Defectos aceptables en el Sistema Radical (Raíz primaria)		
La raíz presenta defectos considerados como leves porque no obstaculizan el futuro desarrollo de una planta normal.		
Desviaciones leves	La estructura se desvía levemente sobre si misma.	Figs. II-3 y II-4
Manchas decoloradas o necróticas	La raíz presenta áreas de tejido de color diferente al normal o áreas de tejido muerto rodeado de tejido de diferente coloración.	Fig. II-4
Defectos aceptables en el Sistema Radical (Epicótilo, yema terminal y hojas primarias)		
Las estructuras presentan defectos considerados como leves porque no obstaculizan el futuro desarrollo de una planta normal.		
Zonas decoloradas	Las estructuras presentan áreas de tejido de color diferente al normal.	Fig. II-5
Forma normal pero con crecimiento retrasado	Las estructuras se presentan intactas pero poseen un tamaño menor al normal.	Fig. II-5

### Plántulas Normales Vigorosas (Strong)



*Figura II-1. Plántula normal vigorosa (Strong)*

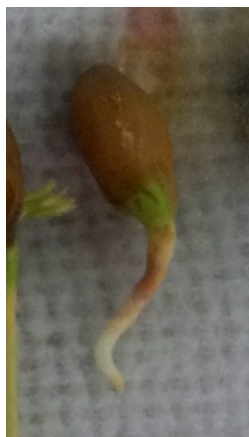


*Figura II-2. Plántulas normales originadas de una semilla poliembriónica.*

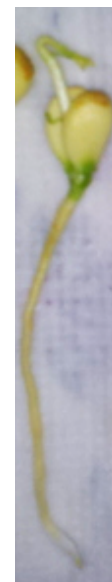
### Plántulas Normales Débiles (Weak)



*Figura II-3. Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves.*



*Figura II-4. Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves y mancha necrótica.*



*Figura II-5. Plántula normal Débil (Weak). Raíz con desviaciones leves y sistema del tallo retrasado.*



## Plántulas Anormales

Se han descrito como plántulas anormales aquellas que presentaron defectos o anomalías graves (Tabla II-2). Las plántulas anormales no conformarán un stand futuro de plantas en el campo ya que poseen alteraciones del tipo fisiológico, genético, morfológico y/o sanitario que impedirán el desarrollo de plantas adultas (40; 50).


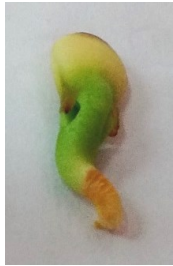

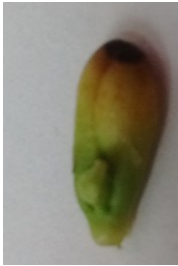





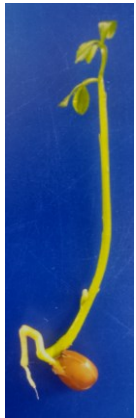






Tabla II-2. Descripción de Plántulas Anormales de la especie *Poncirus trifoliata*

PLÁNTULAS ANORMALES		
III-ANORMALIDADES DEL SISTEMA RADICAL (RAÍZ PRIMARIA)		
Atrofiada	Raíz con su extremo defectuoso o ausente.	Fig. II-6 y II-7
Mazuda	Raíz corta, engrosada en su extremo, con aspecto de garrote, denominada comúnmente <i>stubby</i> .	Fig. II-8
Ausente	Raíz faltante.	Fig. II-9
Retrasada	Raíz sin anomalías pero que no alcanza un desarrollo normal en longitud y diámetro en comparación con las demás plántulas del lote.	Fig. II-10
Hendida desde el extremo	Raíz que muestra una hendidura longitudinal en el eje mayor desde su extremo.	Fig. II-10
Vítrea o Podrida	Presenta en su totalidad un aspecto vidrioso o traslúcido, o se presenta podrida debido a una infección causada por microorganismos.	Fig. II-11, II-14 y II-18
Geotropismo negativo	Raíz primaria con desarrollo anormal y geotropismo negativo.	Fig. II-12
Con constricción	Presenta uno o más estrechamientos en cualquier lugar de su longitud.	Fig. II-13
En banco	Raíz que no crece en forma recta.	Fig. II-15 y II-19
Retorcida	Raíz que gira sobre si misma formando un rulo.	Fig. II-16
Rota	Presenta fracturas.	Fig. II-17
IV-ANORMALIDADES DEL SISTEMA TALLO (EPICÓTILE)		
Ausente	Estructura faltante.	Fig. II-7
Bifurcado	Presencia de dos estructuras aéreas.	Fig. II-12 y II-20
Fototropismo negativo	Presenta un crecimiento anómalo hacia abajo, a favor de la fuerza de gravedad.	Fig. II-18

**V- ANORMALIDADES GENERALES (PLANTULA ENTERA)**

Blanca, amarilla o Ahilada	Presenta en su totalidad una coloración blanca o amarilla, pudiendo ser marcadamente más delgada que las demás Fig. II-21 plántulas del lote.
----------------------------	---

## PLANTULAS ANORMALES

							
<i>Figura II-6: Raíz atrofiada</i>	<i>Figura II-7: Ausencia de sistema tallo y raíz atrofiada</i>	<i>Figura II-8: Raíz mazuda (tipo stubby)</i>	<i>Figura II-9: Raíz ausente</i>	<i>Figura II-10: Raíz retrasada con hendidura longitudinal</i>	<i>Figura II-11: Raíz podrida</i>	<i>Figura II-12: Epicótilo bifurcado y raíz con geotropismo negativo</i>	<i>Figura II-13: Raíz con constricción e infección primaria</i>
							
<i>Figura II-14: Raíz vítrea</i>	<i>Figura II-15: Raíz en banco con constricción</i>	<i>Figura II-16: Raíz retorcida</i>	<i>Figura II-17: Raíz rota</i>	<i>Figura II-18: Fototropismo negativo y raíz podrida</i>	<i>Figura II-19: Raíz en banco</i>	<i>Figura II-20: Bifurcación por yema terminal dañada</i>	<i>Figura II-21: Plántula blanca o ahilada</i>

Los defectos que pueden considerarse aceptables en especies herbáceas anuales no son los mismos que en especies leñosas, ya que el sistema radical en estas últimas debe poseer una estructura fuerte porque será el sostén del árbol durante toda su vida útil. Por ejemplo, en especies como *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays* (50) o *Glycine max* (40), una plántula con la raíz primaria defectuosa o ausente puede clasificarse como “Normal débil” si posee un número suficiente de raíces secundarias normales. En cambio en *Poncirus*, este defecto no puede ser aceptado porque constituirá el pie o patrón de la futura planta cítrica, además de ser una especie que no posee gran número de raíces secundarias en los primeros estadios de la plántula, por lo que debe considerarse “Anormal” al igual que lo descrito en *Schinopsis balansae* (2).

En *P. trifoliata* el hipocótilo se descarta como factor de evaluación morfológica ya que el mismo no es visible debido a que presenta germinación hipogea al igual que en *J. nigra* (35), y en los géneros *Asparagus* y *Pisum* (50). Mientras que en otras especies con germinación epigea sí es relevante la evaluación del hipocótilo y de los cotiledones, como en *Heliantus annuus* (50), *Prosopis nigra* (20), *Lactuca sativa* (23) y *Glycine max*. Precisamente en *Glycine max* se consideran como normales incluso a las plántulas que poseen un sólo cotiledón (40).

En esta experiencia no se constataron casos de ausencia de uno o ambos cotiledones pero sí se observó un mayor número de cotiledones por semillas al tratarse de semillas poliembriónicas que pueden dar origen a más de una plántula. En este caso, las plántulas generadas por una misma semilla son evaluadas como una sola y son consideradas normales cuando al menos una de ella se pueda clasificar dentro de esta categoría (50).

No se han observado anomalías a nivel del tallo como yema terminal y tejidos circundantes con estructuras lesionadas o deterioradas, áreas con tejidos muertos delimitadas por áreas decoloradas y anomalías en hojas primarias, a diferencia de lo descrito por otros autores en plántulas de soja (40), *Pisum* o *Vicia* (50) donde sí se manifiestan con frecuencia este tipo de anomalías.

## **CAPITULO III**

**“Prueba de Viabilidad Topográfica por Tetrazolio  
en *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.”**

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un experimento preliminar para evaluar la concentración y tiempo de incubación de la prueba de viabilidad TZ propuestos por las distintas asociaciones de analistas de semillas donde la concentración recomendada tanto para la Familia *Rutáceas* como para el género *Poncirus* es del 1%, por un periodo de incubación de entre 18 y 24 h respectivamente, a una temperatura de 33 °C y en total oscuridad (10; 48).

En base a los resultados obtenidos en dicho experimento, se definieron los tratamientos para ajustar la técnica.

Se evaluaron semillas de un mismo lote. Se utilizó un Diseño Factorial 2 x 2 x 2 con 3 factores y 2 niveles cada uno. Pelado de semillas (peladas químicamente y sin pelar), Concentración de TZ (0,2 y 0,5%) y Tiempos de incubación (3 y 5 h), conformándose así 8 tratamientos:

T1: Pelado químico, 0,2%, 3 h

T2: Pelado químico, 0,5%, 3 h

T3: Pelado químico, 0,2%, 5 h

T4: Pelado químico, 0,5%, 5 h

T5: Sin pelar, 0,2%, 3 h

T6: Sin pelar, 0,5%, 3 h

T7: Sin pelar, 0,2%, 5 h

T8: Sin pelar, 0,5%, 5 h

Se realizaron 2 repeticiones de 50 semillas cada una por tratamiento.

Las semillas fueron preacondicionadas según las indicaciones de AOSA (10) para la familia Rutáceas. Primeramente se remojaron en agua a 21°C durante 18 h, realizando luego un corte a través de la bisectriz del eje embrionario, y dejando suficiente tegumento o zona distal para mantener juntas las dos mitades.

Las semillas del tratamiento de escarificado, se acondicionaron antes de efectuarles el pelado químico. El tratamiento de pelado químico utilizado fue aquel que arrojó los mejores resultados en el

## Capítulo I (T3,1).

Las semillas de cada tratamiento se colocaron en frascos de 250 cm<sup>3</sup>, se las cubrió con la solución de tetrazolio, se taparon con film y se llevaron a baño termostático a 33°C y en oscuridad para su incubación.

Una vez transcurridos el tiempo de incubación de cada tratamiento, se retiraron los recipientes del baño, se eliminó la solución y se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada. Luego se dispusieron sumergidas en agua dentro frascos con la correspondiente identificación de cada tratamiento. Se realizó la observación visual con lupa para determinar la viabilidad mediante la interpretación de las tinciones de las semillas (Fig. III-1), y se tomaron las imágenes correspondientes con cámara digital IAI CV-S 3200 JAPAN MACRO NAVITAR 0.7 – 4.0; Lentilla 0.5 – 0.2 X (INTA Oliveros).



*Figura III-1: Equipamiento para la determinación de viabilidad mediante la prueba topográfica de TZ en laboratorio de semillas del INTA Oliveros.*

Las semillas fueron consideradas viables o no viables a partir de la utilización de los patrones que se establecieron teniendo en cuenta, lo determinado por el Manual AOSA (10) para la familia *Rutáceas* (géneros *Citrus*, *Dictamnus*, *Ruta*), y otras especificaciones establecidas en base a las hojas de trabajo para la Prueba Topográfica por Tetrazolio confeccionadas para la familia *Asteraceas* por el Laboratorio de semillas de la EEA INTA Oliveros. Con los datos obtenidos de cada tratamiento se calculó el porcentaje de viabilidad.

Los datos se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat (27), realizándose el Análisis

de la Variancia y la Comparación de las medias de los tratamientos a través del test de Tukey con un nivel de significación de 0,05. A partir de los resultados de la evaluación, se determinó el tratamiento que define la tinción más adecuada para cuantificar la viabilidad de las semillas de *Poncirus trifoliata*.

Se elaboraron patrones topográficos de viabilidad en esquemas e imágenes fotográficas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayos preliminares de la prueba bioquímica de viabilidad por Tetrazolio

La exposición de las semillas de *P. trifoliata* a una concentración del 1% de la sal de tetrazolio durante 18 y 24 h fue excesiva, ocasionando tinciones oscuras y opacas, que dificultaron realizar una correcta interpretación de la viabilidad de los tejidos (Fig. III-2). Si bien esta concentración es la recomendada por la AOSA (10) e ISTA (48) para la familia *Rutáceas*, provoca una coloración indeseable al igual que lo observado en semillas de nogal negro (34).



Figura III-2: Efecto de la incubación en sal de TZ a una concentración del 1% por 18 h (a) y 24 h (b) en semillas de *P. trifoliata* según lo recomendado por los manuales AOSA (10) e ISTA (48).

### Determinación de la concentración de tetrazolio y tiempo de exposición

Se observó la existencia de diferencias significativas para los factores concentración ( $F=5,71$ ;  $p < 0,05$ ) y tiempo de exposición al tetrazolio ( $F=14,63$ ;  $p < 0,005$ ). También hubo una interacción significativa entre ambas variables ( $F=9,66$ ;  $p < 0,01$ ). Esto se explica debido a que en los tratamientos con 0,5% de concentración y 3 o 5 h de incubación, las semillas proporcionaron valores similares de



viabilidad, tanto en semillas peladas como en las sin pelar, mientras que cuando se bajó la concentración al 0,2 %, y se aumentó el tiempo de incubación a 5 h, se alcanzó un valor superior de viabilidad al obtenidos en los otros tratamientos (Fig. III-3).

De todos los tratamientos evaluados, seis de ellos proporcionaron resultados satisfactorios, con las mismas posibilidades de ser utilizados (Fig. III-4). No obstante, tal como lo plantean otros investigadores, la selección del tratamiento más conveniente debe priorizar la combinación más efectiva en términos de concentración de principio activo y tiempo de duración de la prueba dentro del laboratorio. En base a este criterio el tratamiento más eficiente fue el que utilizó semillas sin pelar, 0,2 % de concentración de tetrazolio y 5 h de incubación (T7).

También se consideró la importancia de preservar la salud ambiental disminuyendo la producción de desechos tóxicos y reduciendo los costos del análisis (25; 34).

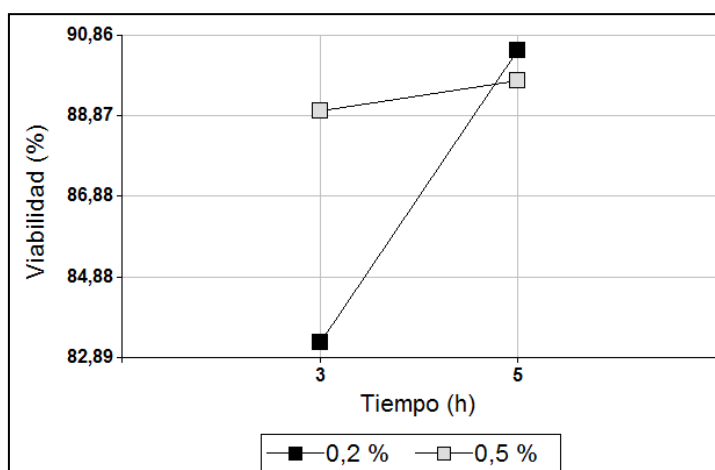


Figura III-3: Interacción entre el tiempo de incubación y la concentración de sal de TZ para el % de viabilidad

Los resultados indicaron que no es necesario realizar el pelado químico durante el pre-acondicionamiento de las semillas ( $F=0.51$ ;  $p<0.49$ ), lo que se atribuye a la característica de semillas recalcitrantes. Estas semillas deben almacenarse con elevados contenidos de humedad interna, lo cual favorece las tinciones sin necesidad de recurrir a tratamientos que aceleren la imbibición (14; 52).

Usberti y Felipe (80) utilizaron en *Citrus limonia* una combinación del 0,5% y 3 h, precisamente uno de los seis tratamientos que fueron considerados como satisfactorios en la presente investigación. No obstante ello, el tratamiento recomendado (T7) permitió obtener coloraciones adecuadas, brillantes, con tejidos turgentes (Fig. III-5g), utilizando una menor concentración de TZ. Además, las

imágenes topográficas obtenidas fueron muy nítidas y permitieron establecer con seguridad el estado fisiológico de los tejidos y estructuras de las semillas, evitando problemas de contaminación y deterioro de las muestras a evaluar (13; 25; 31; 34).

Los tratamientos que utilizaron la menor concentración de tetrazolio (0,2%) y el menor tiempo de exposición (3 h) no fueron recomendables, tanto en semillas peladas químicamente como en las semillas sin pelar (Fig. III-4). Las tinciones obtenidas presentaron coloraciones rosadas pálidas que pueden ocasionar una interpretación equívoca de la viabilidad por parte del técnico-analista, pudiendo subestimar la viabilidad del lote de semillas (Fig. III-5a y III-5e).

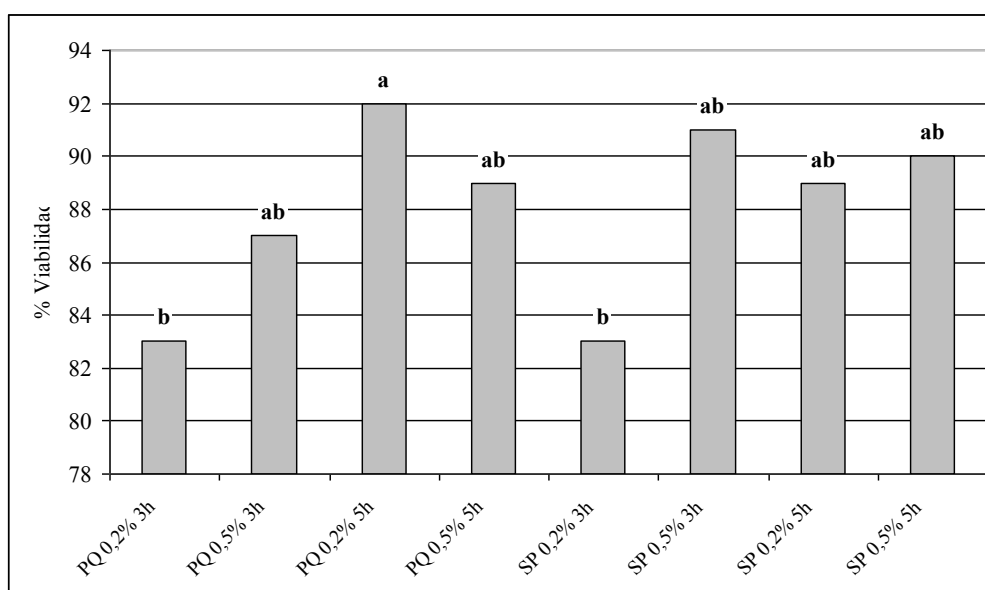


Figura III-4: Porcentaje de Viabilidad obtenido en los diferentes tratamientos según la interpretación de las distintas tinciones logradas. PQ: pelado químico; SP: sin pelar. Los valores siguiendo la abreviación PQ y SP indican la concentración de la sal de TZ y el tiempo de incubación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según ANOVA y Comparación de medias a través del test de Tukey con un nivel de significación  $p < 0.05$ .

El porcentaje de germinación que presentaron las semillas sin pelar utilizadas para este ensayo fue de 89%. Si bien la prueba de viabilidad por TZ es independiente de la prueba de germinación estándar (3; 12; 34; 74), los resultados más promisorios de la prueba de viabilidad coinciden con el porcentaje de germinación.

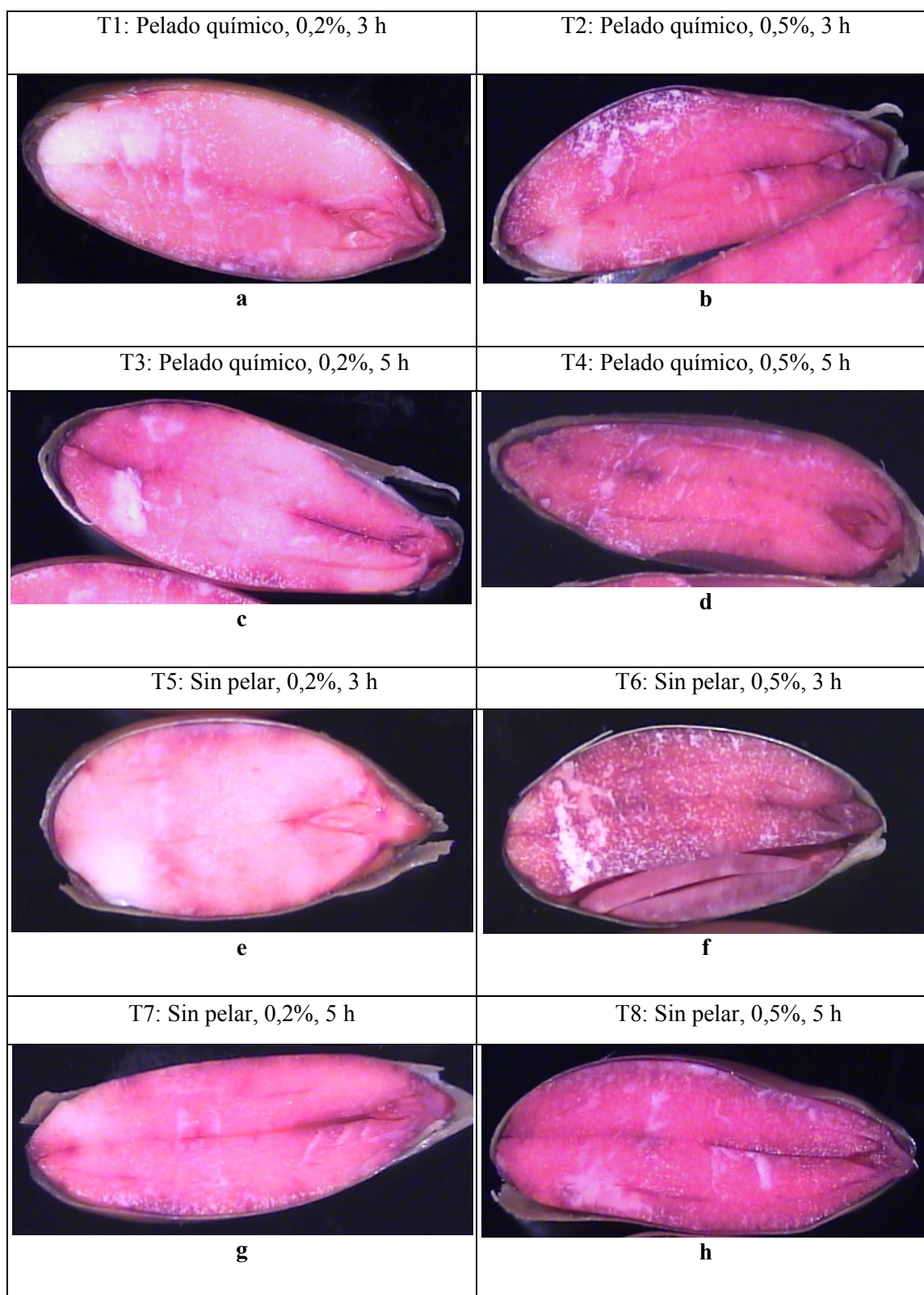


Figura III-5. Imágenes de los tratamientos evaluados en semillas peladas químicamente y sin pelar, en función de la concentración de la sal de TZ y tiempo de incubación

### **Patrones de tinción de semillas viables y no viables en *P. trifoliata***

Se confeccionaron planillas descriptivas con los diferentes patrones de viabilidad identificados en esta especie mediante esquemas (Fig. III-6) e imágenes (Fig. III-7). Al igual que lo propuesto por AOSA (10) en los patrones de semillas viables y no viables para los géneros *Citrus*, *Dictamnus* y *Ruta* dentro de la familia *Rutáceas*, fueron consideradas como semillas viables de *Poncirus trifoliata* aquellas que tiñeron sus estructuras embrionarias completas, uniformemente y de color rosado, con buena turgencia de tejidos y aquellas que presentaron menos de la mitad de los cotiledones sin teñir (Figs. III-6-1 y III-6-2). Otros investigadores han descrito patrones de semillas, viables y no viables similares, en diferentes especies, como por ejemplo en semillas de *Aspidosperma* (3).

El margen de tolerancia en la proporción de los cotiledones sin tinción para considerar a una semilla viable varía según las especies, por ejemplo en *Juglans nigra* y *Helianthus annuus* se considera semilla no viable cuando el área sin tinción supera 1/3 de los cotiledones (12; 34), mientras que en este caso se tomó el 50%.

A diferencia de algunos patrones descritos para especies de la familia *Poaceas* como *Bromus auleticus* (74), *Zea mays* y *Sorghum spp.* (12), en los que se considera aceptable la falta de tinción en ciertas áreas de la radícula, para el género *Poncirus* no se consideró aceptable este criterio para considerar viable a una semilla (Figs. III-6-4 y III-6-5). Esto se debe a que las gramíneas poseen tejidos meristemáticos en su embrión, lo que les permite originar raíces secundarias, por lo tanto, aunque se pierda la raíz primaria, esas semillas pueden dar origen a una plántula normal.

**Figura III-6: PRUEBA TOPOGRÁFICA DE TETRAZOLIO EN *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. EN ESQUEMAS**

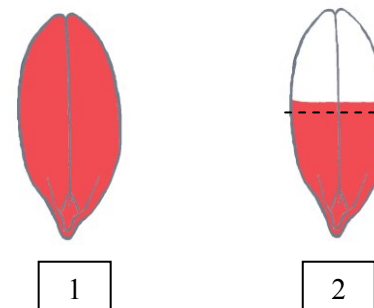
**PATRONES - NIVELES DE VIABILIDAD**

**SEMILLAS VIABLES (+)**

- 1- Estructuras embrionarias completas y teñidas de color rosado/rojo.
- 2- Menos del 1/2 de los cotiledones sin teñir en la zona distal al eje embrionario

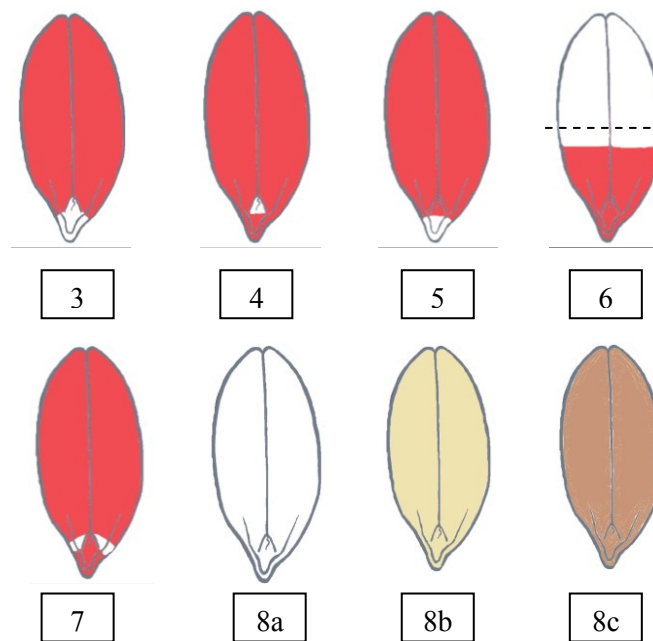
Uniforme distribución de la coloración.

Buena turgencia de tejidos.



**SEMILLAS NO VIABLES (-)**

- 3- Estructuras embrionarias completamente sin teñir, deterioradas o perdidas.
- 4- Plúmula parcial o completamente sin teñir, deteriorada o perdida
- 5- Radícula parcial o completamente sin teñir, deteriorada o perdida
- 6- Área mayor de un 50% sin teñir; deterioradas o perdidas en ambos cotiledones
- 7- Áreas sin teñir, deterioradas o perdidas en la zona de la unión del eje embrionario con los cotiledones
- 8- Semillas completa sin teñir (a), de color amarillo crema (b), y marrón (c) deteriorada o sin turgencia.



## Figura III-7: PRUEBA TOPOGRÁFICA DE TETRAZOLIO EN *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. EN IMÁGENES

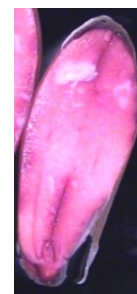
### PATRONES - NIVELES DE VIABILIDAD

#### SEMILLAS VIABLES (+)

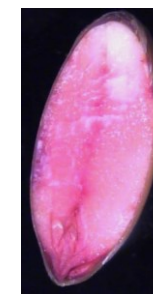
- 1- Estructuras embrionarias completas y teñidas de color rosado/rojo.
- 2- Menos del 1/2 de los cotiledones sin teñir en la zona distal al eje embrionario

Uniforme distribución de la coloración.

Buena turgencia de tejidos.



1



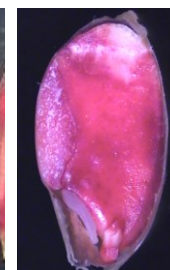
2

#### SEMILLAS NO VIABLES (-)

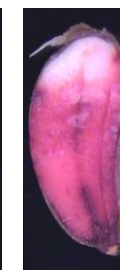
- 3- Estructuras embrionarias completamente sin teñir, deterioradas o perdidas.
- 4- Plúmula parcial o completamente sin teñir, deteriorada o perdida
- 5- Radícula parcial o completamente sin teñir, deteriorada o perdida
- 6- Área mayor de un 50% sin teñir; deterioradas o perdidas en ambos cotiledones
- 7- Áreas sin teñir, deterioradas o perdidas en la zona de la unión del eje embrionario con los cotiledones
- 8- Semillas completa sin teñir (a), de color amarillo crema (b), y marrón (c) deteriorada o sin turgencia.



3



4



5



5 - 6



7



8a



8b



8c

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

El tratamiento de escarificado químico en el que solo se utilizó hipoclorito de sodio fue el método más efectivo para eliminar la testa de las semillas, favoreciendo una mayor y más rápida imbibición respecto a las semillas enteras, además de mejorar los parámetros de vigor. Este tratamiento constituye un método sencillo, práctico y fehaciente para ser utilizado por los productores viveristas y por los analistas de semillas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. El test de vigor de conductividad eléctrica fue de gran utilidad para determinar que el tratamiento de pelado químico no afectó la integridad de las membranas de las semillas, y en consecuencia su vigor.

Se describieron patrones de plántulas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. en plántulas normales vigorosas, plántulas normales débiles, y plántulas anormales, que serán de gran utilidad en el momento de expresar los resultados en los análisis de calidad.

Se observaron con mayor frecuencia anomalías del sistema radical, las mismas fueron: raíz primaria retorcida, atrofiada, mazuda (tipo *stubby*) y raíz primaria ausente.

Se determinó la metodología más adecuada para realizar, en forma precisa y eficiente, la prueba de TZ para *Poncirus trifoliata*. Se recomienda utilizar una concentración del 0,2% de la sal TZ, 5 h de incubación y semillas sin pelar de modo de optimizar los recursos implicados. Además, se determinaron los patrones topográficos de tinción más comunes, resultando 2 para semillas viables y 8 para semillas no viables.

En futuros trabajos de investigación se implementarán los test de estrés de semillas como por ejemplo el cold test, para la determinación de calidad fisiológica.

También se avanzará sobre la implementación del test de conductividad eléctrica en esta especie con el Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S que permite mediante un software calcular y estimar los parámetros de calidad fisiológica como por ejemplo: Poder germinativo, vigor, etc. Para ello es necesario obtener en primera instancia un valor de corte para la especie que se logrará mediante la evaluación de lotes de semillas de diferentes orígenes cuya calidad varíe y sea verificada mediante los otros test de vigor y correlacionadas con los valores de CE.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Alves de Carvalho, S. y Carvalho Silva, L. F. 2013. Monitoring the Viability of Citrus Rootstocks Seeds Stored Under Refrigeration. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, 35(1): 238-245.
2. Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas A. y Pioli R. 2005. Observations on seed quality of *Schinopsis balansae* Engl., a tree species endemic to South America. *Seed Technology* 27: 49–58.
3. Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A. y Pioli, R. 2006. Calidad de semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. *Quebracho* 13: 26-35.
4. Anderson, C. 1996a. Origen, Historia y Distribución. *In: Fabiani, A.; Mika, R.; Larocca, L. y Anderson, C. (Eds.). Manual para Productores de naranja y mandarina de la región del Río Uruguay. Diversificación Productiva, Manual Serie A N° 2. EEA INTA Concordia, Entre Ríos.*
5. Anderson, C. 1996b. Portainjertos. *In: Fabiani, A.; Mika, R.; Larocca, L. y Anderson, C. (Eds.). Manual para Productores de naranja y mandarina de la región del Río Uruguay. Diversificación Productiva, Manual Serie A N° 2. EEA INTA Concordia, Entre Ríos.*
6. Anderson P.D.; Marzotta C.H.; Rocha D.D.; Guiria R., Cainelli J.C. y Craviotto R.M. 1995. Desarrollo de un analizador automático de semillas. I Congreso Nacional de Soja. Segunda Reunión Nacional de Oleaginosos, Pergamino, Argentina. Capítulo V, Poscosecha, Comercialización e Industria, pp. 55-60.
7. AOSA (Association of Official Seed Analysts). 1978. Rules for testing seeds. *J. Seed Technol.* 3(3): 1-126.
8. AOSA (Association of Official Seed Analysts). 1992. Seedling Evaluation Handbook. Contribution N° 35. 101 p.
9. AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2002. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution N° 32. Revised 2002. 105 p.
10. AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2010. Tetrazolium Testing Handbook.
11. Arango, E.; Capote, M.; Morera, S. y Clemente, J. 2010. “Viveros protegidos de cítricos. Manejo Técnico” Taller Regional sobre Viveros de Cítricos. La Habana, Cuba.

12. Arango, M. 2017. Análisis de semillas, Viabilidad. 75° Curso Taller Viabilidad y Vigor por Tetrazolio en Semillas de Maíz, Sorgo, Girasol y Arveja. EEA INTA Oliveros. Santa Fe. Argentina.
13. Arango, M.R. y Craviotto, R.M. 2002. Calidad de Semillas de Soja. Revista IDIA XXI 3:24-28.
14. Berjak, P.; Farrant, J. M.; Mycock, D. J. y Pammenter, N. W. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. *Seed Sci. Technol.* 18: 297-310.
15. Bewley, J.D. y Black, M. 1994. *Seed physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Press. 445p.
16. Bonner, F.T. 1984. Testing for seed quality southern oaks. Res. Note SO-306. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 6p.
17. Boesewinkel, F. D. 1978. Development of ovule and testa in *Rutaceae* iIII. Some representatives of the *Aurantioideae*. *Acta Botánica Neerlandica*. 27(5/6): 341-354.
18. Bonner, F. T.; McLemore, B. F. y Barnett, J. P. 1974. Presowing treatment of seed to speed germination. *In: Seeds of Woody Plants in the United States*. (Agriculture Handbook N° 450. Schopmeyer C.S Technical Coordinator. Forest Service, United States Department of Agriculture (USDA), Washington, D.C. p.126-135.
19. Cameron, J. W. y Frost, H. B. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. *In: Reuther, W.; Batchelor, L. D. y Webber, H. J. (Ed.). The Citrus Industry*. Berkeley: University of California Press. 2: 325-370.
20. Carnevale, N. J.; Alzugaray, C. y López, D. 2004. Efecto de la salinidad sobre el establecimiento de plántulas de dos especies arbóreas dominantes en un quebrachal de *Schinopsis balansae* ENGL. (Argentina). *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR*. 6: 43-49.
21. Calvalho, J.A. 2001. Conservação de sementes de citros. 140 f. Tese de Doutorado (Agronomia, Área de Concentração: Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.
22. Carvalho, J. A.; Villea Resende Von Pinho, E.; Oliveira, J. A.; Mendes Guimarães, R. y Bonome,

- L. T. 2002. Testes Rápidos para Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de *Citromelo swingle*. Revista Brasileira de Sementes. 24(1): 263-270.
23. Contreras, S. y Barros, M. 2005. Pruebas de Vigor en Semillas de Lechuga y su Correlación con Emergencia. Cien. Inv. Agr. 32(1): 3-11.
24. Craviotto, R.M. 1998. SAD 9000-S Analizador Automático de Semillas. Manual de Procedimientos Biológicos. Edición Convenio de Asistencia Técnica INTA Consultar, Argentina. 22 pp.
25. Craviotto, R. M.; Arango Perearnau, M. y Gallo, C. 2011. Novedades de la prueba de viabilidad por tetrazolio en soja. Para mejorar la producción 46. INTA EEA Oliveros. p. 99-104
26. Delouche, J. C. y Baskin, C. C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. Seed Science & Technology, 1(2): 427-52.
27. Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
28. Edmond, J. B. y Drapala, W. J. 1958. The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceeding of the American Society for Horticultural Science. 71(7): 28-34.
29. Ellis, R. H. y Roberts, E. H. 1980a. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Botany 45: 13-30.
30. Ellis, R. H. y Roberts, E. H. 1980b. The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.). Ann. Botany 45: 31-37.
31. Enescu, V. 1991. The tetrazolium test of viability. In: Gordon, A.G.; Gosling, P.G. y Wang, B.S.P. (Eds) Tree and shrub seed handbook. ISTA, Zurich, Switzerland. 9: 1-7.
32. FAO, 1991. Seed storage. 7, 195-237 In: A guide to forest seed handling. Willan, R.L. (Ed.) FAO Forestry paper 20/2, Rome.
33. Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. y Berjak, P. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. Seed Science Research. 3: 1-13.

34. Flores, P. C.; Poggi, D.; Garcia, S. M. y Gariglio, N. F. 2011 Topographic tetrazolium testing of black walnut (*Juglans nigra* L.) seeds. *Seed Science and Technology* 39: 230-235.
35. Flores, P. 2013. "Factores que afectan la calidad fisiológica y la capacidad de almacenamiento de las semillas de nogal negro *Juglans nigra*". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Rosario. Argentina
36. Flores, P. C; Poggi D; García, S. M; Catraro, M. y Gariglio, N. F. 2013. The pulp of *Juglans nigra* fruit affects seed germination and root growth. *Seed Technology*, ISSN 1096-0724. 35(1): 41-53.
37. Flores, P.; Poggi, D.; García, S. M.; Catraro, M. y Gariglio, N. 2017. Effects of Pre-Stratification Storage Conditions on Black Walnut Seed Post-Stratification Germination Capacity. *International Journal of Fruit Science*. 17(1): 29-40.
38. Frost, H. B.y Soost, R. K. 1968. Seed reproduction; development of gametes and embryos. In: Reuther, W.; Batchelor, L. D.; Webber, H.J. (Ed.). *The citrus industry*. Berkeley: University of California Press. 2.:290-324
39. Gallo, C. 2008. Calidad Fisiológica y Efecto de la Presencia de Semillas Verdes de Soja (*Glycine max* (L.) Merr) en Lotes Destinados a Semente. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. 119 p.
40. Gallo, C.; Craviotto, R. y Arango, M. 2013. Resultados confiables de germinación: la importancia de la evaluación de las plántulas de soja. *Análisis de semillas*. 27: 43-49.
41. García, A. y Lasa J. M. 1991. Ensayos de vigor de nascencia: Revisión bibliográfica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Estación Experimental de Aula DEI, Zaragoza, España, pp. 64
42. Gentil, D.F. 2001. Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? *Bragantia* 60(3): 149-154.
43. Grasso, R.; Giambiasi, M.; Malaquina, F. y Rivas, F. 2015. Escarificación Química de Semillas de *P. trifoliata*. Cartilla N° 62. Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. INIA Salto Grande, Uruguay. [On Line] En:

<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5086/1/CARTILLA-62-Citrus.pdf>. Acceso:  
10/03/2016

44. Hampton, J.G. 2001. What is seed quality?. *Revista Internacional de la Semilla*. 30: 1-10.
45. Hampton, J.G. y TeKrony, D.M. 1995. *Handbook of vigour test methods*. 3ed. 117p. Zurich, Suiza. International Seed Testing Association.
46. Holmes, G. D. y Buszewicz, G. 1958. The storage of seed of temperate forest tree species. *For Abstr*, 19: 313-322.
47. ISTA (International Seed Testing Association). 1991a. Germination of dormant tree and shrub seeds. Zurich. Chapter 6. p. 1-16. *In*: Gordon, A.G.; Gosling, P.G.; Wang, B.S.P. (eds) *Tree and shrub seed handbook*. ISTA, Zurich, Switzerland.
48. ISTA (International Seed Testing Association). 1991b. The tetrazolium test of viability. Zurich. Chapter 9. p. 1-19. *In*: Gordon, A.G.; Gosling, P.G.; Wang, B.S.P. (eds) *Tree and shrub seed handbook*. ISTA, Zurich, Switzerland.
49. ISTA (International Seed Testing Association). 1995. *Handbook of vigor test methods*. 3 ed. Zurich. 117 p.
50. ISTA (International Seed Testing Association). 2003. *International Rules for Seed Testing*. Zürich, 500 pp.
51. Kainer, K.; Duryeaa, M.; Malavasi, M.; Rodrigues da Silva, E. y Harrison, J. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecol. Manag.* 116: 207-217.
52. Kermode, A. R. y Finch-Savage, W. E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In*: Black, M.; Pritchard, H. W. (eds.). *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing. 149-184.
53. Khan, M.; Alam, M.; Abbas, M. y Iqbal, M. 2003. Studies on Seed Desiccation Tolerance in four Citrus Species. Institute of Horticultural Sciences, University of Agriculture, Faisalabad. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 40(1-2): 55-62.
54. Kirck-Othmer. 1996. *Enciclopedia of Chemical Technology; Volumen 2, Hexanes to Ion*

- Exchange; Interscience Publishers; Jhon Wiley & Sons, Inc.; New York, U.S.A.
55. Koller, O.L.; Stuker, H. y Verona, L.F. 1993. Efeito da umidade, temperatura de estocagem e duração da estocagem sobre a germinação de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de cítrus. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 15(1): 27-33.
  56. Lakon, G. 1942. Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit de Getreidefruchte durch Tetrazolium salze. - Ber. Deutsch. Bot. Ges., 60: 299-305.
  57. Lakon, G. y Bulat, H. 1956. The stablishment of viability of deciduous tree seeds by the topographical tetrazolium method. IV. The *Betulaceae* and *Juglandaceae*) Saatgutwirtsch, 8: 81-84. Handbook on Tetrazolium Testing. ISTA 1985
  58. Leprince, O.; Hendry G. A. y McKersie, B. D. 1993. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. Seed Sci. Res. 3: 231-246.
  59. Martins, L.; Silva, W.R. y Lago, A.A. 2007. Conservação de sementes de tangerina ‘cleópatra’: teor de água e temperatura do ambiente. Revista Brasileira de Sementes, Londrina, 29(1):178-185.
  60. Moore, R. P. 1985. Handbook on tetrazolium testing. International Seed Testing Association, Zurich. pp. 99
  61. Moreno, F.; Plaza, G. y Magnitskiy, S. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de las semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). Agronomía Colombiana 24(2):.290-295.
  62. Molina, N.; Beltrán, V. y Carcaño, F. 2013 “Costos de producción de viveros cítricos bajo cubierta” INTA Bella Vista – Corrientes. Hoja de divulgación N° 37.
  63. Murcia, M.; Del Longo, O.; Argüello, J.; Pérez, M. y Peretti, A. 2006. Evaluación del crecimiento de plántulas de cultivares de girasol con diferentes proporciones de ácidos oleico/linoleico en respuesta a la baja temperatura. Revista Brasileira de Sementes. Pelotas. Brasil. 28(2): 95-101.
  64. Nauer, E.M. y Carson, T.L. 1985. Packaging citrus seed for long-term storage. California Citrograph, Los Angeles, 70(10): 229-230.
  65. Nieves, N.; Martínez, M.; Blanco, M.; González, J.; Borroto, E.; Lorenzo, J. y Portilla, Y. 1998. Changes in soluble proteins and polyamines during citrus seed germination. Fruit. 53(1): 27–33.

66. Oliveira, R.P. de; Scivittaro, W.B. y Radmann, E.B.. 2003. Procedimentos para o armazenamento de sementes de *Poncirus trifoliata*(L.) Raf. Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal, 25: 461-463.
67. Oliveira, R.P. de; Scivittaro, W.B y Radmann, E.B. 2006. Escarificação química da semente para favorecer a emergência e o crescimento do porta-enxerto Trifoliata. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 41(9): 1429-1433
68. Oliveira, R.P. de. y Scivittaro, W.B. 2007. Formação do porta-enxerto Trifoliata: época de semeadura e tegumento na emergência de plântulas. Ciência Rural. 37(1): 281-283.
69. Palacios, J. 2005. Citricultura. Cap 6. Portainjertos para cítricos. Editorial Alfa Beta S.A.
70. Patil, V. N. y M. Dadlani, 2009. "Tetrazolium test for seed viability and vigour" in Handbook of Seed Testing, pp. 209–241.
71. Pedroso de Oliveira, R.; Ueno, B.; Bueno Scivittaro, W.; Carpena Carvalho, F.; Belmonte Petry, H. y Batalha Moreno, M. 2016. Produção de sementes de porta-enxertos de citros. Documentos / Embrapa Clima Temperado. ISSN 1516-8840; 417 Pelotas. pp. 32.
72. Puelsen, K. 1993. Seed Quality: Concept, measurement and methods to increase quality. Humlebaek, Denmark. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-14. pp. 14.
73. Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology. 1: 499-514.
74. Ruiz, M.Á. 2009. El Análisis de Tetrazolio en el Control de Calidad de las Semillas. Publicación Técnica N° 77. EEA INTA Anguil
75. Sempionato, O. R.; Giroto, L. F. y Stuchi, E. S. Produção de mudas sadias. In: Donadio, L. C.; Moreira, C. S. (Ed.). Clorose variegada dos citros. Bebedouro: EECB/Fundecitrus, 1997. p. 75-92.
76. Silva, J. B.; Nakagawa, J. 1995. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. Informativo ABRATES, 5(1): 62-73.
77. Spiegel-Roy, P. y Goldschimindt, E. E. 1996. Biology of Citrus. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 230.
78. Teixeira, P. de T. L.; Schäfer, G.; Dutra de Souza, P. y Todeschini, A. 2009 A Escarificação

- química e o desenvolvimento inicial de porta-enxertos cítricos. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal - SP, 31(3): 865-871.
79. Toledo, F.F. y Marcos-Filho, M. 1977. Manual das sementes, tecnologia da produção. São Paulo: Agronomia Ceres. pp. 224.
80. Usberti, R. y Felipe, G. 1980. Viabilidade de sementes de *Citrus limonia* Osb. Com baxo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília, 15(4): 393-397,
81. Vieira, R.D. y Carvalho, N.M. 1994. Teste de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP. pp.164.
82. Wesley-Smith, J.; Walters, C., Berjak, P. y Pammenter N.W. 2004. The influence of water content, cooling and warming rate upon survival of embryonic axes of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Cryo Letters 25: 129-138.
83. Zabala, G. y Guardiola, J.G. 1974 Influencia de las cubiertas seminales en la germinación de semillas de *Citrange troyer*. Cátedra de Fisiología vegetal. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Valencia. INIA. Centro de levante. Burjasot. An. Aula Dei. 12(3/4): 188-201.



## ANEXO

### **Normativa Fitosanitaria para la producción de plantas cítricas en Argentina**

El sector viverista en Argentina es regulado por la ley 20.247 de Semillas y Creaciones Fitogénicas y las Resoluciones de la Secretaría de Agricultura 149/1998, 811/2004 y 312/2007. La finalidad de estas normas es fijar un sistema de certificación obligatoria.

La Resolución Senasa 203/12, en su artículo 1º, crea el Programa Nacional de Sanidad de Material de Propagación, Micropropagación y/o Multiplicación Vegetal (PNSMP) dependiente de la Dirección Nacional de Protección Vegetal. La Disp. DNPV N° 4 de 2013 reglamenta la implementación del PNSMP estableciendo requisitos generales y específicos para la producción y comercialización de plantas de vivero. Establece la creación del Registro Nacional Fitosanitario de Operadores de Material de propagación, micropropagación y/o multiplicación vegetal (RENFO) y los requisitos para su comercialización. Además regula las funciones de los Responsables Técnicos de viveros. Esta disposición tiene un apartado especial para el Material de Propagación de Cítricos.

Resolución ex SAGPyA 149/98 y su modificatoria, Resolución ex SAGPyA 811/04. Normas para la producción, comercialización e introducción de plantas cítricas de vivero y sus partes.

Resolución Senasa N° 458/2005: Establece como de denuncia obligatoria la presencia en cítricos de sintomatología sospechosa de Huanglongbing (HLB).

Resolución Ex SAGPyA N° 447/2009: Prohíbe la producción, plantación, comercialización y transporte de mirto o jazmín árabe (*Murraya Paniculata*) en todo el territorio nacional.

Resolución Senasa 959/2009 y su modificatoria, Resolución Senasa 107/2014. Emergencia fitosanitaria de HLB.

Resolución Senasa 930/2009. Medidas fitosanitarias en relación con el material de propagación de cítricos. Todo material de propagación de cítricos desde el almácigo, incluyendo la planta terminada, deberá producirse bajo cubierta, en instalaciones que cuenten con cobertura impermeable al agua y todas las aberturas protegidas con tela de malla anti insectos; doble puerta de acceso con antecámara entre ellas; equipamiento de desinfección de vestimenta, manos y utensilios.

Resolución ex SAGPyA N° 517/09 de la crea el Programa Nacional de prevención de HLB (PNPHLB) que es luego ratificado por la Ley 26888. El mismo tiene la finalidad de proteger la citricultura nacional de esta enfermedad, la cual es considerada como la más grave para los cítricos en el mundo y que aún no se ha establecido en la Argentina. Es coordinado por el SENASA y a través de la Unidad Técnica Interinstitucional (UTI), facilita el ámbito para consensuar las principales líneas de trabajo del programa junto con otros organismos públicos y con representantes de la cadena citrícola, el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Nacional de Semillas (INASE) y asociaciones citrícolas.

Resolución Senasa N° 165/2013. Procedimiento para el movimiento de fruta fresca y material de propagación vegetal entre provincias con distinta condición fitosanitaria respecto del huanglongbing: Contiene un listado de especies hospederas de HLB y/o *Diaphorina citri*.

Resolución INASE 82/13: Establece autorizar la venta, cesión, uso propio o cualquier otro destino de materiales de propagación de especies cítricas solo cuando el SENASA se expida favorablemente sobre el riesgo sanitario de dichos materiales, con referencia al huanglongbing (HLB). Por tal motivo, inspectores del SENASA y del INASE realizan inspecciones en conjunto a fin de visualizar el estado sanitario del material vegetal, así como también verificar el cumplimiento de la normativa vigente para la producción de material cítrico.

Resolución Senasa N° 165/2013: Establece las diferentes áreas según su condición fitosanitaria respecto al HLB y la *Diaphorina citri* en la República Argentina, regulando el movimiento de fruta comercial y material de propagación vegetal entre áreas con distinta condición fitosanitaria.

Resolución 336/14: Reglamentación del Programa Nacional de Prevención de HLB (huanglongbing) creado por la ley n° 26.888. Dentro del componente de material de propagación establece el fortalecimiento los controles en la producción, comercialización y transporte de materiales de propagación. Toda planta o yema de especie cítrica que se utilice para la plantación, injerto, cesión, venta o cualquier otro destino será fiscalizada.