



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
*FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE
GEMBOUX (BELGIQUE)*

GERMINACIÓN, VIGOR, VIABILIDAD, CALIDAD Y MEJORA DE
SEMILLAS DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

Trabajo Fin de Carrera

Para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo (UPM)
En vue de l'obtention du titre de Bioingénieur (FUSAGX, Bélgica)

AUTOR:

Gilles Adam

TUTORES:

Monique Bodson

José M. Durán Altisent

Madrid, Julio de 2007

Toda reproducción del presente documento por cualquier procedimiento, solo puede realizarse con la autorización del autor y de las autoridades académicas de la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique)* y de la Universidad Politécnica de Madrid.



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
*FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE
GEMBOUX (BELGIQUE)*

GERMINACIÓN, VIGOR, VIABILIDAD, CALIDAD Y MEJORA DE
SEMILLAS DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

Trabajo Fin de Carrera

Para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo (UPM)
En vue de l'obtention du titre de Bioingénieur (FUSAGX, Belgique)

AUTOR:
Gilles Adam

TUTORES:
José M. Durán Altisent
Monique Bodson

Madrid, Julio de 2007

ABREVIATURAS

- μ Media general del ensayo.
- a.C. Antes de Cristo
- ABA Ácido abscísico.
- a_i Semillas germinadas de la muestra i .
- A_i Efecto debido al factor principal A .
- ANDEVA Análisis de varianza
- AOSA *Association of Official Seed Analysts* (Asociación Oficial de Analistas de Semillas).
- ARN Ácido ribonucleico.
- CATES Centro Acreditado para Tecnología de Semillas.
- CE Comisión Europea.
- CITA Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón
- ϵ_{ij} Error experimental.
- CM Cuadrado medio
- CM_e Cuadrado medio del error
- C_u Coeficiente de Uniformidad
- EEM Error estándar de la media
- E_i Ensayo i .
- F Prueba F de Fisher
- FUSAGX Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- FV Fuente de variación
- GA_3 Ácido giberélico
- GL Grados de libertad
- INSPV Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero.
- ISTA *International Seed Testing Association* (Asociación Internacional de Analistas de Semillas).
- MAPA Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- MDS Menor diferencia significativa.
- n Número de observaciones.

- p Probabilidad ($0 \leq p \leq 1$).
- P₁₀₀ Peso medio de cien semillas (g)
- PEG Polietilenglicol.
- q Probabilidad ($q = 1 - p$).
- R² Coeficiente de correlación.
- SC Suma de los cuadrados
- T₂₅ Tiempo medio (días) para una germinación del 25 por ciento de germinación.
- T₅₀ Tiempo medio (días) para una germinación del 50 por ciento de germinación.
- TFC Trabajo Fin de Carrera.
- T_i Índice de Timpson.
- TZ Cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio.
- UE Unión Europea
- U_i Índice de uniformidad a los i días.
- UPM Universidad Politécnica de Madrid.
- VG Velocidad de germinación (días⁻¹).
- X_{ij} Variable estudiada.
- α Nivel de significación α

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, Dña. Monique Bodson y D. J.M. Durán Altisent por su paciencia y sus consejos, por transmitirme la pasión y el rigor de la horticultura moderna.

Agradezco a los profesores y compañeros del Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia, a Dña. Elena Soblechero, D. José Ramón Martín, D. Rubén Moratiel, D. Diego Pallarés, D. Nicolás Rapado, y especialmente a mi compañera de laboratorio Ana Hernanz Grande que fue quien me enseñó las bases de la tecnología de semillas y siempre me ha dado buenos consejos.

Quiero agradecer a los responsables de Viveros PLANTHOR S.A., D. Benito y D. Serafín Grande por la cesión del material vegetal puesto a mi disposición para el correcto desarrollo del trabajo.

Quiero agradecer a las autoridades académicas de la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux* por sus ayudas económicas y por preocuparse siempre del bienestar de los estudiantes.

Agradezco a Dña. Claire Lambert y Dña. Carmen González Chamorro por su ayuda en el buen desarrollo de mi doble titulación.

Agradezco a mi familia, por su apoyo sin condiciones durante mi carrera y delante de mis decisiones.

Agradezco al equipo de rugby de Agrónomos, por haber sido los mejores compañeros de mi estancia en España, por los ricos momentos pasados con ellos.

Gracias a Judith y Guillermo, por compartir sus ideas y risas durante largos desayunos.

Agradezco a Óscar, buen y agradable compañero de trabajo, por alegrar la vida en los laboratorios del Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia.

Gracias a Isabel, sencillamente por todas las bonitas cosas vividas con ella, y por enseñarme con tanta voluntad el castellano y lo mejor de la cultura española.

RESUMEN

Se intentó mejorar un Lote de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de baja calidad y sin valor comercial de una variedad local de Galicia. Se realizaron ensayos de pre-imbibición, acondicionamiento osmótico, mátrico, hormonales y de desinfección. También se separaron las semillas en función de su densidad para dividir el Lote en sublotes de calidad diferenciada y medir diferencias de respuestas de las semillas separadas con otros tratamientos.

Por otro lado, se realizó un análisis de viabilidad al tetrazolio del Lote con el objetivo de determinar las causas del bajo poder germinativo del Lote y las posibilidades de mejorarlo.

Al ensayo de pre-imbibición, se sometieron las semillas a un caudal de agua desde 30 min. hasta 24 h. El mejor resultado fue el periodo de 4 h. La pre-imbibición influyó en el porcentaje de contaminación de semillas no germinadas por microorganismos. Se combinó una pre-imbibición de 4 h con una desinfección con hipoclorito sódico 4 % durante 4 min. Las semillas desinfectadas perdieron capacidad germinativa.

El tratamiento hormonal consistió en sembrar las semillas sobre papel de filtro imbibido con diferentes disoluciones de GA₃ en el ensayo de germinación. El ácido giberélico permitió mejorar la uniformidad de germinación pero no la germinación. La concentración que más efecto dio fue la de 10 mg·L⁻¹.

Gracias a la separación de las semillas en función de su densidad, se destacaron diferencias de calidad germinativa y de vigor de las semillas en función del peso medio de las semillas. Las semillas han sido separadas gracias a un corriente de aire vertical con el cual se obtienen 4 fracciones de semillas de densimetría variable. Se encontró una relación lineal entre el peso medio de cien semillas y su capacidad germinativa. Se ha podido dividir el Lote en fracciones de semillas de calidad creciente.

El acondicionamiento osmótico se realizó con agua desionizada, disoluciones de KNO₃ de 0,1 y 0,3 M y PEG-6000 de 150, 250 y 350 g·kg⁻¹ durante periodos de 24, 28 y 96 h. Las semillas acondicionadas con PEG-6000 perdieron mucha capacidad germinativa. El agua desionizada y el KNO₃ durante 96 h son los tratamientos que mejores resultados han dado, mejorando la uniformidad y velocidad de germinación. También se detectó que la uniformidad de germinación solo depende del periodo de tratamiento y no del el tipo de solución.

El acondicionamiento mátrico dio los mejores resultados con las semillas más deterioradas, mejorando su germinación mientras que en semillas de mejor calidad no se mejoró. El tratamiento más adaptado es el de la proporción en volumen 1: 10: 2 de Algalita[®] durante 6 días.

Con el análisis de viabilidad se detectó una maduración incompleta de las semillas. 52,5 % de las semillas son viables frente a una germinación de 45 % a fecha del ensayo al TZ. El cotiledón del 38,5 % de las semillas no está totalmente desarrollado y un 12,5 % no tiene embrión. La falta de maduración de las semillas parece ser la causa de la baja calidad del Lote.

RÉSUMÉ

*L'objectif de ce travail est d'améliorer un lot de semences de mauvaise qualité et sans valeur commerciale d'une variété locale d'oignon (*Allium cepa* L.) originaire de Gallice, Espagne. Dans ce but, des essais de conditionnement des semences ont été réalisés: pré-imbibition, conditionnement osmotique et matriciel, traitements hormonaux et de désinfection. Le lot a aussi été séparé en fonction de la densité des semences par courant d'air forcé afin d'obtenir des sous-lots de qualité différenciée.*

D'autre part, un test de viabilité au tétrazolium a été réalisé pour déterminer les causes de la mauvaise qualité germinative du lot ainsi que les possibilités d'amélioration du lot.

Durant l'essai de pré-imbibition, les semences ont été soumises à un circuit d'eau de 30 min à 24 h. Le meilleur résultat a été obtenu avec la période de 4 h. La pré-imbibition a surtout influencé le pourcentage de semences non germées contaminées par des saprophytes. Une combinaison de la pré-imbibition avec une désinfection chimique à l'hypochlorite de sodium 4 % durant 4 min. a été réalisée. Les semences désinfectées ont perdu de leur capacité germinative.

Le traitement hormonal consistait à semer les graines sur du papier filtre imbibé par des solutions de GA₃ à différentes concentrations durant le test de germination. Le GA₃ a amélioré l'homogénéité de germination mais pas le pourcentage. La concentration qui donne les meilleurs résultats est celle de 10 mg·L⁻¹.

La séparation des semences en fonction de leur densité a donné de bons résultats. Des différences significatives de qualité germinative et de vigueur ont été détectées en fonction du poids moyen des graines. Les semences ont été séparées par un courant d'air forcé vertical grâce auquel s'obtiennent 4 fractions de graines de densité variable. Une relation linéaire entre le poids moyen de 100 graines et leur capacité germinative a été déterminée. Le lot a pu être divisé en sous-lots de graines de qualité croissante. Les graines les plus lourdes germent mieux.

Le conditionnement osmotique a été réalisé avec de l'eau désionisée, des solutions de KNO₃ de 0,1 et 0,3 M et de PEG-6000 de 150, 250 et 350 g·kg⁻¹ pendant 24, 48 et 96 h et suivi par un séchage. Les semences conditionnées avec le PEG-6000 ont perdu de leur capacité germinative. L'eau désionisée et le KNO₃ pendant 96 h ont donné les meilleurs résultats, améliorant l'uniformité et la vitesse de germination. L'uniformité de germination est seulement fonction de la période de conditionnement.

Le conditionnement matriciel a donné de meilleurs résultats avec les semences les plus détériorées, améliorant leur capacité germinative alors qu'aucune amélioration n'a été observée avec les graines de meilleure qualité. Le traitement le mieux adapté est celui réalisé avec la proportion semence: matrice: eau en volume 1: 10: 2 d'Algalita[®] pendant 6 jours.

Grâce à l'analyse au tétrazolium, une maturation incomplète a été détectée parmi les graines du lot. Les semences avaient une viabilité de 52,5 % avec un taux de germination de 48 % à date de l'analyse. 38,5 % des graines n'avaient pas le cotilédon développé et 12,5 % des graines ne possédaient pas d'embryon. Le manque de maturation des graines doit être la cause des problèmes de germination et vigueur du lot.

SUMMARY

*In this work, it has been attempted to improve the value of a non-commercial seed lot of an onion (*Allium cepa* L.) local variety from Galicia, Spain. Different seed conditioning treatments have been done: prehydration, osmotic and matrix priming, hormonal and disinfection treatments. A densimetric seed separation has been carried out to divide the seed lot in four sublots of different quality and to measure seed answers to hormonal treatments.*

Moreover, a tetrazolium seed test was carried out to determine the causes of the seed lot low germination rate.

In the prehydration essay, seeds were immersed in a circulating water flow from 30 minutes to 24 h. Best results were obtained with the 4 h hydration. Prehydration influences micro-organisms contamination percentage of non-germinated seeds. Furthermore, prehydration was combined to a disinfection using sodium hypochlorite 4 % for 4 minutes. Disinfected seeds lost germination capacity.

Hormonal treatment consisted in hydrating seeds on filter paper of different GA_3 concentration solutions during germination test. GA_3 improved germination uniformity but not germination percentage. Best results have been obtained with the $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 concentration.

In seed separation, differences in germination rate and vigour have been observed in function of seeds medium weight. Seeds were separated in a vertical air flow that divided seeds in four fraction of growing density. A linear correlation between seed germination percentage and one hundred seeds medium weight was determined. It's possible to separate seeds in different seed sublots of different quality.

Osmotic conditioning were done with deionized water, KNO_3 0,1 and 0,3 M and 150, 250 and $350 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PEG-6000 solutions for periods of 24, 48 and 96 h. In PEG-6000 seed osmoconditioning, a significant loss of germination was observed. Deionized water and KNO_3 solutions improved seed quality, improving seed germination velocity and uniformity. It has been detected that seed germination uniformity only depends on the period of treatment but not on the solution concentration.

Matrix seed priming gave best results with most deteriorated seeds, improving significantly their germination rate but had a few influence on seeds of better quality. Best treatment resulted the one using the proportion in volume seed: matrix: water of 1:10:2 of Algalita[®] during 6 days.

In the viability test, a incomplete maturation of seeds was observed and 52,5 % of seeds were viable, with germination results of 45 % on date of viability test. Cotyledons of 38,5 % of seeds were immature and 12,5 % of seeds didn't have any embryo. Low maturation of seeds must have been the cause of the low lot quality.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.1.1. LA CEBOLLA (<i>ALLIUM CEPA</i> L.).....	1
1.1.2. LA PRODUCCIÓN DE CEBOLLA (<i>ALLIUM CEPA</i> L.) EN ESPAÑA.....	1
1.1.3. LAS VARIEDADES LOCALES.....	2
1.1.4. LA MULTIPLICACIÓN POR SEMILLAS.....	2
1.1.4.1. LA MULTIPLICACIÓN DE LA CEBOLLA (<i>ALLIUM CEPA</i> L.).....	4
1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.2.1. CALIDAD DE SEMILLAS.....	4
1.2.2. GERMINACIÓN, VIGOR, VIABILIDAD Y DORMICIÓN.....	6
1.2.2.1. GERMINACIÓN.....	6
1.2.2.2. VIGOR.....	7
1.2.2.3. VIABILIDAD.....	8
1.2.2.4. DORMICIÓN.....	8
1.2.2.5. TEST DE GERMINACIÓN.....	10
1.2.2.6. ÍNDICES DE GERMINACIÓN.....	10
1.2.3. ANÁLISIS DE SEMILLAS.....	12
1.2.3.1. ANÁLISIS DE PUREZA.....	12
1.2.3.2. HUMEDAD DE LAS SEMILLAS.....	13
1.2.3.3. TEST DE GERMINACIÓN.....	13
1.2.4. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS.....	13
1.2.4.1. PRE-GERMINACIÓN.....	17
1.2.4.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO.....	17
1.2.4.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO.....	19
1.2.5. TRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	20
1.2.5.1. TRATAMIENTOS HORMONALES.....	20
1.2.5.2. DESINFECCIÓN QUÍMICA DE SEMILLAS.....	20
1.2.6. SEPARACIÓN DE SEMILLAS.....	21
1.2.7. ENSAYO TOPOGRÁFICO DE TETRAZOLIO.....	22
1.3. OBJETIVOS.....	26

2. MATERIAL Y MÉTODOS	27
2.1. MATERIAL VEGETAL	27
2.1.1. ANÁLISIS DE LOS LOTES DE SEMILLAS	27
2.1.1.1. ANÁLISIS DE PUREZA	27
2.1.1.2. PESO DE LAS SEMILLAS	27
2.1.1.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	28
2.1.1.4. CALIDAD GERMINATIVA INICIAL DE LOS LOTES	28
2.1.2. MUESTREO	28
2.1.3. ENSAYOS DE GERMINACIÓN	29
2.2. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS	29
2.2.1. ACONDICIONAMIENTO HÍDRICO	29
2.2.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO	31
2.2.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO	33
2.3. TRATAMIENTO HORMONAL	33
2.4. DESINFECCIÓN QUÍMICA	34
2.5. SEPARACIÓN DE SEMILLAS	34
2.6. ENSAYO TOPOGRÁFICO AL TETRAZOLIO	36
2.6.1. PREACONDICIONAMIENTO	36
2.6.1.1. PREPARACIÓN PARA LA TINCIÓN	36
2.6.1.2. TINCIÓN	37
2.6.1.3. PREPARACIÓN PARA LA EVALUACIÓN	38
2.6.1.4. EVALUACIÓN	38
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1. ANÁLISIS DE LAS SEMILLAS	47
3.1.1. CALIDAD GERMINATIVA	47
3.2. ACONDICIONAMIENTO HÍDRICO	49
3.2.1. PRE-IMBIBICIÓN	49
3.2.2. TRATAMIENTOS QUÍMICOS	52
3.2.3. DESINFECCIÓN QUÍMICA	52
3.2.4. TRATAMIENTO HORMONAL	52
3.3. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLA	57
3.3.1. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO	57

3.3.2. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO	65
3.4. SEPARACIÓN DE SEMILLAS	69
3.5. ENSAYO TOPOGRÁFICO AL TETRAZOLIO.....	78
4. CONCLUSIONES.....	81
5. BIBLIOGRAFÍA	83

ANEXOS:

- I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**
- I.1. TRATAMIENTO HORMONAL**
- I.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO**
- I.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO**
- I.3.1. FRACCIÓN DE SEMILLAS LIGERAS**
- I.3.2. FRACCIÓN DE SEMILLAS PESADAS**
- I.4. SEPARACIÓN DE SEMILLAS**

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo, se plantea mejorar *a posteriori* de la cosecha semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de unas variedades locales de España.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. LA CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

La cebolla es una planta de ciclo bianual que se cultiva como anual cuando se aprovecha el bulbo y como bianual cuando se quiere obtener semilla. Es una planta que se encuentra entre las más antiguas cultivadas por el hombre. Se ha encontrado restos de bulbos que datan de la Edad de Bronce (5000 a.C.). En el antiguo Egipto el consumo de cebolla (*Allium cepa* L.) se muestra en las decoraciones de las tumbas de los faraones.

Su clasificación botánica es la que a continuación se describe:

Reino: *Plantae*
Subreino: *Tracheibionta*
Filo: *Magnoliophyta*
Clase: *Liliopsida*
Subclase: *Lilidae*
Orden: *Liliales*
Familia: *Liliaceae*
Tribu: *Alliaceae*
Género: *Allium*
Subespecie: *A. cepa*

Existen múltiples trabajos que describen botánicamente a la especie, como los realizados por SCHWEISGUTH (1976), FOURY *et al.* (1992) y BREWSTER (2001).

1.1.2. LA PRODUCCIÓN DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.) EN ESPAÑA

Al nivel mundial, la cebolla se encuentra entre uno de los cultivos hortícolas más importantes, con una producción total de 55 millones de toneladas en 2004 (FAOSTAT, 2005).

España ocupa el puesto número 11 a nivel mundial con una producción de 1 millón de toneladas de cebollas secas y 35 000 toneladas de cebollas verdes y chalotes. En relación con el comercio exterior, España es un país mayoritariamente exportador, con un volumen de exportación en 2002 de unas 260 000 toneladas que se exportan sobre todo dentro en países de la UE (CARRAVEDO *and* MALLOR, 2007).

En Europa, España es el principal consumidor de cebolla (*Allium cepa* L.) en torno a 16 kg por persona y año. Las otras hortalizas cuya producción supera la de la cebolla (*Allium cepa* L.) en España son: 1, el tomate; 2, el melón; 3, el pimiento y 4, la lechuga (CARRAVEDO and MALLOR, 2007).

En España prácticamente toda la cebolla se cultiva al aire libre, sólo unas pocas hectáreas se cultivan protegidas en Galicia y más del 90 % de la superficie se encuentra en regadío, cuyo rendimiento medio oscila las 49.000 kg/ha (CARRAVEDO and MALLOR, 2007).

1.1.3. LAS VARIEDADES LOCALES

Según el Código Internacional de Nomenclatura de las Plantas Cultivadas, se define Variedad Comercial (“cultivar”) como el conjunto de individuos botánicos cultivados que se distinguen por determinadas características morfológicas, fisiológicas, citológicas, químicas u otras de carácter agrícola o económico y que se conservan distintivos en la reproducción sexual o asexual. La variedad puede ser “seleccionada” (cultivo obtentor), que es la obtenida por trabajos de selección, o “local” que es la que procede de una región geográfica claramente definida, que ha demostrado suficiente uniformidad, estabilidad y caracteres distintivos que permitan su identificación en ensayos oficialmente comprobados (REQUENA, 2005).

Considerando los datos aportados por los bancos de *Allium* en España, se puede decir que España es una importante fuente de variabilidad en cuanto a especies del género *Allium*, con cerca de 1 600 entradas de diferentes especies de *Allium* (CARRAVEDO and MALLOR, 2007).

En España, las variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) más cultivadas son las de tipo Babosa, Valenciana, Liria, Grano de oro y Recas, variedades originarias de la región de Levante cuyo cultivo se ha extendido por sus buenas características: precocidad, gran rendimiento, relativamente dulces en sabor, buena resistencia a la subida a flor y buena aptitud para la conservación. La consecuencia de ello es que esas cinco variedades representan el 80-85 % de las variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) cultivadas en España (CARRAVEDO and MALLOR, 2007).

1.1.4. LA MULTIPLICACIÓN POR SEMILLAS.

La multiplicación por semillas es el medio más común de multiplicación de especies vegetales anuales o bianuales. También se usa este método de propagación en especies forestales y frutales (patrones). Tiene la ventaja de ser el método de multiplicación de especie vegetales menos costoso. La conservación y el almacenamiento de las semillas resultan ser cómodos y fáciles. Además, las semillas se consideran libres de virus. El uso de semillas como material de propagación permite la multiplicación de ecotipos específicos como variedades locales que están bien adaptadas a su región de cultivo (BODSON, 2004).

El propósito final de la semilla es el mantenimiento y/o reproducción de las características intrínsecas de ésta, de su contenido genético y/o expresión fenotípica ante unas determinadas circunstancias de manejo o medio de producción. A tal fin, la semilla debe ser en primer lugar transformada en plántula y de ésta se obtienen los beneficios buscados. Es en este proceso de transformación donde el producto debe expresar su calidad (PLEGUEZUELO, 2005).

El Reglamento Técnico de Control y Certificación de Semillas y Plantas de Vivero define “semilla” como elementos cuyo destino es reproducir la especie, ya sean tubérculos, bulbos u otros órganos de material vivo que se utilicen con fines de multiplicación (REQUENA, 2005).

Este mismo autor (REQUENA, 2005) define “Lote” como cada partida de semilla de una misma especie o variedad que proceda de una misma parcela, si se trata de material base, o de una o varias parcelas sembradas con semilla procedente del mismo origen si se trata de semillas de otras categorías.

La disponibilidad de semillas de alta calidad es importante para todos los sectores de la agricultura. Las semillas de los cultivos hortícolas son bastante caras por lo que el agricultor se debe asegurar que la germinación, nascencia y evolución de la plántula sea la correcta. Los controles de germinación en empresas productoras de semillas y en semilleros son prácticas que empiezan a ser bastante habituales pero siguen resultando costosos.

Es por ello que en las últimas décadas el mercado de las semillas haya experimentado importantes cambios en el comercio internacional, incrementando notablemente su valor económico (CONTRERAS, 2002).

Las semillas que producen las empresas han de reunir condiciones óptimas de calidad para su comercialización. Cuando se trata de semillas para cultivos extensivos, como cereales, girasol o remolacha, es la Administración quien rechaza o autoriza la semilla, identificándola en este caso como “certificada”; pero la garantía de las “semillas estándar”, como en el caso de las hortícolas, procede de las empresas productoras de las mismas. Es por tanto responsabilidad de las empresas el asegurar la calidad de las semillas hortícolas que comercializan.

Cada vez resulta más necesaria la trazabilidad de los procesos productivos y esto alcanza de lleno a la semilla. La trazabilidad de la semilla viene definida en primera instancia por el número de Lote.

La semilla comercial que le llega al agricultor debe venir perfectamente empaquetada e identificada por un número de Lote. Dicho número debe representar todo el proceso que ha seguido la semilla desde la técnica de reproducción, la selección, el manejo del cultivo y la recolección hasta el procesado. Debe definir también la pureza varietal, el peso y calibre de la semilla que contiene así como toda la información fitosanitaria y tratamientos que la semilla ha recibido (PLEGUEZUELO, 2005).

La germinación es variable entre especies, variedades y Lotes. Problemas de germinación pueden venir derivados de una larga estancia en la cámara de germinación o un mal manejo (LÓPEZ-APARICIO, 2005).

Cada vez hay más clientes que exigen plantas a medida con una serie de trabajos más o menos especiales, por lo que hay que adecuar el sistema, planificar y realizar la obtención de planta útil acorde con el pedido recibido (LÓPEZ-APARICIO, 2005).

1.1.4.1. LA MULTIPLICACIÓN DE LA CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

Existen dos sistemas básicos de producción de semillas: 1, bulbos para la producción de semillas en los que primero se cultiva el bulbo y las semillas se producen a partir de los bulbos plantados y 2, semillas para la producción de semillas en el que se vernalizan las plantas en crecimiento y se induce la floración y la producción de semillas sin pasar por el estado de bulbo (BREWSTER, 2001).

Los bulbos para la producción de semillas tienen la ventaja de que es posible seleccionar los bulbos para la calidad de las semillas y descartar los defectuosos, por ejemplo los bulbos dobles, deformes o florecidos prematuramente. Por otra parte, el método para obtener semillas desde bulbos necesita dos años de semillas a semilla (BREWSTER, 2001).

La producción de semillas a partir de semillas es posible en lugares en los que es posible la correcta vernalización de la planta para inducir el 100 % de la floración. En caso contrario se favorecerían los genotipos que florecen con más facilidad (BREWSTER, 2001).

1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cebolla (*Allium cepa* L.), tal como una de las especies hortícolas más cultivada en el mundo, es una especie de la cual se ha ampliamente investigado. La calidad de semillas de las especies cultivadas siempre ha preocupado al hombre. En la Antigüedad, el fisiólogo griego Theophrastus (372-287 a.C.) se puede considerar como el padre de la fisiología de las semillas. En una de sus contribuciones, hace referencia al papel de la imbibición en agua de las semillas del pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre la velocidad de germinación (EVENARI, 1984).

1.2.1. CALIDAD DE SEMILLAS

La calidad de cualquier producto se puede definir como el conjunto de características que el consumidor evalúa para decidir si satisface sus expectativas. En el contexto de las semillas, la calidad se puede subdividirse en cuatro cualidades básicas: genética, fisiológica, sanitaria y física. La presencia de estas cuatro cualidades esenciales en su máximo nivel permite que la semilla alcance la calidad integral (TERENTI, 2004).

Según DURÁN *and* RETAMAL (1996), los factores que intervienen en el concepto de calidad de un Lote de semillas son:

Pureza físico-botánica. En una muestra representativa de un Lote, indica la proporción entre las semillas intactas y sanas de la especie declarada y otros componentes considerados “impurezas”. Las impurezas suelen estar constituidas por piedras, semillas rotas y restos de origen vegetal entre otros.

Pureza genética. Garantiza que las semillas pertenecen a la variedad comercial, cuyas características genéticas son conocidas y distintas de los demás cultivares registrados, sin que existan mezclas entre ellos.

Poder germinativo. Expresa el porcentaje de semillas puras que, bajo condiciones favorables de germinación, son capaces de producir plántulas normales. Indica el potencial máximo de germinación. Por lo cual la siembra se debe realizar en condiciones óptimas de temperaturas, sustrato y humedad.

Vigor. Intenta dar información acerca de la respuesta y de la homogeneidad que cabe esperar de un Lote de semillas cuando se siembra en condiciones que no son favorables.

Latencia. Estado de reposo durante el cual las semillas son incapaces de germinar, aun en condiciones favorables para la germinación.

Homogeneidad del Lote. Expresa la uniformidad de todos los componentes de Lote que responden a las mismas características, preferentemente morfológicas (peso, tamaño, color, etc.). La homogeneidad puede acarrear problemas a lo largo de la producción y comercialización de las semillas. La homogeneidad repercute de forma muy significativa sobre el vigor.

Estado fitosanitario. Las semillas pueden ser vectores o portadoras de inóculo. Es de capital importancia el estado sanitario de las semillas para evitar enfermedades que en ciertas ocasiones pueden afectar a las plántulas desde los primeros momentos del establecimiento del cultivo.

Humedad. Determina, junto a la temperatura, la conservación del poder germinativo durante el almacenamiento.

La falta de calidad de un Lote semillas puede dar lugar a múltiples manifestaciones que van desde la mala conservación durante la fase de almacenamiento hasta una disminución considerable de la producción por diversas causas: 1, baja germinación y mala nascencia, especialmente en condiciones desfavorables; 2, heterogeneidad en el cultivo, ya sea en la densidad de plantas como en el proceso de maduración; 3, escasa uniformidad en el cultivo, como consecuencia de la falta de pureza varietal y 4, problemas fitosanitarios con las consiguientes consecuencias económicas y trastornos agronómicos (laboreo, persistencia de productos fitosanitarios entre otras cosas) (DURÁN *and* RETAMAL, 1996).

En un Lote de semillas, es posible definir su calidad, utilizando variables morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o la combinación de varias de ellas. Con el fin de llegar a la conclusión que un Lote es de alta o baja calidad, no solo por la definición de un atributo de la muestra, sino por el comportamiento que presenta después de un análisis exhaustivo de sus características externas (morfológicas) e internas (fisiológicas o bioquímicas).

Según BODSON (2004), el uso de semillas de buena calidad permite obtener una buena calidad de siembra y de las plantas. La calidad de la siembra está acondicionada por la calidad de las semillas: el uso de semillas de alta calidad ayuda a alcanzar la uniformidad del cultivo y minimizar el efecto del estrés ambiental.

Los factores que influyen en la calidad de las semillas son: 1, las condiciones de cultivo de las plantas madres (temperatura, fertilización, riego); 2, la madurez de la semilla en el momento de la cosecha y 3, el fotoperiodo, que puede dar lugar a la aparición de una dormición (BODSON, 2004).

La calidad de siembra se puede conseguir actuando: 1, sobre las condiciones post-fecundación hasta la madurez de la semilla, es decir durante la formación del embrión, del endospermo y de los tegumentos; 2, sobre las condiciones de conservación de las semillas; 3, sobre las condiciones de germinación y 4, con tratamientos y acondicionamiento de las semillas (BODSON, 2004).

Según CÔME (1970), los factores determinantes de la germinación son: 1, la disponibilidad en agua; 2, la disponibilidad en oxígeno; 3, la temperatura de germinación y 4 el fotoperiodo, en semillas fotosensibles. Además de esos factores principales, otros factores también pueden influir en la germinación; a saber:

- **Las condiciones antes de la cosecha:** el origen geográfico de las semillas, el origen del polen, la influencia de la especie y de la variedad, la condiciones climáticas del cultivo madre, la posición de las semillas en la planta madre y en la fruta, el tamaño de las semillas y la fecha de cosecha.
- **Los tratamientos post-cosecha:** condiciones de conservación (temperatura y humedad de las semillas), post-maduración de las semillas.
- **Las condiciones de germinación:** temperatura, disponibilidad en agua, oxígeno y fotoperiodo en algunos casos.

1.2.2. GERMINACIÓN, VIGOR, VIABILIDAD Y DORMICIÓN

Cuando las condiciones de siembra son idóneas, la emergencia en campo se puede correlacionar con la germinación, el vigor y la viabilidad del Lote. El problema que normalmente se presenta es que las condiciones óptimas de germinación se encuentran poco en la práctica. Los estrés ambientales (sequía, temperaturas inadecuadas, etc.) pueden alejar los resultados de la emergencia en campo de los resultados de los ensayos de germinación, vigor y viabilidad.

Germinación, viabilidad y vigor son tres conceptos estrechamente relacionados entre sí y muy vinculados a la calidad de las semillas. Se puede resumir de esta manera la relación entre esos diferentes conceptos de análisis de semillas (ISTA, 2003):

$$\text{Viabilidad} \geq \text{Germinación} \geq \text{Vigor} \geq \text{Emergencia en campo}$$

1.2.2.1. GERMINACIÓN

La ISTA (2003) considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación. La primera expresión de este proceso suele ser la emergencia de la radícula.

En los ensayos realizados para comprobar el poder germinativo de las semillas se pretende, ante todo, conocer el valor potencial de éstas para la siembra. Así, la germinación queda definida como la capacidad de nascencia y desarrollo que presentan las semillas para transformarse en plántulas normales, con todas sus estructuras esenciales, cuando se las somete a determinadas condiciones favorables para su crecimiento, demostrando capacidad de producción (LOVATO, 1981). Una vez conocido dicho potencial, es fácil establecer comparaciones entre la calidad de distintos Lotes para estimar su futuro valor en campo.

La máxima germinación potencial se alcanza cuando las semillas llegan a su madurez fisiológica. Cuando el punto de maduración tiene lugar en condiciones ambientales no adecuadas se produce un deterioro de la calidad (BASU, 1995).

1.2.2.2. VIGOR

Lotes de semillas de alto poder germinativo pueden tener diferencias sustanciales de emergencia en campo, en condiciones idénticas de siembra. También pueden comportarse durante el almacenamiento de forma muy diferente. Uno se puede preguntar si los resultados del ensayo de germinación son erróneos o por qué existen diferencias tan importantes en los Lotes de semillas. Esto se puede explicar considerando que el ensayo de germinación no es suficiente sensible para indicar sutiles pero significativas diferencias de calidad entre Lotes de semillas de alto poder germinativo. La causa de estas diferencias es otra componente de la calidad de semillas: su vigor (ISTA, 1995).

El vigor de la semilla es la suma de todas las propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y el papel de la semilla o el Lote de semillas durante la germinación y la emergencia de la plántula. Las semillas que se comportan bien en esos términos se denominan semillas de alto vigor y las que se comportan mal se llaman semillas de bajo vigor (ISTA, 2003).

Una reducción del vigor de la semilla esta correlacionada con la habilidad de la semilla para llevar a cabo las funciones fisiológicas que le permiten actuar. Este proceso se denomina envejecimiento fisiológico (o deterioro) y empieza desde poco antes de la cosecha y continua durante la cosecha y el almacenamiento. El deterioro fisiológico reduce las capacidades de la semilla debido a cambios de la integridad de las membranas celulares, de la actividad de las enzimas y de la síntesis de proteínas, entre otras causas. Esos cambios químicos pueden ocurrir de forma rápida o lenta en función de la genética y de factores ambientales. El punto final del deterioro de la semilla es la muerte de la semilla (pérdida completa de la capacidad de germinación). Las semillas siempre pierden vigor antes de perder la capacidad de germinar. Esto explica porque Lotes de semillas que tiene las mismas tasas elevadas de germinación pueden variar en la edad fisiológica y entonces tener diferencias significativas de vigor (ISTA, 1995).

Los ensayos de germinación marcan el criterio de viabilidad de semillas aceptado internacionalmente y representan un estándar aceptable de la actuación de las semillas en Lotes de baja germinación. Sin embargo, en Lotes de semillas de alto poder germinativo, los resultados de los ensayos de germinación no son suficientes para reflejar el potencial del Lote de semillas. En estas circunstancias determinar el vigor se hace necesario para estimar el potencial de Lote de semillas (ISTA, 1995).

Los ensayos de vigor deben ser capaces de proporcionar un índice de calidad de semillas más sensible que los ensayos de germinación y de proporcionar una escala de Lotes de semillas en función de su potencial de actuación.

La ISTA (2003) recomienda, como test de vigor, los test de conductividad y los test de envejecimiento acelerado para determinar el vigor de Lotes. Por lo tanto, se aceptan ensayos de germinación al frío, ensayos de deterioro controlado, ensayo de vigor de estrés complejos, el test de Hiltner, los test de crecimiento de la plántula y el test al tetrazolio para definir el vigor de un Lote.

Según BODSON (2004), el vigor de las semillas se puede analizar mediante conteos de germinación diarios. Los índices más importantes son el poder germinativo, la velocidad de germinación y la capacidad germinativa que corresponde al valor máximo de germinación diaria multiplicado por la tasa de germinación diaria media. También se puede estudiar la cinética de germinación en condiciones de estrés térmico o hídrico.

En este presente trabajo, las curvas y los índices de germinación permitirán comparar diferencias de vigor entre ensayos de germinación y tratamientos.

1.2.2.3. VIABILIDAD

Las semillas viables son aquellas que son capaces de producir plántulas normales en un ensayo de germinación bajo condiciones favorables, después de que se haya roto la dormición y, si están afectadas por enfermedades, tras desinfectar las semillas (ISTA, 2003).

Los ensayos de germinación realizados en condiciones estrictamente controladas de humedad, temperatura, aireación y en algunos casos iluminación, constituyen los métodos mejor conocidos y más comúnmente empleados para estimar la viabilidad de un Lote de semillas (DURÁN *and* HIERRO, 1993).

A veces, no se sabe si la baja germinación de las semillas en ensayos de germinación proviene de la presencia o no de una dormición. Entonces un ensayo topográfico del tetrazolio permite definir si las semillas no germinadas son viables pero afectadas por algún tipo de dormición o si están muertas.

1.2.2.4. DORMICIÓN

El concepto de dormición es muy ambiguo. Se puede definir en su forma más general y sencilla como la incapacidad de semillas viables de germinar bajo condiciones favorables (BEWLEY, 1997).

La dormición es una propiedad inherente a las semillas que está definida por las condiciones en las que una semilla es capaz de germinar. Está determinada por la genética con una importante influencia ambiental que está regulada, al menos en parte, por el ácido abscísico (ABA) y el ácido giberélico (GA_3). El estado de dormición no está solo influido por las condiciones de maduración, también cambia de forma continua en el tiempo de una forma determinada por el ambiente de las semillas. La dormición está presente en las plantas de las demás regiones climáticas, su adaptación resulta en diferentes respuestas al ambiente. A través de esa adaptación, la germinación está controlada en el tiempo para evitar condiciones desfavorables al establecimiento de la planta y a la fase de reproducción (FINCH-SAVAGE and LEUBNER-METZGER, 2006).

Existen varios tipos de dormición:

- Dormición primaria: ocurre cuando la semilla está aún sobre la planta madre.
- Dormición secundaria: cuando la semilla había perdido su estado de dormición primaria pero, por las condiciones ambientales adversas, vuelve a entrar en dormición.

La tendencia actual de definir los tipos de dormición es de separarlos en función del carácter morfofisiológico y de los métodos que permitan eliminarla (FINCH-SAVAGE and LEUBNER-METZGER, 2006):

Dormición morfológica: cuando la cubierta o la testa no permite el desarrollo y crecimiento del embrión y/o cuando el embrión no ha llegado a su madurez total aunque la semilla ya no está sobre la planta madre.

- Dormición morfofisiológica: cuando la cubierta o la testa, además de factores intrínsecos a la semilla impiden el desarrollo del embrión.
- Dormición fisiológica: cuando factores intrínsecos, generalmente de tipo hormonal, impiden el desarrollo del embrión.

La dormición es común en las Liliaceae. Ensayos de germinación bajo temperatura baja o tratamientos de pre-enfriamiento generalmente promueven la germinación de semillas latentes de esta familia (ELLIS *et al.*, 1985).

Semillas de especies de *Allium* ssp. recién cosechadas pueden ser latentes. En semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), la dormición es generalmente ligera. Por ejemplo, tan solo al almacenarlas a temperatura ambiente y en seco entre dos semanas y dos meses después de la cosecha permite eliminar la dormición (ELLIS *et al.*, 1985).

Según ELLIS *et al.* (1985), los tratamientos más exitosos para eliminar la dormición en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) son:

- Pre-enfriamiento a 5 °C durante 4 días, seguido por una germinación alternando la luz y la temperatura de la siguiente manera: 20 °C/16 h y 25 °C/8h.
- Temperaturas de germinación constantes entre 3 y 17 °C, con luz u oscuridad.
- Pre-enfriamiento según las Normas de la ISTA.

- El pre-enfriamiento a 5 °C suele ser el tratamiento más eficaz. Tratar las semillas con GA₃ o auxinas entre 30 y 75 mg·L⁻¹, pre-enfriamiento a 5 °C menos de 3 días o alternancia de luz y oscuridad son tratamientos parcialmente exitosos en la cebolla (*Allium cepa* L.) para eliminar la dormición. Los tratamientos con GA₃ o auxinas (50 mg·L⁻¹ pre-aplicado), temperaturas mayores de 28 °C o luz continua no tienen efecto sobre la dormición.

1.2.2.5. TEST DE GERMINACIÓN

El objetivo de los test o ensayos es determinar el potencial de germinación máximo de un Lote de semilla (ISTA, 1993).

Los test de germinación realizados en laboratorio ofrecen una primera información respecto a la calidad de las semillas que se sembrarán en el campo. Aunque en muchos casos, los resultados que se obtienen en condiciones controladas de laboratorio _ideales_ difieren de los obtenidos en el campo.

Tras un ensayo de germinación, el analista puede encontrar semillas que germinan perfectamente dando lugar a plántulas normales, otras que al desarrollarse presentan alguna anomalía o aquellas que al finalizar el ensayo no han sido capaces de germinar. Todas ellas se describen más adelante.

La ISTA (1993) establece ciertas definiciones de lo que se considera plántula normal o anormal y describe detalladamente estos conceptos para los géneros más representativos.

Para el correcto desarrollo de una semilla en plántula, es necesario que exista una combinación específica de las siguientes estructuras esenciales, dependiendo de la especie que está siendo analizada (ISTA, 1993):

- Un sistema radicular bien desarrollado, con una raíz principal y/o raíces laterales normales (como en la mayoría de las dicotiledóneas) o dos o más raíces seminales en plantas con sistema radicular fibroso.
- Un eje caulinar con hipocotilo o epicotilo bien desarrollado y una yema terminal.
- Uno o más cotiledones, según los casos.

En Europa, los ensayos de germinación están normalizados por la ISTA. En el caso de la cebolla (*Allium cepa* L.), las Normas son las siguientes: 1, el ensayo se puede realizar entre papel de filtro, sobre papel de filtro o en arena; 2, las temperaturas pueden ser de 20 °C o 15 °C; 3, los conteos se realizan después de 6 y 12 días; 4, si se sospecha una dormición, se puede realizar un tratamiento de pre-enfriamiento, según indicado en las Normas de la ISTA (1993).

1.2.2.6. ÍNDICES DE GERMINACIÓN

Para medir la calidad de germinación se han desarrollado varios índices.

El poder germinativo es el porcentaje de semillas aptas a germinar en las condiciones más favorables. Una semilla ha perdido su poder germinativo cuando es incapaz de germinar, cualquiera que sean las condiciones de germinación y los tratamientos realizados (CÔME, 1970)

La capacidad de germinación es el porcentaje de semillas que son capaces de germinar en condiciones bien definidas. Cuando se habla de poder germinativo, es importante precisar claramente las condiciones de germinación y los tratamientos previos de las semillas (CÔME, 1970).

CÔME (1970) define la velocidad de germinación como: el tiempo que necesitan las semillas para germinar. La velocidad de germinación puede medirse de diferentes maneras:

- Por la tasa de germinación de las semillas después de un periodo después de la siembra.
- Por el tiempo necesario para alcanzar el 50 % (T_{50}) ó 25 % (T_{25}) de la capacidad germinativa.
- Por el coeficiente de velocidad de germinación (VG) que se define por la integración de los tiempos de germinación de cada semilla:

$$VG = \frac{\sum N_i}{\sum (N_i \cdot D_i)} \cdot 100 \quad [1]$$

donde N_i representa el número de semillas germinadas el día D_i y D_i el número de días transcurridos desde la siembra (el día de la siembra se considera como día 0)

Al tiempo medio de germinación (T_g) le corresponde la fórmula (DURÁN *and* PÉREZ GARCIA, 1984):

$$T_g = \frac{\sum (N_i \cdot D_i)}{\sum N_i} \quad [2]$$

La velocidad de germinación corresponde al inverso del tiempo medio de germinación multiplicado por 100. la velocidad de germinación y la T_{50} son los índices más utilizados en la práctica.

El tiempo de latencia es el tiempo necesario para que germinen las primeras semillas después de la siembra.

El índice de Timpson (I_t) se describe con esta formula (DURÁN *and* PÉREZ GARCIA, 1984):

$$I_t = \sum N_i \cdot (T - J_i) \quad [3]$$

con

$$J_i = D_i - 1 \quad [4]$$

donde N_i es el número de semillas germinadas el día D_i , y D_i el número de días transcurridos desde la siembra (el día de la siembra se considera como día 0) y T el número del último día de conteo de germinación (en el caso de la cebolla, *Allium cepa* L., T = 12).

El coeficiente de uniformidad (C_u) está definido por la ecuación (DURÁN and PÉREZ GARCÍA, 1984):

$$C_u = \frac{\sum N_i \cdot (\bar{D} - D_i)^2}{\sum N_i} \quad [5]$$

Donde N_i es el número de semillas germinadas el día D_i , y D_i el número de días transcurridos desde la siembra (el día de la siembra se considera como día 0) y \bar{D} es el número de días después de la siembra elegido para calcular la uniformidad de germinación.

1.2.3. ANÁLISIS DE SEMILLAS

El análisis de semillas es la base para definir la calidad de un Lote. Su metodología es función de la especie. Las Normas de análisis de semillas están definidas por la ISTA en Europa y por la AOSA en Estados Unidos. Por lo general consta de un análisis de pureza específica o varietal, de la determinación del contenido en humedad, de la determinación del peso medio de las semillas, de ensayos de germinación, de ensayos de vigor y de ensayos de viabilidad, entre otros.

1.2.3.1. ANÁLISIS DE PUREZA

El análisis de pureza consiste en un examen pormenorizado de todos los elementos que componen la muestra que llega al laboratorio, analizando si pertenecen o no a la especie objeto de estudio. Los mecanismos de limpieza de semillas no son perfectos, por lo que es normal encontrar impurezas y semillas de otras especies en el Lote que pueden influir negativamente en el valor de la semilla. Al someter la muestra a una prueba de pureza, el analista detecta el nivel de contaminación de la muestra y por extensión del Lote (ISTA 1993).

El análisis de pureza se lleva a cabo, sobre una muestra de trabajo extraída de la muestra recibida en el laboratorio, o sobre dos submuestras cuyo peso mínimo medio viene definido para cada especie y suele ser la mitad de una muestra de trabajo. Si el análisis se efectúa sobre dos submuestras o se realizan varias repeticiones de esta prueba, hay que comprobar que no existen diferencias significativas en los resultados.

El análisis de pureza destaca tres fracciones: las semillas puras, otras semillas y la materia inerte.

La fracción de semillas puras es la porción de la muestra de trabajo que representa la especie botánica declarada sobre la que se está realizando el análisis. No se hacen diferencias entre variedades en el Lote analizado. Se trata de la pureza específica y no varietal.

Las normas de la ISTA (1993) definen las semillas puras para el género *Allium*. como:

Semillas con o sin tegumento. Fragmento de semilla cuyo tamaño sea superior a la mitad de su tamaño inicial, con o sin tegumento.

Se consideran elementos de la fracción otras semillas aquellas pertenecientes a otras especies distintas de la principal y que no están incluidas como materia inerte.

La fracción de materia inerte hace referencia a todo elemento que no es semilla: semillas totalmente esclerotizadas, trozos de semillas de menos de 50 % del tamaño original de una semilla, glumas vacías, etc.

1.2.3.2. HUMEDAD DE LAS SEMILLAS

El objetivo de este análisis es determinar el contenido de humedad presente en una semilla. Se expresa como porcentaje, en peso, de la muestra original. La realización de este ensayo se lleva a cabo sometiendo a la muestra a una alta temperatura durante un cierto tiempo. No importa que el embrión muera en el proceso ya que estas semillas no se utilizarán en posteriores ensayos de germinación, por lo que la temperatura puede superar el punto de ebullición del agua.

1.2.3.3. TEST DE GERMINACIÓN

Los test de germinación son los ensayos realizados para comprobar el poder germinativo de las semillas. Se pretende ante todo conocer el valor potencial de éstas para la siembra. En este caso, la germinación queda definida como la capacidad de emergencia y desarrollo de la semilla en una plántula normal, con sus estructuras esenciales, cuando se la somete a determinadas condiciones favorables para su crecimiento.

Una vez conocido dicho potencial será fácil establecer comparaciones entre la calidad de distintos Lotes para estimar su futuro valor en condiciones de campo.

1.2.4. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS.

El *priming* o acondicionamiento de semillas es una técnica muy empleada par mejorar la calidad de las semillas (CORBINEAU and CÔME, 2006). El acondicionamiento hídrico se usa para mejorar el rendimiento de las semillas mejorando la uniformidad de germinación y disminuyendo la sensibilidad de las semillas a los factores externos.

El *priming* está basado en el desarrollo de la germinación en tres etapas (Fig. 1.): imbibición (fase I), germinación *sensu stricto* (fase II) y crecimiento (fase III). La absorción de agua sigue este modelo trifásico con: 1, una absorción de agua rápida al principio; 2, una fase denominada germinación *sensu stricto* y 3, se produce una segunda absorción de agua en la fase asociada al crecimiento de la radícula. La fase II es la fase más importante, ligada a cambios celulares y bioquímicos incluyendo la reparación y síntesis de mitocondrias, la síntesis de nuevas proteínas asociadas a la traducción de nuevo RNA.

Por el acondicionamiento de semillas, se busca alcanzar esa segunda fase de la germinación sin llegar a la fase de germinación *sensu stricto*.

Según CORBINEAU *and* CÔME. (2006), el efecto estimulante del *priming* depende de las condiciones de temperatura, humedad de las semillas, disponibilidad de oxígeno y duración del tratamiento. El potencial hídrico utilizado varía en general entre -0,5 y -2,0 MPa dependiendo de la especie. El contenido en humedad de las semillas conseguido durante el *priming* es en general de un 40 %, valor en general más bajo que el contenido en humedad que permite la elongación de la radícula. La duración óptima del tratamiento es de 5-7 días. Los rangos de temperatura y concentraciones de oxígeno efectivos durante el *priming* de semillas son similares a los rangos de germinación de semillas no tratadas. Por tanto, el *priming* correspondería a la fase de germinación *sensu stricto*. Para ser eficiente, el *priming* requiere más de un cinco por ciento de oxígeno en el medio de acondicionamiento.

La germinación de semillas tratadas por *priming* es más rápida y uniforme que la de las semillas no tratadas. El acondicionamiento permite una mejor germinación dentro un mayor rango de temperaturas y concentraciones de oxígeno (CORBINEAU *and* CÔME, 2006).

Otra ventaja del *priming* es la mejora de semillas de bajo vigor o de semillas envejecidas de muchas especies. Esta mejora tiene efecto mientras que las semillas conserven su viabilidad. Cuanto más envejecidas estén las semillas, más largo debe ser el tratamiento de *priming*.

Para que tenga algún interés práctico el *priming*, sus efectos beneficiosos se deben conservar por un desecado subsiguiente al tratamiento para volver a la tasa de humedad inicial de las semillas. El efecto estimulante del *priming* generalmente se conserva después del desecado, pero hay que cuidar la técnica de desecación. Las semillas se deben secar a bajas temperaturas y de manera lenta. Se ha obtenido resultados conflictivos en estudios de conservación de semillas tratadas por *priming* y su longevidad. Varios informes han mostrado que es posible conservar semillas tratadas sin perder los efectos beneficiosos del *priming* mientras que otros han demostrado que ese tipo de semillas se deterioran más rápido durante la conservación que semillas no tratadas (CORBINEAU *and* CÔME, 2006).

SÁNCHEZ *et al.* (2001) recopilaron las diferentes utilidades del acondicionamiento de las semillas y de los tratamientos más adaptados. Se puede usar: 1, cuando se quiere revigorizar semillas para recuperar vigor e incrementar la longevidad durante el almacenamiento; 2, para incrementar, acelerar y sincronizar la germinación y el establecimiento del cultivo; 3, para eliminar dormición y 4, para robustecer las semillas para incrementar la germinación, el establecimiento y los rendimientos de las plantas bajo condiciones de estrés ambiental.

Los métodos de acondicionamiento de semillas se agrupan en dos categorías dependiendo de si el suministro de agua a las mismas está controlado o no. Las técnicas que limitan la toma de agua por las semillas son aquellas que emplean soluciones osmóticas (acondicionamiento osmótico), partículas sólidas (acondicionamiento mátrico), o controlan la hidratación por la adición de cantidades limitadas de agua o volúmenes exactos de semillas (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

La técnica de hidratación parcial de las semillas por adición controlada de agua se basa en la relación que se establece entre volúmenes exactos de agua y semillas. Esta tecnología permite un suministro controlado de agua a las semillas (en un tiempo único o de forma escalonada) suficiente para iniciar los procesos biológicos de germinación pero no lograr la germinación *sensu stricto*. Este procedimiento se ha desarrollado para tratar semillas a gran escala y se le denomina el método del tambor, *drum priming* o *seed hydropriming* (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

Los métodos que no controlan el suministro de agua a las semillas son aquellos en los que el agua está libremente disponible a las semillas. Por tanto, la toma de agua está gobernada por la afinidad entre los tejidos seminales y el agua. El método regula la imbibición en función del tiempo que se mantiene en contacto cualquier volumen de semilla con suficiente cantidad de agua. Se trata del acondicionamiento hídrico o de la pre-hidratación de semillas.

También, en las técnicas de imbibición parcial de agua como en el método del tambor, es más difícil conseguir una hidratación homogénea de las semillas que con los tratamientos osmóticos y mátricos. En efecto, en un tratamiento osmótico, la hidratación se para cuando se alcanza el equilibrio osmótico solución: semilla y no por el tiempo de imbibición de las semillas. Para superar esta dificultad técnica, se puede someter las semillas a dos o más ciclos de hidratación parcial-desección (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

En términos generales, se plantea que si las semillas se desecan excesivamente, después del tratamiento de acondicionamiento, o si se mantienen con una tasa alta de humedad por un largo periodo de tiempo, los mecanismos de deterioro celular se impondrán sobre los mecanismos de reparación y activación que ocurrieron durante el tratamiento. La sensibilidad al efecto nocivo de la deshidratación se incrementa con el tiempo transcurrido desde el inicio de la imbibición; es decir, con el nivel de hidratación alcanzado y con el desarrollo de los procesos fisiológicos irreversibles (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

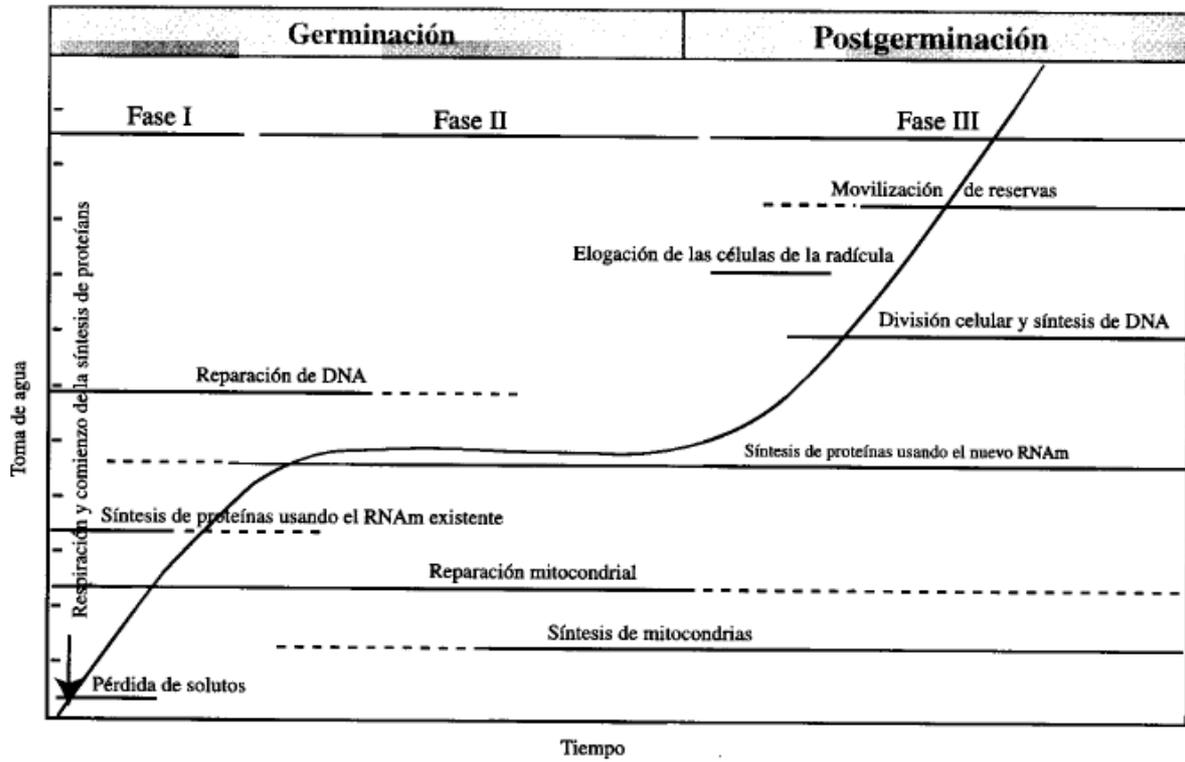


Fig. 1. Patrón trifásico de la hidratación en semillas frescas con capacidad de germinación y principales cambios fisiológicos asociados al proceso de germinación. Según BEWLEY (1997).

1.2.4.1. PRE-GERMINACIÓN

La pre-germinación, también conocida como pre-hidratación o pre-imbibición, es una técnica muy común en la mejora de Lotes de semillas. Es un método de hidratación por el cual se controla la toma de agua con el tiempo de contacto entre la semilla y el agua. Tiene la ventaja de ser una técnica barata y de fácil aplicación. Su principal inconveniente es el control de la toma de agua y sobre todo el nivel de homogeneidad de la hidratación de las semillas. También cuando se sumergen las semillas totalmente en agua, hay que cuidar la oxigenación de esas mismas y evitar problemas de anoxia que pueden afectar el vigor o la viabilidad de las semillas. Para mejorar la homogeneidad de la hidratación, la hidratación se puede realizar mediante varios ciclos de hidratación-deshidratación. De esta manera, la repartición del agua es mejor.

Los métodos que se emplean para esa técnica suelen ser la hidratación de las semillas entre papeles de filtro, someter las semillas a un caudal de agua o de vapor y sumergir directamente las semillas en agua, entre otras cosas.

El humedecimiento de las semillas antes de que la siembra tenga lugar mejora el porcentaje de germinación, la velocidad y sincroniza la nascencia, minimizando el efecto del suelo y de las condiciones meteorológicas cuando son adversas (BRADFORD, 1986).

CASEIRO (2003) realizó tratamientos de pre-hidratación, en varios Lotes de cebolla (*Allium cepa* L.). El método de tambor a las temperaturas de 15 y 20 °C disminuyó la tasa de germinación y la velocidad de germinación en Lotes de semillas de baja calidad. Por tanto, la velocidad de germinación aumentó significativamente en Lotes de semillas de buena calidad pero no se mejoró la tasa de germinación. Los ensayos de pre-hidratación de semillas entre papel de filtro facilitan la oxigenación de las semillas mientras se hidratan las semillas. CASEIRO (2003) realizó varios ensayos de pre-hidratación entre 2, 4 y 6 hojas de papel de filtro durante 48 y 96 h. El número de hojas de papel de filtro no influyó en la tasa de germinación de los Lotes de semillas pero sí influyó en la velocidad de germinación hasta duplicarla.

1.2.4.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO

La técnica del acondicionamiento osmótico tiene como fundamento activar el metabolismo de la semilla por medio de disoluciones con sales o compuestos orgánicos de alto peso molecular sin llegar a la germinación. La hidratación de las semillas ocurre en condiciones controladas exponiéndolas para ello a una solución acuosa de potencial osmótico conocido. El proceso debe realizarse de tal forma que permita a las semillas absorber suficiente volumen de agua para activar el metabolismo de germinación, sin que lleguen a producirse situaciones de anoxia, fermentaciones o se desencadenen procesos desfavorables que puedan comprometer la primeras fases del proceso germinativo.

El acondicionamiento osmótico permite la hidratación de las semillas en función del equilibrio de potenciales osmóticos que se establecen entre la semilla y la solución. La técnica mantiene un nivel de humedad que desencadena una serie de procesos biológicos y asociados al proceso de germinación pero no permiten la emergencia de la radícula.

Según SÁNCHEZ *et al* (2001), las principales sustancias que se utilizan en el acondicionamiento osmótico son de tres tipos: 1, las soluciones de moléculas de alto peso molecular como el polietilenglicol (PEG); 2, las soluciones salinas en las que se emplean el KNO_3 y K_3PO_4 , NaCl , NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KH_2PO_4 y 3, soluciones orgánicas compuestas de azúcares (sacarosa, manitol y glicerol).

Los tipos de polietilenglicol (PEG) con peso molecular comprendido entre 2000 y 8000 son las sustancias recomendadas como sustancias osmóticas ideales para acondicionar semillas. Estas moléculas no penetran en las células, no presentan carácter tóxico, mantienen casi constante la osmolaridad de la solución y cuando están presentes en pequeñas cantidades, permiten una aeración aceptable del medio (SÁNCHEZ *et al.*, 2001). Además, las soluciones de PEG se pueden combinar con otras sustancias favorables a la germinación como reguladores de crecimiento, antibióticos, fungicidas, etc. La adición de reguladores de crecimiento se usa principalmente para eliminar cualquier tipo de dormición fisiológica. El uso de antibióticos y antifúngicos ayudan a reducir la proliferación microbiana durante la emergencia y el establecimiento del cultivo.

Según BROCKLEHURST *et al.* (1987a), el PEG fue la sustancia que mejor resultados ha dado en ensayos de acondicionamiento en varias especies de hortalizas mientras que el KH_2PO_4 reducía la tasa de germinación y nascencia.

Las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) osmoacondicionadas no parecen padecer pérdidas de viabilidad importantes durante el almacenamiento después de su desecación. BROCKLEHURST *et al.* (1987b) llegó a almacenar sin pérdida de viabilidad significativa semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) acondicionadas con PEG. También BROCKLEHURST *et al.* (1987a) describe que semillas de cebolla osmoacondicionadas pueden estar desecadas y almacenadas durante más de 18 meses sin pérdida significativa de viabilidad.

Las soluciones salinas se usan generalmente más bien para su efecto osmótico que por sus propiedades químicas aunque esas últimas pueden afectar las características fisiológicas y bioquímicas de las células de las semillas.

SIVRITEPE *and* SIVRITEPE (2007) detectaron que el uso de cloruro sódico para acondicionar semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) permite mejorar la tolerancia de las plántulas al estrés salino.

Las soluciones a base de azúcares permiten obtener resultados satisfactorios al acondicionar semillas pero tienen la desventaja de que esas disoluciones se contaminan rápidamente y esto puede afectar considerablemente los resultados del tratamiento (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

TRIGO *et al.* (1999) llegaron a esas conclusiones al osmoacondicionar semillas de cebolla (*Allium cepa* L.): 1, el tratamiento funciona mejor con KNO_3 que con PEG; 2, las semillas acondicionadas resisten mejor a condiciones de germinación suboptimales; 3, las semillas acondicionadas conservan su calidad fisiológica durante seis meses de almacenamiento y 4, se puede cambiar el proceso de envejecimiento natural de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) con acondicionamiento osmótico.

La oxigenación de las semillas es un factor importante que puede limitar el éxito del acondicionamiento osmótico. BUJALSKI *et al.* (1989) utilizaron aire enriquecido para el acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). Se incrementó el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación frente a semillas no tratadas, semillas tratadas con aire no enriquecido y semillas acondicionadas sobre papel de filtro. Además, las semillas acondicionadas con aire enriquecido fueron menos afectadas por el proceso de desecación subsiguiente al tratamiento, conservando el efecto ganado por el tratamiento más tiempo que semillas osmoacondicionadas con aire normal.

ELLIS *and* BUTCHER (1988) han llegado a reducir la temperatura base de germinación en varios Lotes de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) gracias al acondicionamiento osmótico y por lo tanto, llegaron a mejorar la germinación de esas semillas a temperaturas subóptimas.

Según BREWSTER (2001), la emergencia de la radícula de la cubierta seminal de la semilla de cebolla (*Allium cepa* L.) es el estado más sensible a la humedad. La emergencia sólo ocurre si el potencial hídrico es mayor de -1,1 MPa. Si el suelo se encuentra más seco, se retrasa la emergencia hasta que la lluvia o el riego eleven el potencial hídrico por encima de este nivel basal.

1.2.4.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO

En este tipo de acondicionamiento la hidratación de las semillas se controla mediante una matriz sólida que retiene una cantidad limitada de agua con una cierta energía, que se manifiesta en el potencial hídrico matricial de dicho medio. Esa energía limita la absorción de agua por parte de las semillas de tal modo que, cuando el potencial hídrico del interior de la semilla (básicamente osmótico) y el del medio (fundamentalmente matricial) se igualan, la hidratación de la semilla se detiene (ROJO, 2005).

En un sistema controlado, los procedimientos que utiliza el acondicionamiento mátrico se usan para incrementar el contenido de humedad de las semillas. Las semillas, las partículas sólidas y el agua son los tres componentes básicos de esta técnica. Estos tratamientos se conocen como acondicionamiento mátrico de semillas, *matrix priming* o *seed matricconditioning*. Las sustancias empleadas en el acondicionamiento mátrico pueden ser derivados de arcillas expandidas (Vermiculita-2 y Agro-Lig[®]) sometidos a altas temperaturas o proceden de tierras de diatomeas (Micro-Cel E[®]). Se trata de materiales ligeros (80-120 kg·m⁻³), tamaño reducido de partículas (<100 μm), de gran superficie específica (90-100 cm²·g⁻¹) y con una gran superficie de absorción de agua (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

Algunas de las características que el material de la matriz debe llevar son: 1, bajo potencial mátrico; 2, poca solubilidad en agua; 3, alta capacidad de absorción de agua; 4, alta superficie específica y 5, no tóxico para las semillas. De manera general, el material utilizado debe ser lo más inerte posible para influir solo en el potencial hídrico de la mezcla.

La duración del acondicionamiento y la proporción en la que se deben emplear los componentes de este sistema (semilla: sólido: agua) son los dos factores a determinar empíricamente para cada especie y Lote de semilla (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

En varias especies hortícolas, con el acondicionamiento mátrico se obtienen los mejores resultados para incrementar la germinación con relación al acondicionamiento osmótico, aunque los procesos fisiológicos que producen ambos en las semillas son muy similares (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

Si bien el principio en el que se basa el acondicionamiento mátrico es similar al acondicionamiento osmótico, esta práctica presenta ciertas ventajas: 1, no produce toxicidad; 2, no produce efectos negativos como consecuencia de una inadecuada concentración de sales; 3, no produce lixiviación o pérdida de iones; 4, no requiere de un sistema de aireación permanente; 4, permite realizar tratamientos previos de desinfección, incorporar aditivos o agentes biológicos y 5, puede llevarse a cabo en recipientes de volumen pequeño y se puede realizar sin grandes costes adicionales (DURÁN *and* RETAMAL, 1997).

Se ha demostrado que la efectividad del acondicionamiento mátrico sobre el osmótico se debe fundamentalmente al mayor aporte de oxígeno y de calcio que hace el soporte del acondicionamiento mátrico a las semillas durante el intercambio que se establece en el sistema semilla-sustrato. El oxígeno y el calcio son esenciales en la división celular y en la activación de diferentes funciones en las membranas y de proteínas (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

Según SZAFIROWSKA *et al.* (2002), el acondicionamiento mátrico permite mejorar la germinación y el vigor en semillas envejecidas. El efecto tratamiento siempre tiene mejor efecto en semillas más deterioradas y envejecidas.

El tratamiento más efectivo en la cebolla (*Allium cepa* L.), utilizando Micro-Cel[®] como matriz, es la proporción 2:1:3 en peso durante 5 días a 15 °C. Esta proporción permite aumentar la germinación, la emergencia en campo, el peso fresco y seco de las plántulas y reducir la pérdida de electrolitos (KEPCZYNSKA *et al.*, 2003)

1.2.5. TRATAMIENTOS QUÍMICOS

Es muy común usar productos químicos para mejorar la calidad de siembra de semillas. Se añaden sustancias químicas en semillas pildoradas y recubiertas. Esas sustancias suelen ser hormonas vegetales o sustancias microbianas que promueven la germinación, fungicidas y plaguicidas entre otras cosas.

1.2.5.1. TRATAMIENTOS HORMONALES

Los tratamientos hormonales son comúnmente utilizados para quitar la dormición en semillas. Su uso depende de la especie. En general permiten obtener una germinación más homogénea.

1.2.5.2. DESINFECCIÓN QUÍMICA DE SEMILLAS

En las semillas están presentes tres grandes grupos de agentes patógenos: hongos, bacterias y virus. Estos parásitos pueden alterar la germinación de la semilla, pueden llegar a inhibir total o parcialmente el desarrollo de la plántula o bien pueden multiplicarse activamente a expensas de los órganos desarrollados de la planta provocando alteraciones de naturaleza muy diversa.

La presencia de hongos en un Lote de semillas puede tener varios orígenes (DURÁN and PÉREZ-GARCIA, 1984):

- Las impurezas presentes en el Lote, como partículas de tierra, fragmentos de hojas, cápsulas, esclerocios, ...
- Las semillas de otras especies pueden ser portadoras de un parásito polífago que, en un futuro, puede volverse patógeno para el cultivo.
- Esporas libres adheridas a la superficie de la semilla
- Formaciones presentes en las cubiertas o en el interior de la semilla, que pueden ser micelio latente y fructificaciones, entre otras.

El manejo de las enfermedades en el género *Allium* se realiza gracias a los demás principios de la fitopatología. De forma general, las variedades comerciales de este género son muy sensibles a las enfermedades. La rotación de los cultivos, la fumigación del suelo y el uso de fungicidas en los tratamientos de semilla, los tratamientos en la línea de cultivo, baños desinfectantes del transplante y spray son técnicas de uso muy habitual en la práctica, especialmente en la cebolla (*Allium cepa* L.).

Botrytis ssp. y *Pythium* ssp. se controlan mediante tratamientos de las semilla con fungicidas. Tratar los surcos de siembra con fungicidas permiten controlar *Fusarium* ssp. y *Pythium* ssp.

En la cebolla (*Allium cepa* L.), el estado de plántula es especialmente sensible a las siguientes enfermedades (MESSAIEN *et al.*, 1993):

- *Pythium* ssp. o otros hongos poco específicos y *Botrytis allii*, que provocan la muerte de las plántulas.
- Carbón, provocado por *Urocystis cepulae*, cuya penetración en la plántula es posible hasta el estado dos hojas.

La multiplicación vegetativa permite evitar esas enfermedades pero favorece la contaminación de los bulbos por hongos y nematodos.

1.2.6. SEPARACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas se pueden analizar o separar en función de sus características externas. Las semillas de un Lote se caracterizan y diferencian por atributos morfológicos y físicos. Los atributos morfológicos que posee una semilla influyen en la calificación de la misma. Por ello se considera que un análisis exhaustivo de las características externas puede ser importante para la determinación de la calidad de un Lote de semillas.

El estudio de los caracteres morfológicos está lleno de controversias; porque no todos los autores valoran del mismo modo la importancia de la morfología de la semilla. En algunas especies la influencia es clara, lo que nos hace pensar que el efecto de las características externas de las semillas sobre su calidad vendrá dado en función de la especie e incluso de la variedad (BASU, 1995).

Las características morfológicas más usadas en la tecnología de las semillas son el tamaño, el diámetro, el color, el peso y la densidad.

El efecto del tamaño sobre la germinación, vigor y rendimiento ha sido ampliamente investigado. Se dice en general que las semillas grandes tienen mejor calidad de germinación y vigor que las semillas pequeñas. Por ejemplo, CÔME (1970) describe el tamaño de la semilla tal como uno de los factores que influyen en la germinación. Además, la separación de semillas por tamaño es de fácil aplicación industrial.

TORRES *et al.* (1990) estudiaron el efecto del tamaño de la semilla de girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre la germinación y el vigor. Concluyeron que las semillas más grandes germinan mejor y pierden menos electrolitos al ser hidratada. En la fracción de semillas pequeñas se encontraron más semillas partidas con una germinación y un vigor altamente reducidos.

GABRIEL *et al.* (1997) realizó una separación gravimétrica en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) en varios Lotes de semillas. Llegó a correlacionar el tamaño de las semillas con la productividad y la calidad del cultivo. El tamaño de las semillas tenía un mayor efecto que el peso; cuando analizaba las tasas de germinación encontró interacciones entre el tamaño y el peso de las semillas. El poder germinativo aumentó linealmente con el diámetro de la semilla. La tasa de emergencia aumentó de forma curvilínea cuando el diámetro era mayor. Otras variables del cultivo como la altura de la planta, el rendimiento comercial de bulbos aumentaron de forma curvilínea con el diámetro de la semilla. Del mismo modo el periodo desde la emergencia hasta la cosecha era menor cuando aumentaba el diámetro de la semilla.

1.2.7. ENSAYO TOPOGRÁFICO DE TETRAZOLIO

El ensayo topográfico del tetrazolio (TZ) es un análisis químico basado en las reacciones de oxidación-reducción que realizan las células vivas del embrión u otros tejidos de las semillas. Dichas células poseen unas enzimas, denominadas hidrogenasas, que están implicadas en la respiración celular y son capaces de reaccionar con la solución de tetrazolio (ISTA, 2004). Es un método relativamente rápido, ya que en 24 h se obtienen resultados sobre la viabilidad de las semillas, pudiendo tener un avance de tales resultados en mucho menor tiempo (4 h) si las semillas se incuban a mayor temperatura (ISTA, 1993).

El ensayo al tetrazolio sirve para medir la viabilidad de semillas, pero también se puede extender al análisis de vigor (ISTA, 1993).

El objetivo principal de esta prueba es determinar la viabilidad de una muestra y por extensión de un Lote de semillas. Asimismo ofrece una referencia sobre el poder germinativo de una muestra de semillas (ISTA, 1993).

Este ensayo es útil para determinar, tras haber realizado la prueba de germinación, la causa que explica el por qué una muestra presenta un alto porcentaje de semillas que no han germinado. De este modo se puede conocer si las semillas presentan dormición, están inhibidas o por el contrario están dañadas y no germinarán nunca. El test del TZ también sirve para diagnosticar la causa del deterioro de las semillas ya sea por un secado inadecuado, plagas o lesiones mecánicas. Un inconveniente de este análisis es que no detecta la presencia de hongos. Además, la determinación e interpretación de los resultados puede resultar subjetivas en algunos casos.

Para llevar a cabo la prueba de viabilidad, las semillas se tratan con una solución de cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, de modo que penetre en las células y reaccione con las enzimas hidrogenasas implicadas en la respiración celular que se encuentran en los tejidos vivos. Como consecuencia de la reacción (Fig. 2.), el tetrazolio se transforma en un compuesto de color rojo, el formazán, insoluble en agua, estable y no difusible, de modo que aquellas zonas donde ha habido reacción permanecerán teñidas de color rojo.

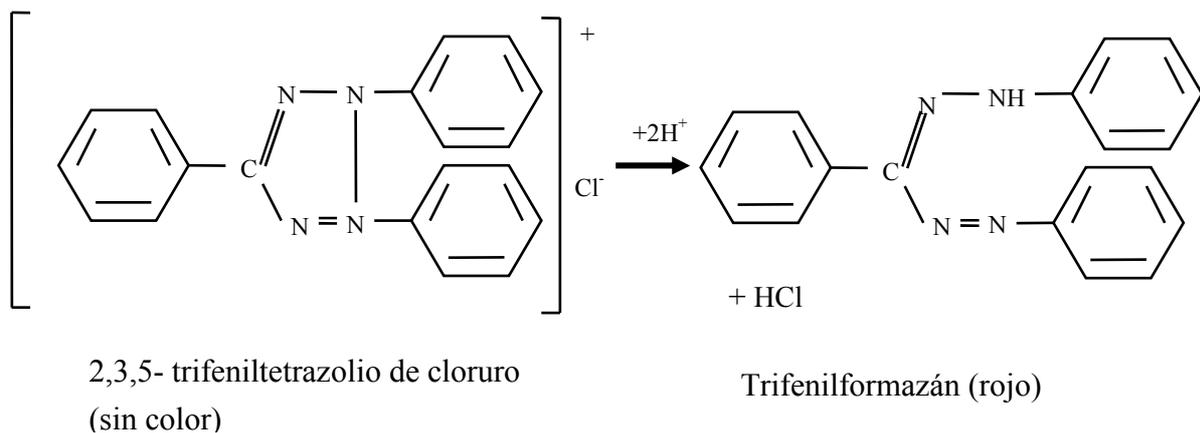


Fig. 2. Esquema del proceso de oxidación del tetrazolio (ISTA, 2003).

Transcurrido un tiempo, variable en función de la especie, las células vivas del embrión quedan coloreadas de rojo mientras que las células muertas permanecen incoloras. Aquellas células que quedan débilmente coloreadas (tonalidad rosada), son células que están debilitadas o enfermas.

La concentración de la disolución puede variar entre 0,1 y 1,0 por ciento, siempre y cuando el pH que se obtenga esté comprendido entre 6,5 y 7,5.

El ensayo de vigor al tetrazolio tiene varias ventajas (ISTA, 2003):

- Es aplicable a todo tipo de semillas.
- No depende de factores externos.
- Permite examinar características del vigor de las semillas tales como la integridad física de la semilla, la actividad de enzimas claves y la integridad de las membranas.

La ISTA (1993) aconseja realizar ocho repeticiones de cincuenta semillas, tomadas al azar y procedentes de la fracción de semilla pura. La prueba del TZ se puede realizar sobre semillas que tras ser sometidas al test de germinación no se han desarrollado.

Existen muchas opiniones acerca de los métodos para la preparación de las semillas para su tinción, la tinción en sí misma, así como consideraciones acerca de la evaluación de la viabilidad.

Para alcanzar resultados fiables, el ensayo de tetrazolio requiere varias etapas que son imprescindibles para todos los ensayos de viabilidad independientemente del material disponible y de la especie analizada. Esas etapas son:

- 1. Preacondicionamiento.** Se busca promover una tinción fiable y calidad en la evaluación mediante una prehumidificación. Se requiere normalmente para reblandecer las cubiertas seminales y otras estructuras. Hace más cómodos y precisos la perforación, los cortes y la eliminación de las estructuras innecesarias, permitiendo de esta forma la adecuada penetración de la disolución de TZ.

La humidificación de los tejidos vivos promueve la actividad de los sistemas enzimáticos, el incremento de la actividad del embrión y la mejora de la tinción y de la calidad de la evaluación. Sin embargo, en el caso de semillas débiles, es necesario reducir el tiempo de humidificación para reducir el excesivo deterioro de los tejidos.

- 2. Preparación para la tinción.** Además de la humidificación, en general las semillas requieren una preparación adicional antes de la tinción. El principal objeto de la preparación de las semillas es: 1, asegurar la oportuna y adecuada penetración de la disolución de tinción en todos los tejidos vitales de cada semilla; 2, acelerar la tinción y 3, facilitar la realización y aumentar la velocidad y la precisión de la evaluación.
- 3. Tinción.** Posibilita el reconocimiento de la presencia y situación precisa de tejidos normales, débiles pero vivos, críticamente débiles y muertos. La tinción se realiza en los embriones y los tejidos nutritivos vivos en caso de existir.
- 4. Preparación para la evaluación.** Los requisitos necesarios de preparación para la evaluación de semillas, embriones y tejidos nutritivos deben tenerse en cuenta en todas las etapas anteriores. La forma de realizar un corte o incisión inicial en la cubierta seminal puede modificarse fácilmente y sin mucho esfuerzo ni tiempo, de manera que se reduzca tanto la preparación como el tiempo necesario para la evaluación.

Los tipos de preparación adecuados para la evaluación posterior a la tinción de la semilla dependen de las técnicas de preparación previas a la misma. Los métodos que se utilizan normalmente para exponer los tejidos y estructuras esenciales en la evaluación son múltiples y dependen de la morfología y anatomía de las semillas. Para ello, puede utilizarse cualquier método que sea adecuado para exponer las estructuras esenciales con el mínimo esfuerzo y tiempo, sin disminuir la precisión de la evaluación.

- 5. Evaluación.** La precisión de la evaluación depende en gran parte de las precauciones que se tomen durante las primeras fases del ensayo. Hay que intentar evitar posibles daños que no se distingan de las condiciones iniciales de las semillas. La capacidad del analista en la observación de los detalles y en el análisis cuidadoso de la gravedad de las alteraciones del tejido es, asimismo, un factor muy importante para lograr una evaluación fiable.

El objeto de la evaluación puede dividirse en tres partes: 1, el objetivo principal es identificar y enumerar las semillas que poseen potencial para producir plántulas aceptables en los ensayos de germinación; 2, se puede efectuar simultáneamente la separación de las semillas viables con el fin de detallar al máximo el vigor del Lote de semillas; 3, se intenta realizar el diagnóstico de las causas de deterioro de las semillas. Los dos últimos puntos se pueden realizar mediante la construcción de una escala de viabilidad por el análisis de germinación de Lotes de semillas de viabilidad variable.

1.3. OBJETIVOS

Se plantea mejorar y analizar la calidad germinativa de semillas de una variedad local de cebolla (*Allium cepa* L.). En algunos Lotes de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), aparecen problemas importantes de germinación y de vigor. Aunque la Normativa europea exige un porcentaje de germinación tan solo superior al 70 % en los Lotes comerciales de semillas, es muy común que los Lotes no alcancen este valor. Además, la conservación y multiplicación de las variedades locales de cebolla sólo se puede realizar por medio de semillas.

Los Lotes de semillas analizados presentan un bajo poder germinativo y baja calidad sanitaria. Se va intentar mejorar su calidad germinativa y su vigor, mediante procesos de mejora de semillas como: 1, el *priming* de semillas (*prehydration, osmoconditioning, seed matrix conditioning*), 2, tratamientos químicos (hormonas e hipoclorito de sodio, entre otros) y 3, tratamientos físicos (separación de semillas por peso o densimetría entre otros).

A modo de resumen, podemos decir que el objetivo principal de este Trabajo Fin de Carrera es analizar la calidad de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) y definir el tratamiento o la mejor combinación de tratamientos para mejorar la calidad de aquellos Lotes que la presenten disminuida, a juzgar por su reducido poder germinativo. Se buscan índices que permitan la detección y diferenciación de semillas de calidad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron entre el uno de noviembre de 2006 y el 31 de junio de 2007 en el laboratorio “Centro Acreditado de Tecnologías En Semillas” (CATES) del Departamento de Producción Vegetal: fitotecnia de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

2.1. MATERIAL VEGETAL

La empresa Viveros PLANTHOR S.A. facilitó dos Lotes de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de mala calidad necesarios para llevar a cabo este trabajo. Los Lotes fueron recepcionados en Madrid el 28 de octubre de 2006. Cada Lote de semilla corresponde a una variedad local de cebolla (*Allium cepa* L.), procedentes de Galicia.

Tras la limpieza de las semillas, del análisis de pureza específica y de la división de los Lotes, cada sublote ha sido conservado a 7 °C en oscuridad en botes de polietileno herméticos.

2.1.1. ANÁLISIS DE LOS LOTES DE SEMILLAS

Antes de cualquier ensayo de mejora de semillas, se realizó un análisis de ambos Lotes. El objetivo era determinar la calidad global y sobre todo la calidad germinativa de las semillas.

2.1.1.1. ANÁLISIS DE PUREZA

A la recepción de los Lotes se realizó un análisis de pureza de las semillas. Cada muestra de trabajo tenía un peso mayor a 15 g.

La separación de la semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de las semillas de otras especies y de la materia inerte se realizó manualmente, mediante tamices de malla entre 1,40 y 2,80 mm.

El test de pureza se realizó mediante un reconocimiento visual. De cada Lote de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) se tomó el peso correspondiente a cien semillas utilizando una balanza analítica (SARTORIUS, mod. A 200S) y, sobre una mesa de trabajo con la ayuda de pinzas y lupa binocular, se desglosó la muestra en tres fracciones: 1, Semilla pura; 2, materia inerte y 3, otras semillas. Para cada fracción, una vez pesada se calcularon los resultados y se expresaron en forma de porcentaje, de acuerdo con las Normas de la ISTA (ISTA, 1993). La Directiva 2002/55/CE exige para las semillas comerciales de cebolla (*Allium cepa* L.) que el contenido máximo en granos de otras especies de plantas sea inferior de 0,5 % del peso (ANÓNIMO, 2006).

2.1.1.2. PESO DE LAS SEMILLAS

Utilizando una balanza analítica de precisión, para cada Lote de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) se determinó el peso en gramos de ($\pm 0,01$ g) de ocho repeticiones de cien semillas de cada uno de los Lotes que componen la muestra. El peso medio de cien semillas corresponde a la media de las ocho repeticiones.

2.1.1.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Tres meses después de la recepción de los Lotes, se detectó una disminución notable de las tasas de germinación de ambas variedades aunque almacenadas a una temperatura relativamente baja (7 °C). La disminución de poder germinativo podía resultar de una alta humedad de las semillas. Se analizó el contenido de humedad de las semillas con el fin de comprobar esa hipótesis apoyándose en la ecuación de viabilidad de ELLIS & ROBERTS (1981).

El método empleado sigue el procedimiento aconsejado en las Normas de la ISTA (1993).

En el caso de la cebolla (*Allium cepa* L.), se utiliza la técnica de temperatura baja constante. Este método consiste en secar las semillas en una estufa de secado a 103 °C durante 17 ± 1 h. Pasado este tiempo, se extraen de la estufa, se coloca la tapa y se deja enfriar durante 30 ó 45 minutos antes de ser pesada de nuevo. La pesada se realiza con la tapa puesta. Por su tamaño, las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) no necesitan ninguna preparación previa al secado ni presecado, ni molienda o troceado.

Para realizar este ensayo se han tomado, de forma independiente, dos muestras de trabajo mayores a 10 g a partir de la muestra de laboratorio. Las pesadas se realizaron con una precisión de $\pm 0,001$ g. Los envases se pusieron a secar 1 h a 130 °C y posteriormente se dejaron a enfriar en un desecador.

Se tomó el peso de los envases con y sin las semillas antes de la desecación y el peso de los envases con las semillas después de la desecación.

Las semillas se secaron durante 17 h a 103 ± 2 °C y se enfriaron en un desecador antes de pesar.

2.1.1.4. CALIDAD GERMINATIVA INICIAL DE LOS LOTES.

Se pusieron a germinar cuatro repeticiones de 100 semillas por Lote sobre papel de filtro. A los seis y doce días se contaron las semillas y se determinó el porcentaje de germinación. Se hidrató el papel de filtro con 40 ml de agua desionizada. Las semillas fueron puestas a germinar a 20° C en oscuridad durante doce días. Las semillas germinadas entre el conteo al sexto y doceavo día se consideran como semillas latentes.

2.1.2. MUESTREO

A la recepción de los Lotes anteriormente citados, se limpiaron las semillas. Para ello, se utilizaron tamices de malla de 1,40 y 2,80 mm.

Después de la limpieza, los Lotes han sido divididos en 4 sublotes mediante un divisor de muestra porcentual (SEED PROCESSING HOLLAND NV: SERIE 21537). Este divisor permite partir las muestras en 4 fracciones homogéneas en las proporciones siguientes: 10, 20, 30 y 40 %.

La fracción de 10 % se partió en dos muestras de igual tamaño mediante un divisor. Esas dos muestras son las dos muestras de trabajo utilizadas en los restantes ensayos.

2.1.3. ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Todos los ensayos de germinación fueron realizados en las mismas condiciones. Las semillas se colocan sobre papel de filtro humedecido con cuadrículas numeradas en cajas de metacrilato transparente. Se pusieron a germinar 100 semillas por caja. Se añadió 40 ml de agua desionizada. Las cajas de germinación se colocaron en germinadores termostatizados SELECTA (mod. Hotcold-GL) programados a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, en oscuridad.

A los dos días se controlaba el nivel de humedad del papel de filtro y se rehumedecía ligeramente el papel filtro cuando resultaba ser necesario.

El seguimiento fue diario y durante doce días. A medida que iban germinando las semillas, se anotaban y quitaban del ensayo.

Se considera que una semilla había germinado cuando la radícula alcanzaba una longitud mayor de 5 mm.

2.2. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS

Los sistemas de acondicionamiento se apoyan en el nivel de hidratación de las semillas. Se intenta alcanzar un nivel de hidratación suficiente elevado en la semilla durante un periodo que permita iniciar los procesos de reparación celular antes de que se produzca la germinación. Para ello, existe multitud de sistemas y procesos con más o menos éxito en función de la especie o del Lote de semillas. Los métodos que se usan en los subsiguientes experimentos ya fueron analizados por varios autores (TARQUIS, 1990; GIMÉNEZ-SAMPAIO, 1992; BANDEIRA, 1995).

2.2.1. ACONDICIONAMIENTO HÍDRICO

Se ha practicado un sistema de imbibición parcial sometiendo las semillas a un caudal de agua de baja intensidad ($\leq 3\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). La Fig. 3. muestra el sistema de imbibición utilizado en los ensayos. La circulación de agua se realizó en circuito cerrado, renovando el agua después de 0,5, 1, 2 y 4 h con el fin de evitar posibles infecciones durante la hidratación y permitir la reoxigenación del agua. El ensayo se ha realizado a temperatura ambiente.

Las semillas fueron introducidas en un bote de polietileno perforado por el fondo y conectado a una bomba de agua por el tapón. Este método no permite el control del grado de imbibición de las semillas. El nivel de hidratación solo puede ser controlado mediante el ajuste del tiempo de imbibición. Para ello, se pusieron a germinar las semillas directamente después del tratamiento de pre-hidratación sin desecación previa. Los periodos de imbibición son de 30 min., 1, 2, 4, 8, 12 y finalmente 24 h. El ensayo de germinación fue realizado según las Normas de la ISTA (1993), a 20°C sobre papel de filtro, en oscuridad en cajas de metacrilato transparente. Por cada periodo de hidratación se realizó una única repetición de cien semillas.

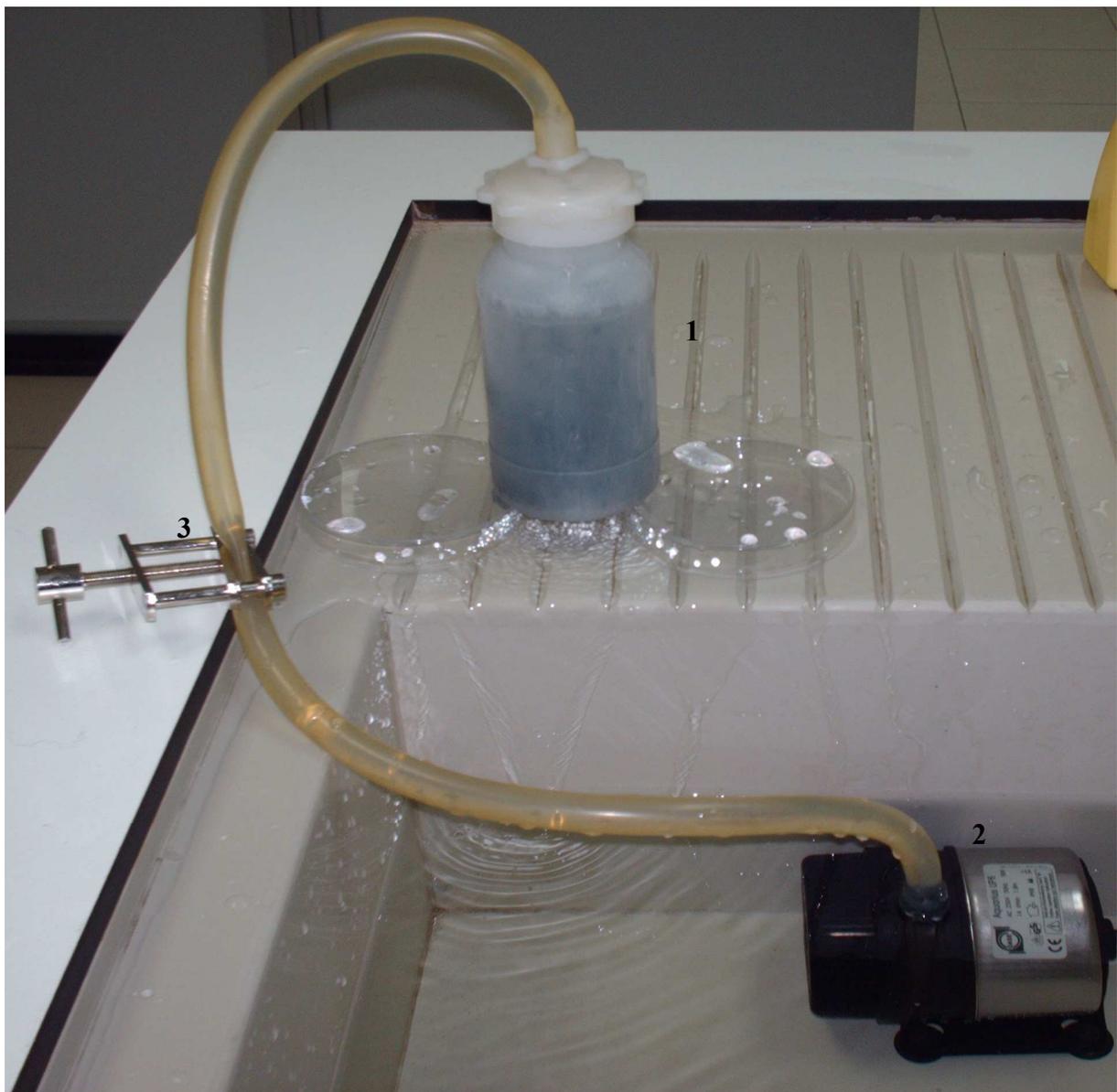


Fig. 3. Sistema de acondicionamiento hídrico en circuito cerrado: 1, recipiente perforado en el cual se introducen las semillas con un caudal circulante de agua; 2, bomba de circulación y 3, sistema de regulación de la circulación de agua.

2.2.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO

El osmoacondicionamiento constituye una de las técnicas de pre-tratamiento más frecuentemente utilizada de semillas dirigido a estimular los procesos metabólicos de germinación. Consiste en realizar una hidratación de las semillas en condiciones controladas, exponiéndolas para ello a una solución acuosa con un potencial osmótico conocido, tal que impida su germinación durante el tratamiento.

Este ensayo se desarrolló con el siguiente objetivo: comparar el efecto del osmoacondicionamiento a base de nitrato potásico (KNO_3), polietilenglicol (PEG-6000) y agua desionizada durante tres periodos, en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 frente a semillas del mismo Lote no tratadas, comparando el porcentaje de germinación acumulado y los índices de germinación: velocidad de germinación, coeficiente de uniformidad, T_{25} y T_{50} e índice de Timpson.

Las semillas que fueron sometidas al acondicionamiento osmótico son las semillas correspondiendo a la fracción de semillas más pesadas del Lote 1 ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) representando el 30 % en peso del Lote 1. Se usaron esas semillas por su mayor viabilidad en comparación con el Lote 1 entero.

Para el desarrollo del ensayo se utilizó la técnica a partir de un sistema de pre-acondicionamiento osmótico en laboratorio, compuesto por varios recipientes porta-semillas, una bomba de presión y tuberías para circulación y distribución del aire, tal como se indica en la Fig. 4.

Se realizaron tres disoluciones de 150, 250 y 350 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de PEG-6000 correspondiendo respectivamente, según MICHEL y KAUFMANN (1973), a potenciales osmóticos de -3,0, -7,5 y -13,9 MPa, a la temperatura de 24 °C y dos disoluciones de KNO_3 de 0,1 y 0,3 M.

En cada tratamiento de acondicionamiento osmótico, se usaron 200 ml de disolución en las que se añadió 8 g de la fracción de semillas pesadas del Lote 1 durante tres periodos de 24, 48 y 96 h, en la oscuridad, a temperatura ambiente (24 ± 2 °C).

El dispositivo está organizado de tal forma (Fig. 4.): se hizo un enlace con un tubo de silicona de 4 mm de diámetro interno desde una bomba de aire hasta un sistema de conexiones múltiples de seis salidas distribuidores de aire acoladas a otros tubos de silicona haciendo la conexión con los recipientes porta-semillas. Para facilitar la distribución del aire con el consecuente movimiento de las semillas, el recipiente porta-semillas es de fondo cóncavo y el aire se dirige hacia el centro de la solución mediante micropipetas Pasteur de 230 mm. El flujo está controlado por un temporizador. Se airean las disoluciones a razón de media hora por hora.

Concluido el proceso del acondicionamiento osmótico se procedió al secado de las semillas para devolverlas al contenido de humedad recomendado del 5 %. El secado de las semillas se realizó mediante una estufa con circulación de aire forzado a 30 °C durante 48 h.

Después del desecado, se realizaron ensayos de germinación con cuatro repeticiones de cincuenta semillas con conteos diarios según se ha sido previamente descrito en el Capítulo 2.1.3.



Fig. 4. Sistema de acondicionamiento osmótico: 1, bomba de aire; 2, sistema de conexiones múltiples; 3, temporizador, 4, recipientes cóncavos de acondicionamiento osmótico y 5, micropipeta pastor por donde llega el aire en el medio de acondicionamiento.

2.2.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO

Utilizando el principio del acondicionamiento mátrico, se buscó la mejor combinación semilla: matriz: agua. La matriz utilizada ha sido Algalita[®], un material finamente pulverizado procedente de la industria de extracción del agar.

Se buscó la proporción en volumen de la matriz para que esa misma recubra totalmente las semillas tratadas y luego se les añadió agua desionizada por pequeñas cantidades, hasta el límite de una consistencia pastosa de la matriz.

Las semillas que fueron sometidas al acondicionamiento mátrico son las semillas correspondiendo a diferentes fracciones del Lote 1 separado por corriente de aire: 1, una fracción de semillas ligeras ($P_{100} = 0,31 \pm 0,04$ g) y 2, a la fracciones de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g). La fracción más pesada representa el 30 % del Lote 1. Se usaron esas semillas por su mayor viabilidad frente al Lote 1 entero. La fracción de semillas pesadas contiene la mayor parte de las semillas viables y maduras del Lote 1.

La proporción de agua utilizada en el sistema se modificó con objeto de observar el comportamiento de las semillas y de la matriz frente a cantidades variables de líquido. Las proporciones en volumen semilla: matriz: agua más aptas al acondicionamiento, es decir en las que la matriz recubra bien las semillas y no llegue a formar una pasta al hidratarla fueron de 1:10:1, 1:10:1,5 y 1:10:2.

Cada combinación ha sido colocada en recipientes herméticos de plástico de volumen bastante mayor al volumen ocupado por la matriz con el fin de permitir la oxigenación de las semillas. Los recipientes fueron colocados en un bombo durante 24 h para conseguir una buena homogeneidad de las mezclas. Después, se conservaron a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) en oscuridad.

De cada mezcla se tomaron muestras de semillas después de 2, 6 y 18 días y se pusieron a germinar por cada muestra cuatro repeticiones de cincuenta semillas según se describe en el Capítulo 2.1.3. Se tomaron las tasas de germinación a los 6 y 12 días después de haber iniciado la incubación.

2.3. TRATAMIENTO HORMONAL

Las semillas del Lote 1 fueron tratadas con diferentes concentraciones de GA₃ (BERELEX[®]). Se realizó el tratamiento por imbibición del papel de filtro del ensayo de germinación con las disoluciones de GA₃.

Las hojas de papel de filtro son hojas cuadrículadas con 100 casillas en las que se colocan las semillas. Cada hoja de papel de filtro se coloca dentro de una caja de metacrilato transparente con tapa hermética adaptada al tamaño de la hoja de papel de filtro.

Se realizaron disoluciones de 5, 10 25, 50 y 100 mg·L⁻¹ de GA₃. Se realizaron dos repeticiones de 100 semillas por concentración. Cada hoja de papel de filtro fue imbibida con 40 ml de la disolución correspondiente.

La germinación se realizó a 20 °C en la oscuridad tal como se describe en el Capítulo 2.1.3. Se realizaron conteos diarios de germinación.

2.4. DESINFECCIÓN QUÍMICA

Para la desinfección química, se utilizó el hipoclorito de sodio a la concentración de 4 %. La técnica de desinfección se combinó con un tratamiento de pre-imbibición. El sistema de pre-imbibición está descrito en el Capítulo 2.1.3. Las semillas fueron prehidratadas durante un periodo de 4 h.

Después de la prehidratación, las semillas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito sódico durante 4 min. para realizar la desinfección. Después de eso, se limpiaron las semillas con agua durante un minuto y se sembraron sobre papel de filtro en cajas de metacrilato. Las condiciones del ensayo de germinación están descritas en el Capítulo 2.1.3.

Para cada ensayo, se trataron y sembraron dos repeticiones de cien semillas.

2.5. SEPARACIÓN DE SEMILLAS

La separación densimétrica de las semillas se realizó utilizando un separador por corriente de aire (Fig. 5). El separador está compuesto por una columna de vidrio vertical en la cual se pueden recoger 4 muestras a diferentes alturas a las que corresponden fracciones de diferentes densidades. Por debajo de la columna se coloca un soplador de aire eléctrico cuyo caudal se puede regular.

La velocidad del caudal de aire se puede regular según una escala arbitraria que varía entre 0 y 100, siendo 100 la menor velocidad y 0 la mayor.

Con el fin de obtener fracciones de semillas de tamaño y peso diferentes, se realizaron tres separaciones con corrientes de aire de 75, 80 y 85 en la escala arbitraria con la misma muestra de semillas de 31 g de semillas del Lote 1. De cada fracción obtenida se determinó el peso medio de cien semillas con una precisión de 0,0001 g a partir de cuatro repeticiones de cien semillas en casos que la cantidad de semillas era suficiente. También se midió el peso total de cada fracción.

Al final, se eligió la separación que permitió la repartición más equilibrada de semillas para realizar ensayos de germinación. La separación más efectiva fue la de la corriente de aire de una intensidad de 85 en la escala arbitraria. De cada fracción de esa separación, se pusieron a germinar cuatro repeticiones de cien semillas según se describe en Capítulo 2.1.3. Se realizaron conteos diarios de germinación.

También se realizó un ensayo de germinación tratando cada fracción de semillas GA₃. Se usó el mismo método de tratamiento hormonal que en el Capítulo 2.1.3. La concentración de la disolución de GA₃ era de 10 mg·L⁻¹, concentración con la cual mejores resultados se han obtenido con el primer ensayo con GA₃.

Las semillas fueron sembradas sobre papel de filtro imbibido con 40 ml de la disolución de GA₃ en caja de metacrilato transparente. Para cada fracción, se realizaron cuatro repeticiones de cien semillas. Las condiciones de germinación siguen las pautas según se describe en el Capítulo 2.1.3. Los conteos de germinación eran diarios.

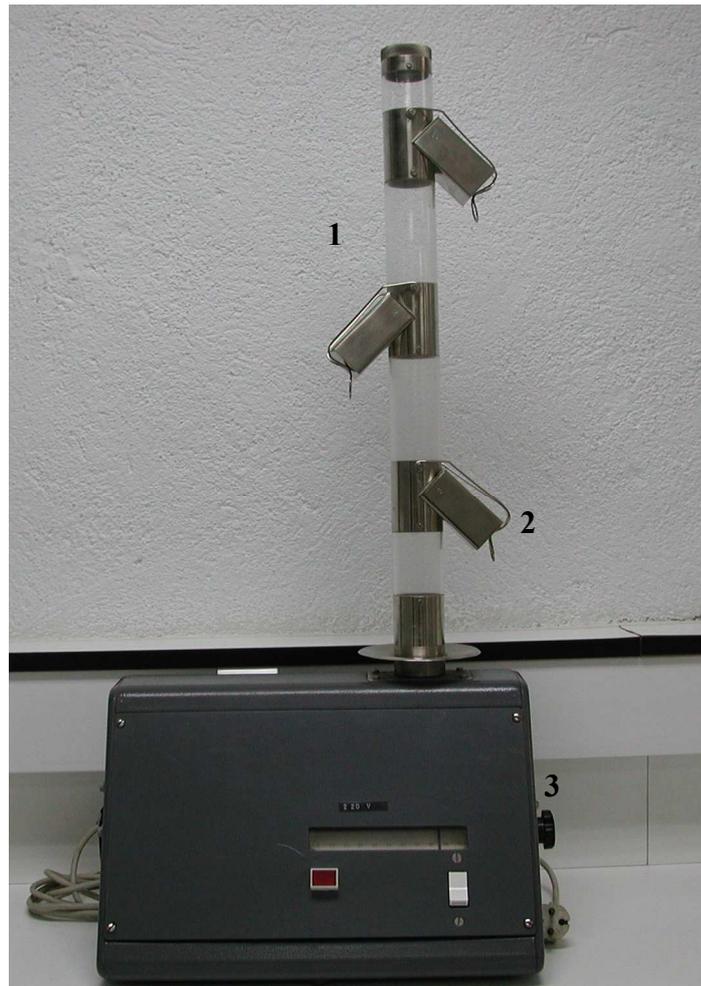


Fig. 5. Separador de semillas por corriente de aire: 1, columna de vidrio; 2, colector de muestras y 3, generador de la corriente de aire.

2.6. ENSAYO TOPOGRÁFICO AL TETRAZOLIO

El ensayo topográfico puede ser de una gran ayuda en el análisis y en la mejora de semillas. En efecto, La mejora de semillas tiene sus limitaciones. Gracias al análisis al TZ, se puede conseguir una idea del potencial de mejora de un Lote y también determinar la presencia de algún deterioro irreversible de las semillas. Con ese objetivo se realizó este ensayo

Al observar la disminución de germinación de los Lotes de semillas con los que se trabajaba, era oportuno analizar la viabilidad de las semillas. Analizar al TZ permitió medir de manera indirecta el vigor. Por lo tanto, se decidió realizar este ensayo. Se realizaron cuatro repeticiones de cincuenta semillas para cada Lote.

2.6.1.1. PREACONDICIONAMIENTO

Algunas semillas pueden sumergirse directamente en agua para su humidificación. Sin embargo, un proceso de humidificación lento es más aconsejable, sobre todo en semillas deterioradas o envejecidas con el fin de evitar un aumento de su deterioro. La humidificación lenta puede realizarse sobre o entre papel de filtro humedecido, de tal forma que no se forme ninguna película de agua sobre la superficie entera de las semillas.

En el caso de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) se aconseja un proceso de humidificación lento. Las semillas han sido hidratadas en oscuridad a 20 °C sobre papel de filtro, en cajas Petri durante un periodo de 18 h, lo que proporciona a las semillas un aumento de tamaño, el reblandecimiento de las cubiertas seminales y la activación de los procesos biológicos de germinación que serán útiles en las etapas subsiguientes.

2.6.1.2. PREPARACIÓN PARA LA TINCIÓN

Para las semillas de una especie dada, el método de preparación más adecuado depende del tamaño, de la forma de la semilla, la textura de la cubierta seminal, la localización, el tamaño y la forma del embrión y otras características de la semilla. Frecuentemente se pueden usar diversos métodos con idénticos resultados.

En la cebolla (*Allium cepa* L.), la cubierta tiene un actitud parcialmente permeable a las sales de tetrazolio (BERESNIEWICZ *et al.*, 1995) y se requiere realizar unos cortes cuando se realiza el ensayo al TZ.

Para facilitar la imbibición de todas las células vivas por la solución de tetrazolio, se realizaron cortes en las semillas tomando en cuenta que en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), el tejido nutritivo está vivo y hay que, mediante tinción al TZ, medir también su viabilidad. Por lo tanto, hay que cuidar mucho los cortes realizados en cada semilla para no dañar las células que se van a evaluar. Los cortes en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) tienen cierto grado de dificultad por el tamaño de las semillas, la localización y conformación del embrión en la semilla.

Según el Manual de Ensayos al Tetrazolio (INSPV, 1987), los cortes que se realizan en las semillas del género *Allium*. son (Fig. 6.):

- Cortar las semillas longitudinalmente, en su totalidad y casi completamente en las proximidades de la superficie plana y paralelamente a la misma.
- Cortar las semillas lateralmente, en toda su profundidad desde el centro de la semilla hacia afuera, hasta la zona situada entre la radícula y los cotiledones.
- Eliminar o separar casi completamente los dos extremos de la semilla, sin dañar la radícula o los cotiledones.

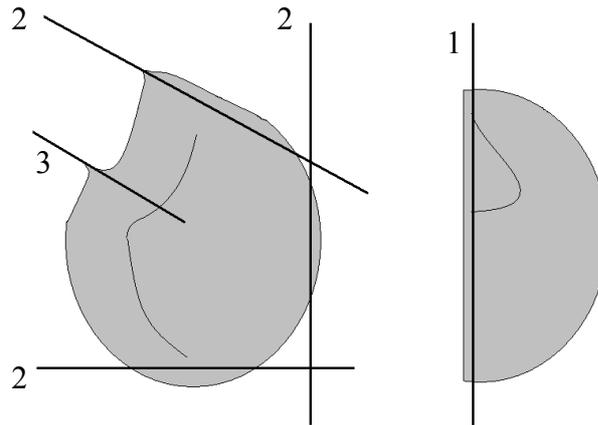


Fig. 6. Esquema de los cortes realizados para preparar las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) a la tinción al TZ: 1, corte longitudinal, en su totalidad y casi completamente en las proximidades de la superficie plana; 2, corte de los extremos de la semilla, sin dañar la radícula o los cotiledones y 3, corte lateral, en toda su profundidad desde el centro de la semilla hacia afuera, hasta la zona situada entre la radícula y los cotiledones.

2.6.1.3. TINCIÓN

Las muestras de semillas preparadas adecuadamente deben recubrirse completamente con la solución de análisis. Las semillas han sido colocadas en cajas Petri sobre papel filtro remojado por una disolución de TZ al 1 % en oscuridad. La disolución de TZ cubre enteramente las semillas. Las semillas deben teñirse en oscuridad o con luz suave. Una exposición a la luz fuerte debilita la solución de tetrazolio dando una coloración anormal de los tejidos.

El tiempo que se requiere para producir una tinción aceptable depende del tipo de semilla, del método de preparación, de la sanidad y vigor de la semilla, de la concentración de la solución de análisis y especialmente de la temperatura. Las temperaturas de tinción pueden variar de 20 a 40 °C. De forma general, se considera que un incremento de temperatura de 5 °C reduce a la mitad el tiempo de tinción.

Cualquier grado de tinción que permita distinguir la sanidad, debilidad crítica y los tejidos muertos es adecuado. Por esta razón, el tiempo de tinción puede variar considerablemente, sin tener influencia adversa en la precisión de la evaluación. Un periodo excesivo de tinción puede dar como resultado deterioro y evaluación errónea de los tejidos analizados.

En el caso de los dos Lotes de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), las semillas se encuentran muy debilitadas. El tiempo de tinción recomendado para el genero *Allium* varía de 6 a 24 h a 30 °C. Los preensayos determinaron que el tiempo necesario para una tinción adecuada de las semillas debía ser de 18 h a 30 °C.

El problema de un periodo tan largo de tinción es la aparición de alteraciones. La disolución apareció rojiza. Las posibles causas han podido ser estas: 1, presencia de semillas muertas, viejas, alteradas por el calor, deficientes en algunos elementos secundarios, dañadas por heladas entre otras causas; 2, colocación de las semillas antes que los tejidos estén suficientemente humedecidos y 3, duración de tinción demasiado larga, con la consecuencia de un deterioro excesivo de las semillas y un incremento de exudados y microorganismos. En el caso las semillas que nos ocupan, la causa más probable de las citadas alteraciones parece ser la primera, y en parte la segunda por el largo periodo de tinción elegido.

2.6.1.4. PREPARACIÓN PARA LA EVALUACIÓN

Los tipos de preparación necesarios para la evaluación de las semillas dependen de las técnicas de preparación previas a la tinción. Cualquier método sencillo y rápido para exponer las estructuras esenciales de las semillas puede ser satisfactorio. Conocer minuciosamente la estructura de la semilla revela ser la mejor ayuda para realizar los cortes que expondrán los tejidos más importantes de la semilla.

Para el género *Allium*, se aconsejan dos métodos para exponer las estructuras que se analizarán:

- Exponer el embrión y el tejido nutritivo adyacente rasgando el tejido nutritivo o separando las superficies de corte lo suficiente para poner de manifiesto las estructuras citadas.
- Exponer el embrión y el tejido nutritivo efectuando cortes de poco espesor.

El segundo método se revela más sencillo y práctico. Conociendo la configuración interna de la semilla de cebolla (*Allium cepa* L.), con un corte longitudinal descentrado se puede exponer el embrión entero y el tejido nutritivo.

2.6.1.5. EVALUACIÓN

La evaluación de cada semilla está basada en muchos factores, a saber: turgencia y aspecto general de los tejidos, fracturas, tejidos sin embrión, daños causados por insectos, anomalías y otros que puedan debilitar a la semilla o hacerla no viable (INSPV, 1987).

Debe establecerse la capacidad funcional de cada estructura esencial del embrión, junto con las otras estructuras interdependientes. El tamaño, la localización y naturaleza de los daños y otros defectos en/o entre las estructuras, son factores decisivos para determinar si las semillas serán capaces de producir una plántula normal.

El tejido sano y vivo tiende a teñirse de forma gradual y uniforme desde las superficies externas hacia el interior de la semilla. Los cambios en la intensidad de color son graduales y sin límites nítidos. Dentro de los tejidos, el color rojo es brillante y lustroso, especialmente si no están excesivamente teñidos.

La tinción de un tejido débil pero viable fluctúa en función del grado de deterioro desde el casi totalmente sano hasta un límite más o menos nítido, con tejidos teñidos débiles y no-viables, o con tejidos muertos no teñidos. La tinción y las características del tejido débil varían también con la naturaleza y extensión del deterioro. Los extremos apicales, coleóptilos y radículas tienden a manifestar antes los síntomas del deterioro que otras zonas de las superficies cortadas.

De los tejidos no teñidos y muertos surgen dudas acerca de si los tejidos no teñidos son viables, pero se tiñen lentamente, o si son tejidos muertos. Los tejidos muertos generalmente son flácidos, borrosos, con aspecto de tiza blanca, o grisáceos-blancos sin brillo los tejidos muertos adyacentes a los tejidos viables generalmente están separados por un límite nítido.

Un factor de interés es el reconocimiento y evaluación de cada estructura esencial del embrión, junto con las otras estructuras interdependientes. El tamaño, localización y naturaleza de los daños y otros defectos en o entre las estructuras son factores decisivos para determinar el nivel de viabilidad. El establecimiento de una escala objetiva de viabilidad es una herramienta imprescindible para el éxito de la evaluación. El análisis de semillas de alta calidad, deterioradas de manera controlada, es el mejor método para realizar una escala de viabilidad precisa.

La estructura interna de la semilla madura de la cebolla (*Allium cepa* L.) se representa en la Fig. 7. El embrión está curvado dentro de la semilla y consta de una raíz corta situada debajo de ápice caulinar, que se localiza junto con el primordio de la primera hoja, en la base de una hendidura en el extremo inferior del cotiledón. El cotiledón constituye la mayor parte del embrión. En el extremo del cotiledón, incluido en el endospermo circundante, se encuentra un engrosamiento denominado haustorio, rodeado por el endospermo de pared gruesa. Durante la germinación, el haustorio absorbe los nutrientes del endospermo y los transfiere al cotiledón en crecimiento (BREWSTER, 2001).

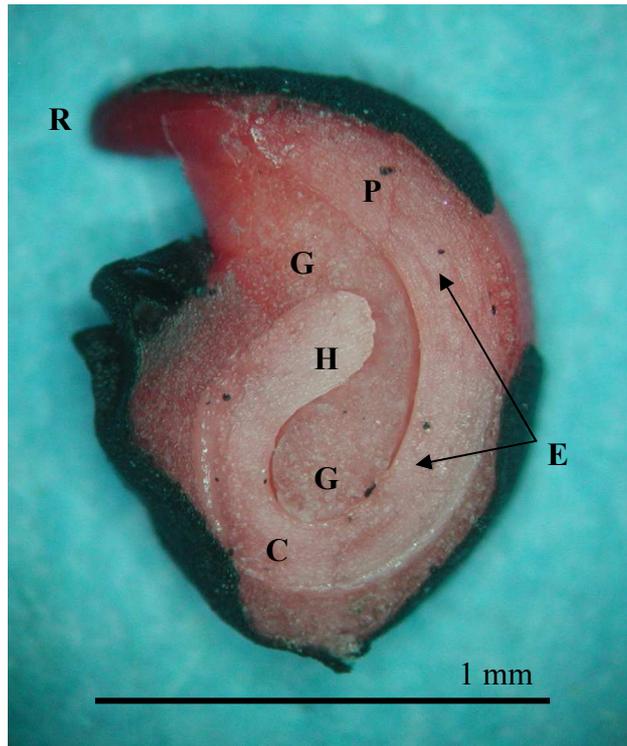


Fig. 7. Sección longitudinal de una semilla madura de cebolla (*Allium cepa* L.) teñida al tetrazolio. El embrión (E) consta de una radícula (R), un hipocotilo con el ápice caulinar (P), un cotiledón (C) que termina por un engrosamiento llamado haustorio (H) que, durante el proceso de germinación, se nutre del tejido nutritivo de pared gruesa (G). Según BREWSTER (2001).

A los efectos del presente trabajo se ha determinado una escala des tres niveles:

1. **Viable.** Tinción roja del embrión y del tejido nutritivo. Embrión desarrollado (Fig. 8.).
2. **Débil** pero viable (Fig. 9). Semillas de tinción rosa, a veces con manchas blancas en el embrión y en el tejido nutritivo. El embrión está maduro (más de 50 % del cotiledón).
3. **No viable** (semilla muerta, muy débil o de maduración insuficiente). Semillas de un Lote con una tasa de germinación del 86 % sirvieron como referencia para medir la viabilidad de las semillas. Pre-ensayos de viabilidad han sido realizados para determinar la escala de referencia de la viabilidad de cada semilla (Fig. 10.).

Los pre-ensayos de viabilidad dieron mucha variabilidad en el grado de madurez de las semillas de ambas variedades. Por lo tanto, la creación de una escala de madurez de las semillas es de una gran ayuda para determinar las causas de no germinación de las semillas así como el potencial de mejora de la germinación y vigor de las semillas. La escala de madurez es la siguiente (Fig. 10):

1. Embrión y tejido nutritivo maduros: presencia de todas las estructuras esenciales del embrión y de los tejidos. El cotiledón tiene más del cincuenta por ciento del tamaño de un cotiledón totalmente desarrollado. Presencia del haustorio. La semilla es viable y mejorable.
2. Tejido nutritivo maduro, hace falta más de la mitad del cotiledón del embrión. Ausencia del haustorio. La semilla no se considera viable.
3. Tejido nutritivo completo, al embrión le hace falta el cotiledón entero y parte de la zona del primordio caulinar. La semilla no es viable;
4. Semilla con la totalidad del tejido nutritivo y ausencia del embrión. No viable ni mejorable;
5. Semilla blanda con poco tejido nutritivo. Ausencia de embrión. Tejidos internos deteriorados por microorganismos. Semilla no viable ni mejorable.

A la misma fecha del ensayo de viabilidad al tetrazolio, se realizó un ensayo de germinación con cuatro repeticiones de cien semillas para ambos Lotes según las normas de la ISTA (1993).

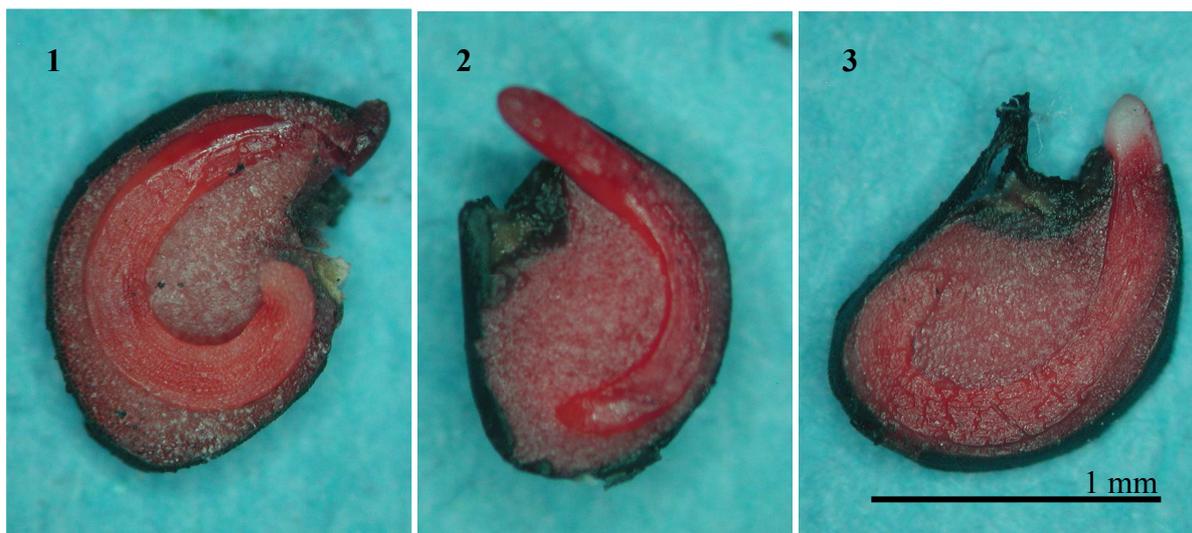


Fig. 8. Semillas viables de cebolla (*Allium cepa* L.) de buena calidad. El tejido nutritivo y el embrión están teñidos por el TZ. Los embriones han alcanzado el estado de madurez final. El proceso de germinación *sensu stricto* ha empezado.

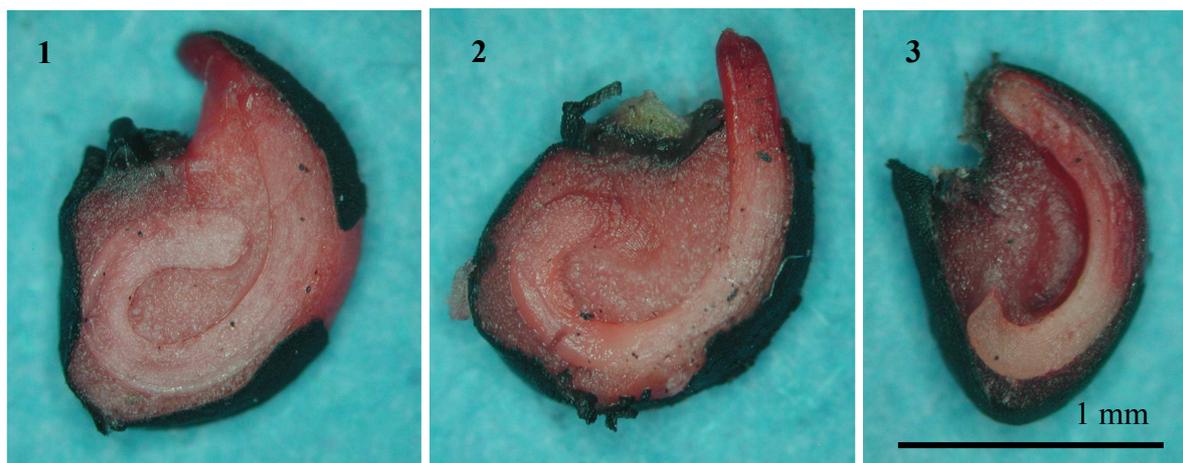


Fig. 9. Semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) viables pero débiles. El color rosado y blanquecino indica que los tejidos están deteriorados. Se nota que la radícula ha iniciado el proceso de germinación. La semilla nº3 tiene el cotiledón inmaduro pero se considera viable por tener más del 50 % del tamaño de un cotiledón maduro.

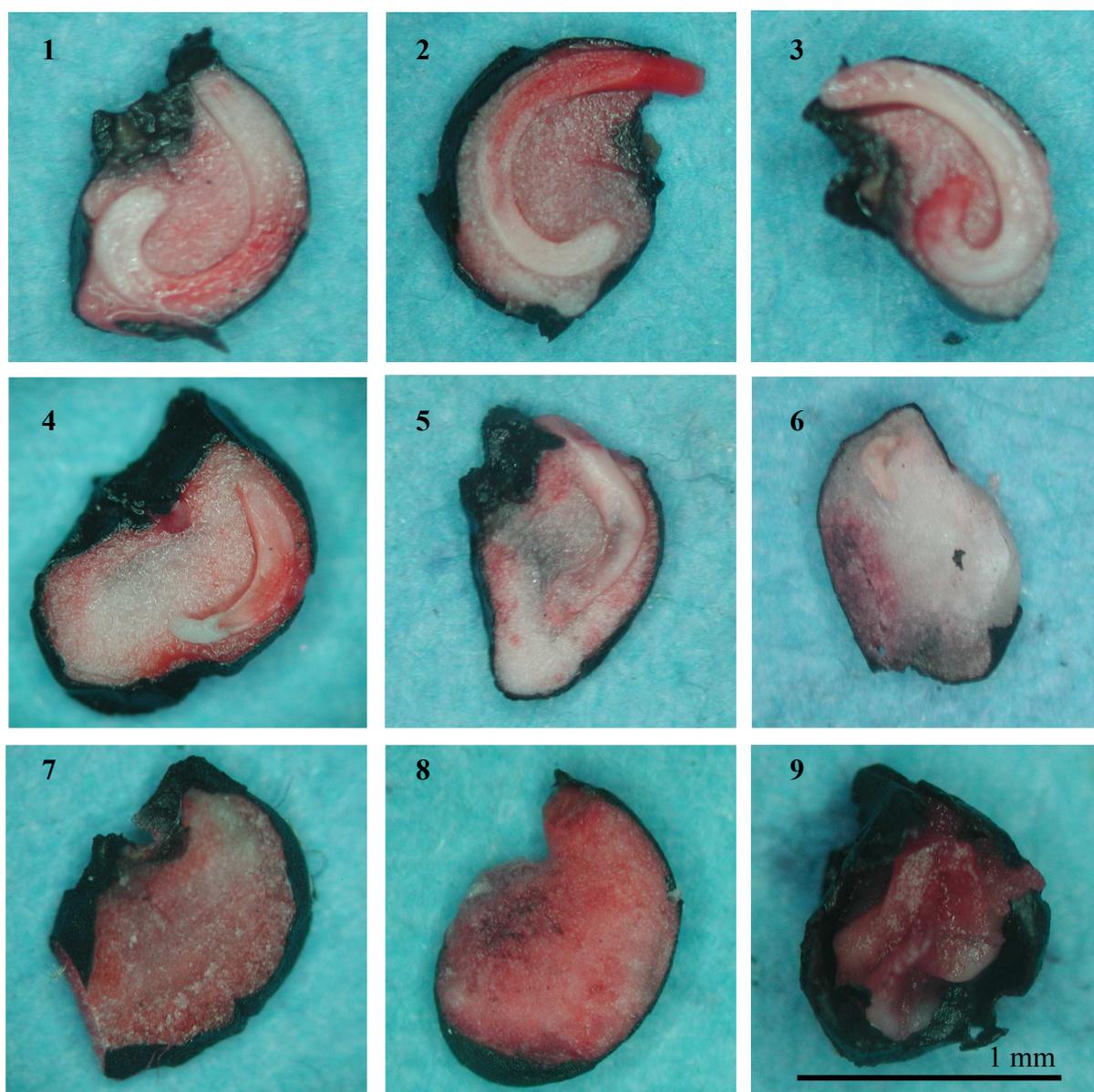


Fig. 10. Semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) no viables: 1, 2 y 3. Semillas maduras pero no viables. El tejido nutritivo, de color rosado o blanco está muy deteriorado. Más del cincuenta por ciento del embrión no está teñido por el tetrazolio. La raíz ha iniciado el proceso de germinación pero el cotiledón está muerto; 4, 5 y 6, semillas inmaduras y no viables; 4, los tejidos de la semilla están vivos pero débiles, el embrión no ha alcanzado su nivel máximo de madurez, el cotiledón no se ha desarrollado y está muerto aunque las zonas de la raíz y del primordio caulinar siguen vivas; 5, semilla muerta con el embrión semi-abortado, se nota el límite nítido entre el tejido muerto y el tejido viable del embrión. El cotiledón no se ha desarrollado. Las zonas rojizas situadas se deben al ataque por microorganismos; 6, semilla muerta con embrión abortado, solo se ha desarrollado el ápex de la radícula; 7, 8 y 9, semillas sin embrión pero con tejido nutritivo o; 9, semilla blanda, deteriorada por los microorganismos. Su tejido nutritivo y su tegumento están inmaduros y muy deteriorados por los microorganismos, responsables de la tinción roja de toda la semilla y de la cubierta.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de comprobar si existen diferencias significativas entre ensayos en relación a la germinación, se utilizó la Prueba Z:

$$Z = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{pq \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad [6]$$

La Tabla 1. Es un ejemplo de las comparaciones entre dos ensayos de germinación utilizando la Prueba Z para detectar diferencias significativas.

Tabla 1. Test de comparación de las tasas de germinación de semillas cebolla (*Allium cepa* L.) entre dos ensayos de germinación con la Prueba Z.

PRUEBA Z ENTRE DOS ENSAYOS (E _i)			
ENSAYO (i)	E ₁	E ₂	E ₁ + E ₂
SEMBRADAS (n)	400	400	800
GERMINADAS (a)	219	229	448
PROBABILIDAD (p)	0,55	0,57	0,56
PROBABILIDAD (q)	0,45	0,43	0,44
PROBABILIDAD (p+q)	1,00	1,00	1,00
PRUEBA Z	0,71		
SIGNIFICACIÓN (%)	5		
DIFERENCIA	NO SIGNIFICATIVA		

donde:

- E₁: Semillas de cebolla procedente del Lote 1.
- E₂: Semillas de cebolla procedente del Lote 2.
- n_i: Número de semillas puestas a germinar.
- p_i: Probabilidad de germinación de la muestra i (p_i = a_i/n_i) siendo a_i las semillas germinadas para la muestra i.
- q_i: Probabilidad (q_i = 1-p_i).
- p, q: Probabilidad de la suma de muestras.

El modelo matemático planteado para los ensayos de laboratorio responde al diseño experimental al azar cuyo modelo matemático se ajusta a un modelo jerárquico simple:

$$X_{ij} = \mu + A_i + \epsilon_{ij} \quad [7]$$

donde:

X_{ij} : Variable estudiada.

μ : Media general del ensayo.

A_i : Efecto debido al factor principal A.

ϵ_{ij} : Error experimental.

Los trabajos analizados en el laboratorio mediante este modelo matemático 1, tratamiento con ácido giberélico (factor: concentración en GA_3); 2, ensayo de germinación después de separación por corriente de aire (factor: fracción de semillas) y 3, pre-enfriamiento (factor: tratamiento con frío).

Para estudiar el efecto de dos factores, se utilizó un modelo matemático tipo factorial con dos factores y enteramente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ij} \quad [8]$$

donde:

Y_{ij} : Parámetros estudiados.

μ : Media general del ensayo.

A_i y B_j : Efecto debido a los factores principales A y B.

AB_{ij} : Efecto debido a la interacción entre dos factores.

ϵ_{ij} : Error experimental.

Se utilizó el modelo matemático con dos factores para los subsiguientes ensayos: 1, separación de semillas combinada a un tratamiento con GA_3 (factores: fracción de semillas y concentración GA_3); 2, acondicionamiento osmótico (factores: duración y medio de acondicionamiento) y 3, acondicionamiento mátrico (factores: duración y proporción semilla: matriz: agua)

Las variables analizadas en los experimentos fueron: 1, tiempo medio para el 25 % de germinación; 2, velocidad de germinación (días^{-1}); 3, índice de Timpson y 4, coeficiente de uniformidad después de 12 días.

Los datos de laboratorio fueron analizados estadísticamente según los modelos anteriormente presentados, mediante la prueba F de Fisher, eligiendo un nivel de significación del cinco por ciento. A continuación, si existían diferencias significativas para el nivel de significación del cinco por ciento se utilizó el método de la menor diferencia significativa (MDS). Este test permite efectuar comparaciones entre medias de tratamientos diferentes. Siempre que fue necesaria la comparación de medias, la menor diferencia significativa se calculó a partir del test t de Student para el nivel de significación (α). En los ensayos factoriales con dos, cada uno de ellos fue considerado como un factor fijo, por lo que el test de significación fue comparado con el cuadrado medio del error (CM_E).

$$MDS = t_{gle, \alpha} \sqrt{\frac{2CM_E}{n}} \quad [9]$$

donde:

- t: Test de t de Student, para el grado de libertad del error y un nivel de significación definido.
- CM_E : Cuadrado medio del error.
- n: Número de observaciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS DE LAS SEMILLAS

Ambos Lotes son de mala calidad global y germinativa. Los Lotes 1 y 2 tienen una pureza específica de 98 y 97 % respectivamente. Sus contenidos en humedad de 11,6 y 12,4 % respectivamente para los Lotes 1 y 2. Esos valores son muy elevados para un buen almacenamiento y dificultan la conservación de la viabilidad y vigor de las semillas pero se decidió conservarlas con este nivel de humedad (Tabla 2.).

Tabla 2. Resultados del análisis de los Lotes 1 y 2 de cebolla (*Allium cepa* L.)

PORCENTAJE	LOTE	
	1	2
Test de pureza		
Semillas puras	98	97
Otras semillas	0	0
Materia inerte	2	3
Humedad	11,6	12,4
P ₁₀₀ (g)	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,03
Calidad sanitaria	baja	baja

3.1.1. CALIDAD GERMINATIVA

Al nivel germinativo, ambos Lotes se comportan de forma parecida. No se observan diferencias significativas de germinación entre ellos como se puede observar en la Tabla 3. Las diferencias de germinación entre el sexto y doceavo día son de máximo 2 %. Por lo tanto, las semillas no se consideran latentes a esta fecha.

Los dos Lotes no presentan diferencias significativas. Por lo tanto, se decidió realizar los demás ensayos con el Lote 1 y repetir los ensayos con el Lote 2 cuando los ensayos de mejora de semillas dieron resultados satisfactorios.

Del Análisis de germinación de ambos Lotes, además de un porcentaje de germinación bajo, se ha observado una elevada contaminación de la semillas por mohos saprofitos, sobre todo en semillas no germinadas. Desde este punto de vista, es interesante investigar tratamientos que permitan limitar el desarrollo de los microorganismos. Los microorganismos podrían tener un efecto muy negativo en semillas débiles. En la Fig. 11, se observan los tipos mayoritarios de microorganismos que infectaron las semillas de ambos Lotes.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de cuatro repeticiones de los dos Lotes de cebolla (*Allium cepa* L.) a los seis y doce días a 20 °C en oscuridad, sobre papel de filtro. Los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

REPETICIÓN	LOTE 1		LOTE 2	
	DÍA 6	DÍA 12	DÍA 6	DÍA 12
1	51	51	58	58
2	58	60	50	50
3	55	55	57	60
4	53	53	57	61
TOTAL	217^a	219^a	222^a	229^a
MEDIA	54	55	55	57

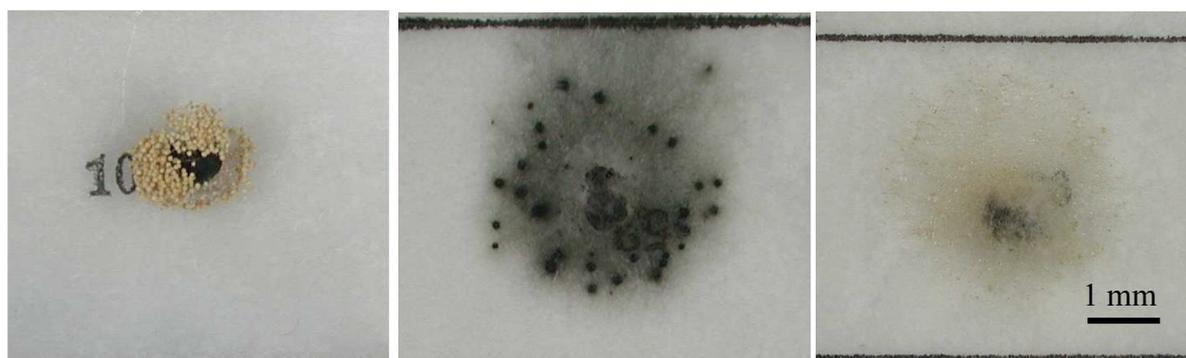


Fig. 11. Semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) no germinadas infectadas por microorganismos. Condiciones de germinación: 20 °C en oscuridad, en cajas de metacrilato sobre papel de filtro húmedo, según las Normas de la ISTA (1993).

Las semillas de ambos Lotes tienen una germinación muy baja y una alta pérdida de poder germinativo durante el almacenamiento. Los Lotes 1 y 2 tienen un contenido en humedad de 11,6 y 12,4 % respectivamente. Este porcentaje en humedad es un porcentaje demasiado elevado para conservar la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento, aún a temperaturas bajas, aún a corto plazo. BREWSTER (2001) recomienda un contenido en humedad de semillas del 5 % para la conservación de Lotes de semillas comerciales de cebolla (*Allium cepa* L.).

3.2. ACONDICIONAMIENTO HÍDRICO

En los dos ensayos de acondicionamiento hídrico, el primero con único factor variable, el periodo de imbibición, y el segundo ensayo re-ensayando con el mejor resultado del primer ensayo combinado a una desinfección química, no se mejoraron suficientemente la germinación y el vigor.

3.2.1. PRE-IMBIBICIÓN

Los resultados de la pre-hidratación de semillas (Tabla 4) no permitieron destacar un periodo de imbibición que mejore la calidad de germinación. El tratamiento de 4 h es el que mejor resultados ha dado, aunque no este significativamente diferente del control.

La Tabla 4 destaca que, por la pre-imbibición de las semillas con este sistema utilizando un caudal de agua para hidratar las semillas, el porcentaje de semillas no germinadas infectadas por microorganismos baja con el tiempo de pre-imbibición. Esto se podría explicar por la limpieza de la cubierta de las semillas de las esporas epifitas efectuada gracias al caudal. El porcentaje de semillas no germinadas infectadas es de 93 %, mientras que después de 24 h de pre-imbibición, ese porcentaje baja hasta llegar a un valor de 14 %.

De esto se puede concluir que, aunque se ha llegado a bajar la contaminación de las semillas por microorganismos, no se ha mejorado la germinación (Tabla 5). Por lo tanto, es posible que los microorganismos influyan poco en la capacidad germinativa de este Lote. El bajo poder germinativo está más relacionado con las cualidades intrínsecas de las semillas que a la contaminación microbiológica de esas mismas.

El periodo de latencia es de 4 días, independientemente de los periodos de pre-imbibición, tal como se puede observar en la Fig. 12.

En la Fig. 12, se nota que aún llegando al día 12, la curva de germinación de las semillas pre-hidratadas durante 4 h no ha llegado a un punto asintótico como pasó en los otros ensayos. Al observar las curvas de germinación, se nota que existen pocas diferencias de germinación entre los diferentes periodos de pre-hidratación.

Los porcentajes de germinación que se observan en la Fig. 13 tienden a subir y luego bajar después del periodo de 4 h. La germinación de las semillas pre-imbibidas durante 8 h tiende a ser baja, por lo cual en este ensayo de germinación puede haber ocurrido un problema durante el proceso de germinación.

Tabla 4. Comparación del porcentaje, de la T_{50} , de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U_{12}) y del índice de Timpson (T_i) de semillas pre-hidratadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1. Condiciones de germinación 20° C en oscuridad en cajas de metacrilato sobre papel filtro húmedo. Los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

TRATAMIENTO (h)	GERMINACIÓN (%)		T_{50} (días)	VG (días ⁻¹)	U_{12}	T_i
	DÍA 6	DÍA 12				
Control	30 ^a	54 ^{ab}	9,5	15	32	342
0,5	27 ^a	50 ^b	12	15,4	33	325
1	25 ^a	53 ^b	10	14,5	30	323
2	31 ^a	58 ^{ab}	8,8	14,8	31	362
4	33 ^a	67 ^a	7,7	14,1	28	395
8	32 ^a	52 ^b	9	15,7	34	344
12	27 ^a	61 ^{ab}	8,3	14,5	28	371
24	30 ^a	57 ^{ab}	8,6	15	31	361

Tabla 5. Porcentaje de semillas no germinadas infectadas por saprofitos por tratamiento de pre-hidratación. Los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

PRE-HIDRATACIÓN (h)	SEMILLAS NO GERMINADAS INFECTADAS POR SAPROFITOS (%)
Control	93 ^a
0,5	54 ^b
1	57 ^b
2	62 ^b
4	45 ^c
8	33 ^{cd}
12	21 ^{de}
24	14 ^e

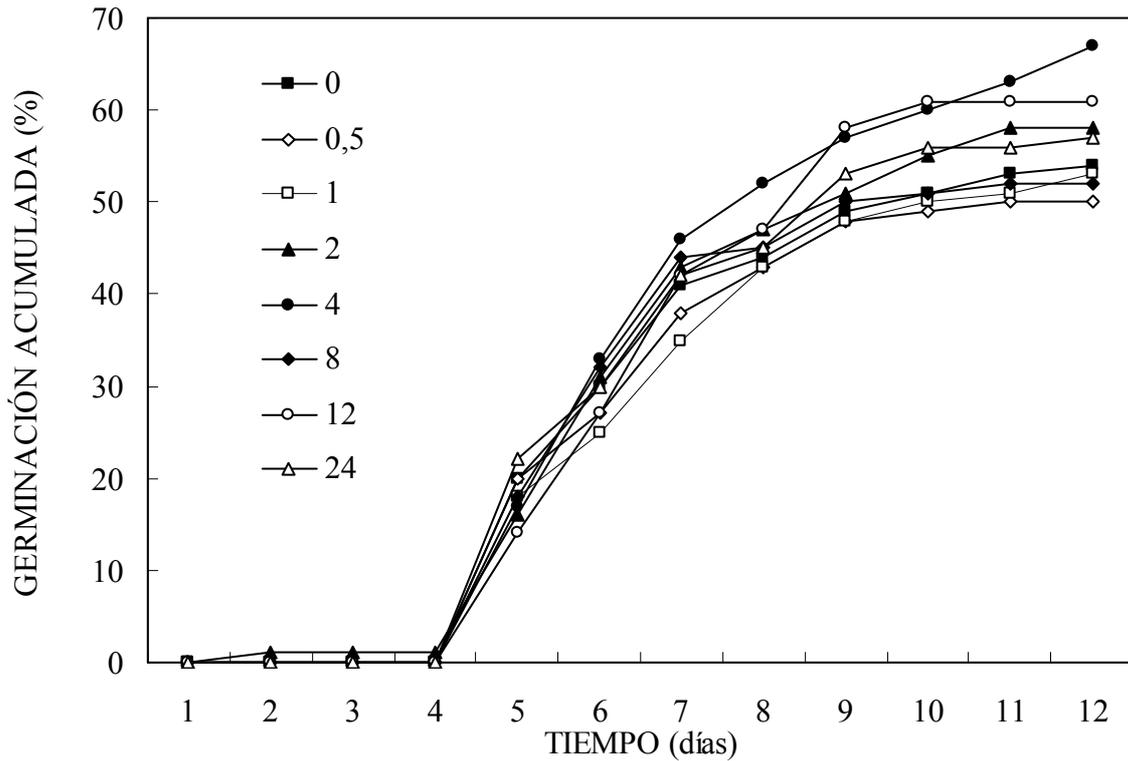


Fig. 12. Curvas de germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1, según el tiempo de pre-hidratación en agua desionizada (h).

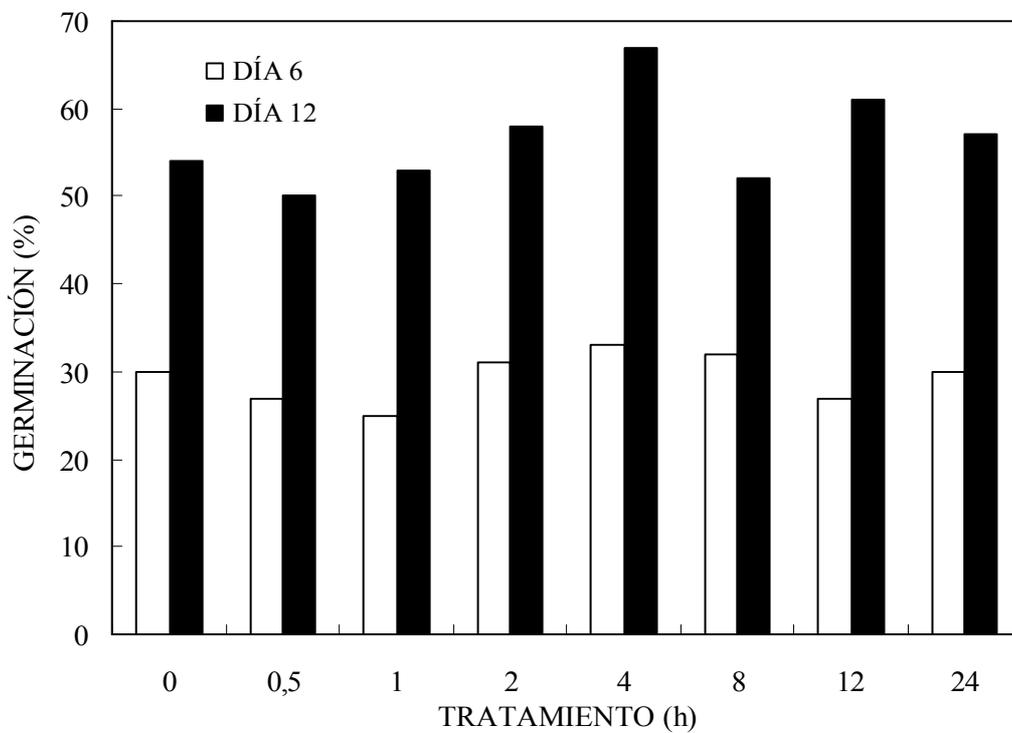


Fig. 13. Porcentaje de germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según el tiempo de pre-hidratación en agua desionizada.

3.2.2. TRATAMIENTOS QUÍMICOS.

El tratamiento con GA₃ se realizó con el objetivo de influir en las semillas no germinadas en la hipótesis de que éstas estén bajo un proceso de dormición fisiológica. El GA₃ también puede influir en el vigor, facilitando y homogeneizando la germinación de las semillas.

La desinfección se llevó a cabo para eliminar los microorganismos que podrían tener un efecto negativo en la germinación de las semillas.

3.2.3. DESINFECCIÓN QUÍMICA

La desinfección con hipoclorito de sodio afectó de modo muy negativo la germinación. La combinación con una pre-hidratación de cuatro horas se realizó con el fin de averiguar el efecto positivo de este tratamiento. Además durante el tratamiento de pre-hidratación, se realiza una limpieza de la cubierta de semillas. Por lo tanto, es posible que esto ayude también a mejorar la calidad sanitaria de las semillas.

En las curvas de germinación (Fig. 14), se nota la superación en vigor y poder germinativo del control frente a cualquier de los tratamientos.

El tratamiento de pre-imbibición bajó de manera significativa el porcentaje de germinación de las semillas (Tabla 6). Esto se puede explicar por un difícil control de la oxigenación de las semillas con el sistema de hidratación utilizado aunque el tiempo de imbibición no era largo.

3.2.4. TRATAMIENTO HORMONAL

De forma general, los tratamientos hormonales con ácido giberélico (GA₃) se usan con el objetivo de eliminar una dormición fisiológica afectando el Lote de semillas. La dormición fisiológica está regulada por la proporción ABA:GA₃ (FINCH-SAVAGE, 2006). Al tratar con GA₃, es este ratio que se desea invertir.

Según ELLIS *et al.* (1985), los tratamientos con GA₃ en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) son poco eficaces. Los tratamientos con GA₃ a una concentración de 75 mg·L⁻¹ dan los peores resultados.

El tratamiento con GA₃ en si no aumentó de manera significativa el porcentaje de germinación del Lote. El tratamiento ha tenido más efecto sobre la uniformidad y velocidad de germinación. Por encima de 50 mg·L⁻¹, el tratamiento hormonal empieza a tener efectos negativos, bajando la tasa de germinación.

El índice de Timpson (Tabla 7) es el índice que más diferencias destaca entre los tratamientos. Permite definir que los efectos más beneficiosos del tratamiento con GA₃ se encuentran a concentraciones situadas entre 10 y 50 mg·L⁻¹. Es con la concentración de 10 mg·L⁻¹ de GA₃ que se ha obtenido el mayor porcentaje de germinación, aunque sin diferencia significativa con el testigo.

En la Fig. 15, se nota en las curvas de germinación que son muy similares entre tratamientos.

La Fig. 16 indica que existen pocas diferencias del porcentaje de germinación a diferentes concentraciones de GA₃. Los porcentajes de germinación aumentan con la concentración en GA₃ de 10 mg·L⁻¹ para luego de nuevo bajar por debajo de la media del testigo con la concentración de 100 mg·L⁻¹. Concentraciones en GA₃ más elevadas que la de 75 mg·L⁻¹ deben tener efectos negativos en la fisiología de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.).

Tabla 6. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, del tiempo medio de germinación de 25 % (T₂₅), de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U₁₂) y del índice de Timpson (T_i) de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1. Desinfección en hipoclorito de sodio 4 % durante 4 minutos. Pre-hidratación en agua destilada durante 4 h. 1, control; 2, semillas desinfectadas; 3, semillas pre-hidratadas y 4, semillas pre-hidratadas y desinfectadas. Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (p ≤ 0,05).

ENSAYO	GERMINACIÓN (%)		T ₂₅ (días)	VG (días ⁻¹)	U ₁₂	T _i
	DÍA 6	DÍA 12				
1	46 ^a	57 ^a	4,5	17,1	42,3	408
2	32 ^b	49,5 ^{ab}	4,9	15,3	36,2	321
3	23,5 ^b	40 ^b	6,2	14,7	33,1	248
4	29 ^b	43 ^b	5,0	15,2	36,1	277

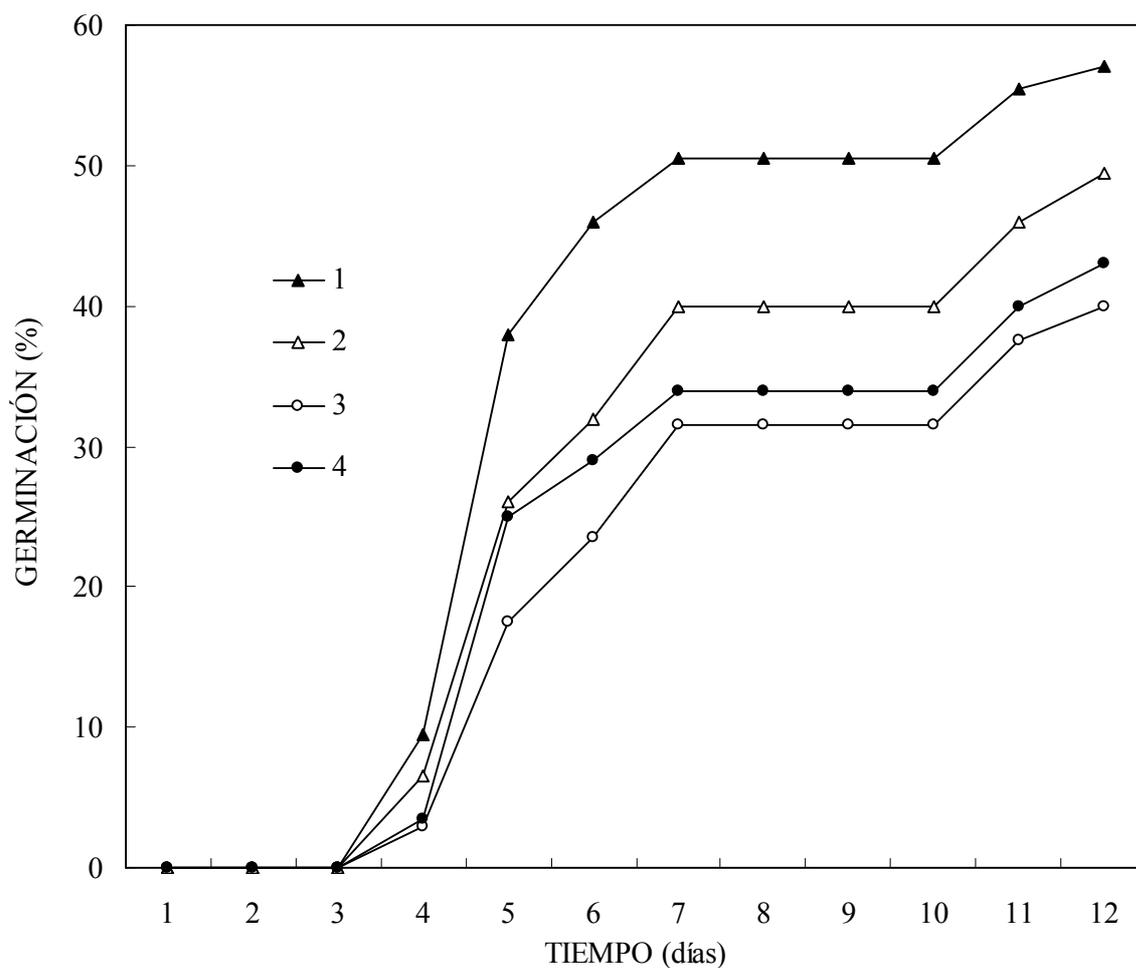


Fig. 14. Curvas de Germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 pre-hidratadas y desinfectadas. Condiciones de germinación 20 °C en oscuridad en cajas de metacrilato sobre papel filtro húmedo. Desinfección en hipoclorito de sodio 4 % durante 4 min. Pre-hidratación en agua destilada durante 4 h: 1, control; 2, semillas desinfectadas; 3, semillas pre-hidratadas y 4, semillas pre-hidratadas y desinfectadas.

Tabla 7. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, del tiempo medio de germinación de 25 % (T_{25}), de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U_{12}) y del índice de Timpson (T_i) de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 tratadas con GA_3 por imbibición del papel de filtro con disoluciones de GA_3 de diferentes concentraciones. Condiciones de germinación según las Normas de la ISTA (1993). Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

CONCENTRACIÓN GA_3 ($mg \cdot L^{-1}$)	GERMINACIÓN (%)		T_{25}	VG	U_{12}	T_i
	DÍA 6	DÍA 12				
CONTROL	24,5 ^{bcd}	41,5 ^{ab}	6,1 ^a	15,8 ^a	35,1 ^b	277 ^c
5	27 ^{bc}	46,5 ^{ab}	5,2 ^a	15,6 ^a	35 ^b	306 ^{bc}
10	37 ^a	51,5 ^a	5,1 ^a	17,3 ^a	40,9 ^a	372 ^a
25	34,5 ^a	45 ^{ab}	5,2 ^a	17,2 ^a	41,3 ^a	324 ^{ab}
50	38 ^a	46 ^{ab}	5 ^a	18 ^a	43,8 ^a	343 ^{ab}
100	21,5 ^{cd}	38 ^b	6,5 ^a	15,7 ^a	35 ^b	252 ^c

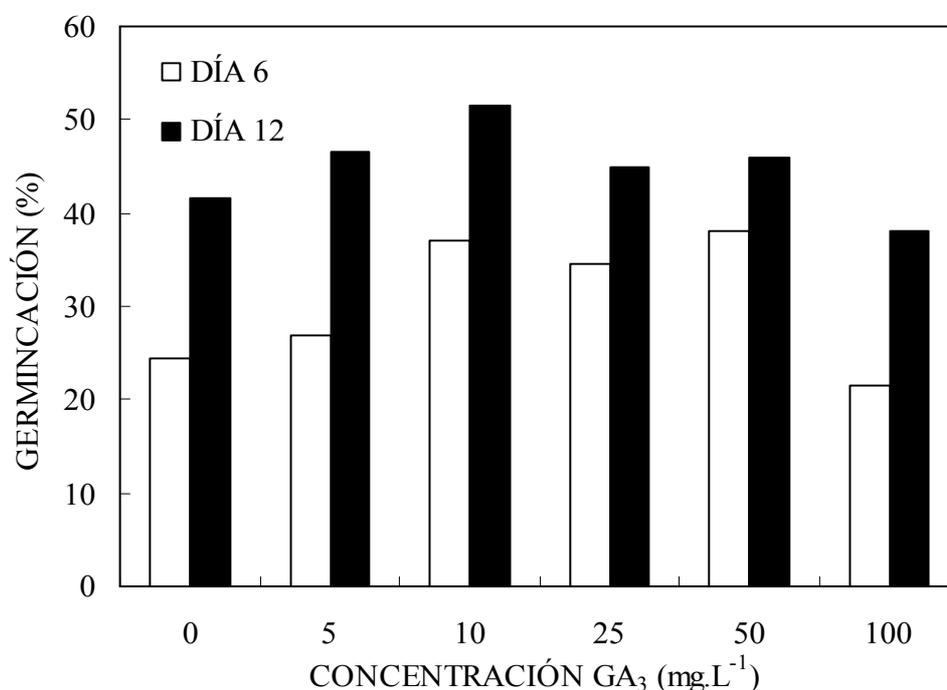


Fig. 15. Porcentaje de germinación a los 6 y 12 días de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 hidratadas con disoluciones de GA_3 sobre papel de filtro. Incubación a 20 °C en oscuridad.

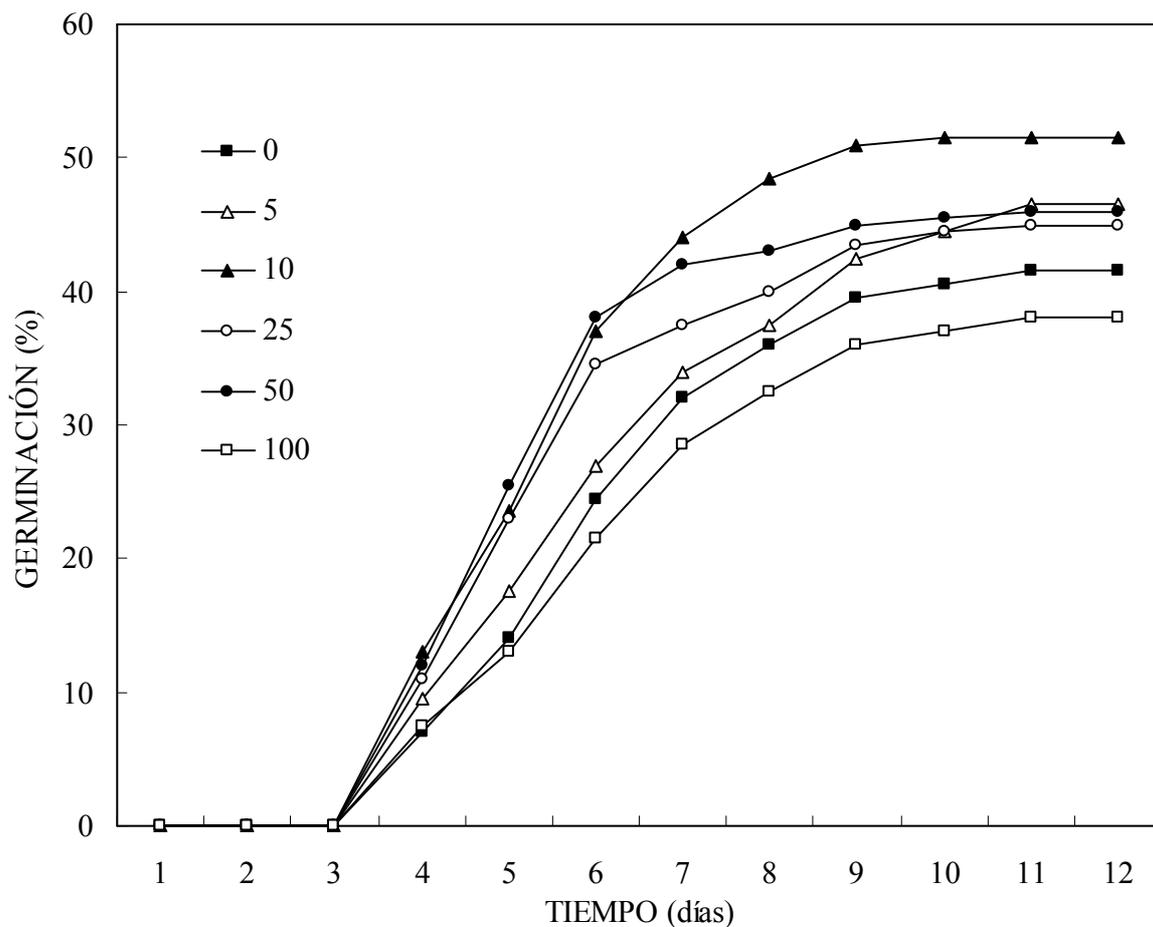


Fig. 16. Germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 hidratadas con disoluciones de GA₃ de diferentes concentraciones (mg·L⁻¹) sobre papel de filtro.

3.3. ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLA

El acondicionamiento de semillas es el sistema más utilizado para mejorar Lotes de semillas. Los tratamientos de acondicionamiento de semilla han probado ser eficientes para revigorizar semillas envejecidas, acelerar y uniformizar la germinación e incrementar los rendimientos de los cultivos bajo condiciones óptimas y adversas.

Con el acondicionamiento osmótico, se ha logrado incrementar la uniformidad y la velocidad germinación.

Gracias al acondicionamiento mátrico se ha incrementado el porcentaje de germinación de las semillas más deterioradas.

3.3.1. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO

El acondicionamiento osmótico no permitió mejorar el porcentaje de germinación. Al contrario, el tratamiento con disoluciones de PEG bajó muy significativamente el porcentaje de germinación. Las semillas respondieron mejor al tratamiento con KNO_3 y con agua desionizada que con PEG (Tabla 8).

La Fig. 17. representa las curvas de germinación por solución de acondicionamiento osmótico.

A diferencia de lo que ocurre con otras especies, el acondicionamiento osmótico permitió mejorar solo ligeramente el porcentaje de germinación pero si se logró una mayor uniformidad y velocidad de germinación (Tabla 8 y Fig. 18).

Los porcentajes de germinación después del acondicionamiento con PEG, independientemente de la concentraciones, son muchos más bajos que los del control (Fig. 18). Además, las semillas tardaron más en germinar (Fig. 17). La causa podría ser que a esas concentraciones en PEG, por la viscosidad del medio, se dificultó la oxigenación de las semillas, y como resultado una situación de anoxia, afectando la viabilidad de las semillas. Las semillas no germinadas después de este tratamiento, al contrario de los demás tratamientos, eran semillas duras. De esto la hipótesis que las semillas no germinadas seguían viables, pero el estrés anóxico puede haberles provocado una dormición secundaria. Esos resultados se contradicen con los resultados de varios autores con la cebolla (*Allium cepa* L.) (BROCKLEHURST *et al.*, 1987a, 1987b; BUJALSKI *et al.*, 1989) mientras que TRIGO *et al.* (1999) y CASEIRO (2003) obtuvieron resultados parecidos.

El acondicionamiento utilizando nitrato potásico fue mucho más exitoso. Al usar el nitrato potásico, se han logrado ligeras mejoras del poder germinativo con la disolución de KNO_3 0,3 M, pero las mejoras más notables se sitúan en los índices de germinación, sobre todo en el coeficiente de uniformidad y en la velocidad de germinación. TRIGO *et al.* (1999) llegaron a las mismas conclusiones. El uso del agua desionizada dio resultados parecidos.

Con la duración del tratamiento, se ha notado una disminución del poder germinativo. En efecto, al cabo de 96 h, se observaron semillas germinadas que seguramente perdieron su viabilidad durante el proceso de desecación. Un remedio a este problema sería una temperatura de acondicionamiento más baja para ralentizar el la germinación de las semillas.

El coeficiente de uniformidad solo depende de la duración del tratamiento y no de las disoluciones. En cuánto más largo el tratamiento, mejor sale la uniformidad de germinación. Aunque se desaconseja un tratamiento de mayor duración de 96 h, porque el riesgo de germinación después de este periodo está muy elevado (tiempo medio de latencia de este Lote: 4 días) (Fig. 19). La consecuencia de un periodo más largo sería alcanzar la fase 3 de la germinación, irreversible y la desecación de las semillas provocaría su muerte.

Se mejoró la velocidad de germinación sobre todo en los periodos de 48 y 96 h de tratamiento con las disoluciones de nitrato potásico y el agua desionizada (Fig. 20).

En conclusión, en el acondicionamiento osmótico de cebolla (*Allium cepa* L.), no es aconsejable usar PEG. El uso de nitrato potásico o agua desionizada da mejor resultados. El acondicionamiento osmótico se debe realizar durante más de 48 h para obtener resultados.

Al osmoacondicionar semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) con KNO_3 0,1 o 0,3 M o con agua desionizada, solo se logra mejorar la uniformidad de germinación y la velocidad de germinación pero no el poder germinativo. Después de 96 h de osmoacondicionamiento, empieza la germinación *sensu stricto* de las semillas y esas pueden sufrir pérdida de viabilidad durante la desecación.

El coeficiente de uniformidad no depende de la disolución pero es función del periodo de acondicionamiento si no se toman en cuenta los tratamientos con PEG. En cuánto más largo el tratamiento, mejor uniformidad de germinación se obtiene.

El hecho que con el agua desionizada se obtengan los mejores resultados destaca que una pre-imbibición con una buena oxigenación de las semillas daría resultados parecidos al acondicionamiento osmótico con KNO_3 , pero con mayor facilidad de aplicación y menor coste.

Tabla 8. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U₁₂) y del índice de Timpson (T_i) de la fracción de semillas pesadas (P₁₀₀ = 0,47 ± 0,01 g) de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 acondicionadas osmoticamente. Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (p ≤ 0,05).

DISOLUCIÓN		DURACIÓN (h)	GERMINACIÓN (%)		T _i	VG (días ⁻¹)	U ₁₂	
			6 DÍAS	12 DÍAS				
AGUA DESIONIZADA		24	37 ^c	52 ^{bc}	378 ^c	18 ^{cd}	42 ^c	
		48	49 ^{ab}	65 ^a	494 ^a	19 ^{bc}	46 ^{bc}	
		96	54 ^a	60 ^{ab}	515 ^a	23 ^a	60 ^a	
KNO ₃	0,1 M	24	42 ^{bc}	56 ^{bc}	401 ^b	17 ^{cd}	42 ^{cd}	
		48	51 ^a	63 ^a	494 ^a	19 ^{abc}	49 ^{bc}	
		96	44 ^{bc}	53 ^{bc}	417 ^b	19 ^{abc}	52 ^{ab}	
	0,3 M	24	47 ^{ab}	60 ^{ab}	445 ^{ab}	18 ^c	45 ^{bc}	
		48	46 ^{abc}	59 ^{ab}	456 ^{ab}	19 ^{abc}	48 ^{bc}	
		96	43 ^{bc}	48 ^c	407 ^{bc}	22 ^{ab}	58 ^a	
PEG	150 g·kg ⁻¹	24	5 ^{fg}	27 ^{de}	124 ^{de}	12 ^e	19 ^{ef}	
		48	6 ^{ef}	26 ^{de}	133 ^{de}	13 ^{cde}	22 ^{ef}	
		96	11 ^d	25 ^{de}	149 ^d	15 ^{cde}	32 ^{de}	
	250 g·kg ⁻¹	24	11 ^{de}	32 ^d	162 ^d	12 ^e	21 ^{ef}	
		48	2 ^{gh}	20 ^e	91 ^e	12 ^e	18 ^f	
		96	12 ^d	29 ^d	152 ^d	13 ^{cde}	26 ^{ef}	
	350 g·kg ⁻¹	24	2 ^{gh}	18 ^{ef}	67 ^{ef}	11 ^e	12 ^f	
		48	2 ^g	12 ^f	50 ^f	12 ^e	16 ^f	
		96	1 ^h	5 ^g	18 ^f	11 ^e	15 ^f	
	Control			43 ^{bc}	57 ^{bc}	394 ^{bc}	17 ^{cd}	38 ^{cd}

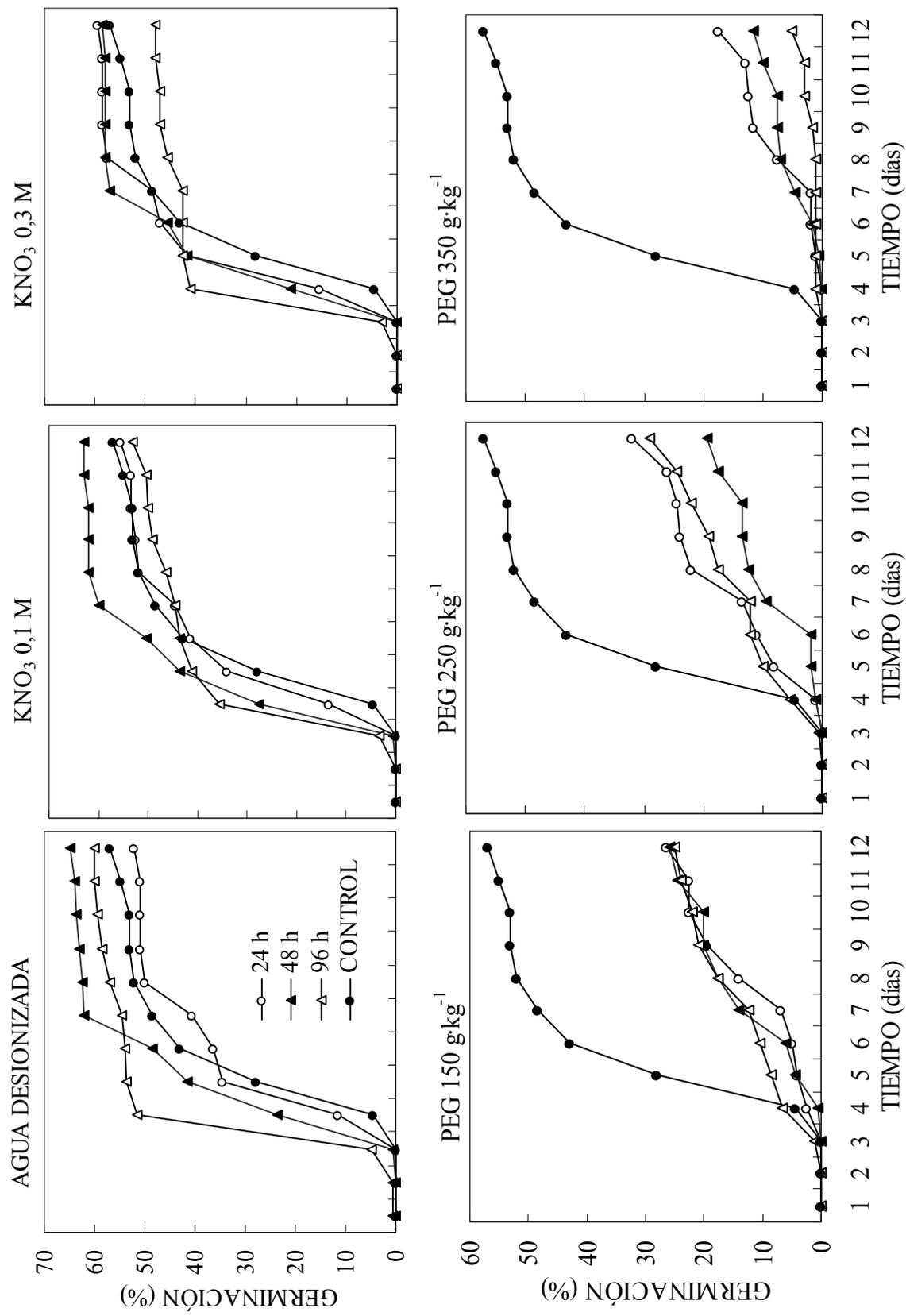


Fig. 17. Curvas de germinación de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 por osmocondicionamiento.

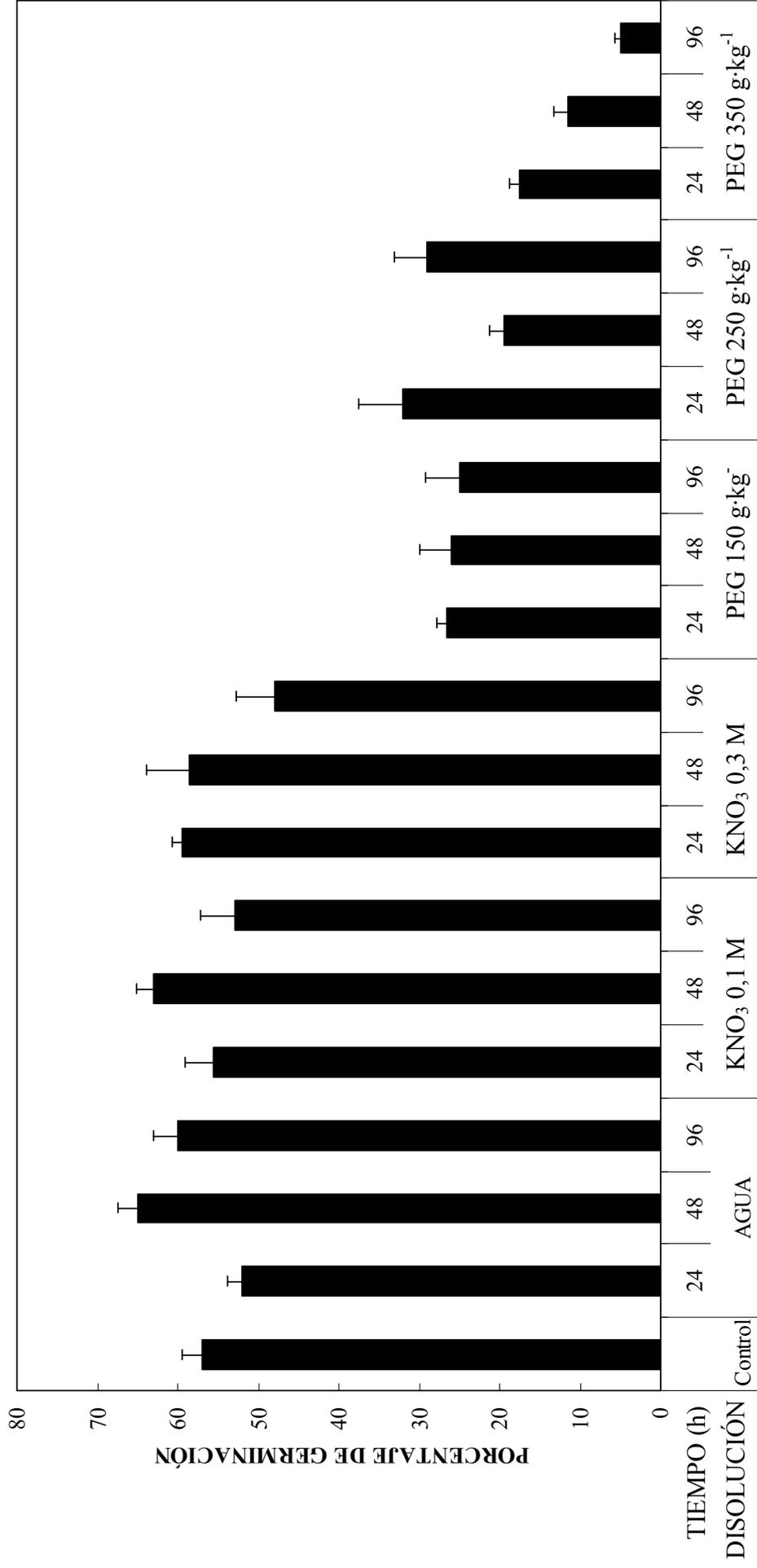


Fig. 18. Porcentaje de germinación 12 días tras la siembra de la fracción de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) del Lote 1 de cebolla (*Allium cepa* L.) por tratamiento de acondicionamiento osmótico. Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

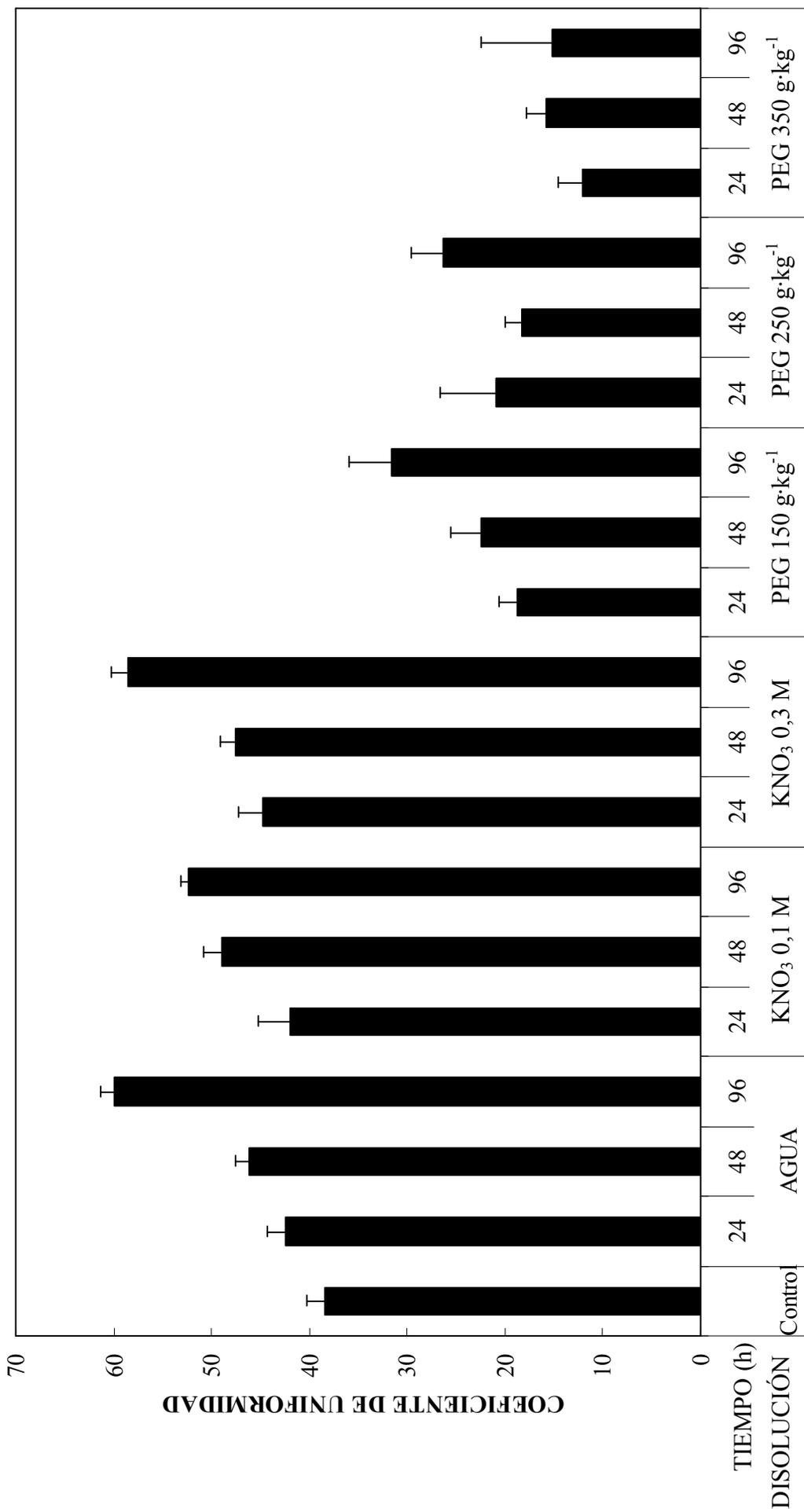


Fig. 19. Coeficiente de Uniformidad doce días después de la siembra de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) del Lote 1 de cebolla (*Allium cepa* L.) por tratamiento de acondicionamiento osmótico. Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

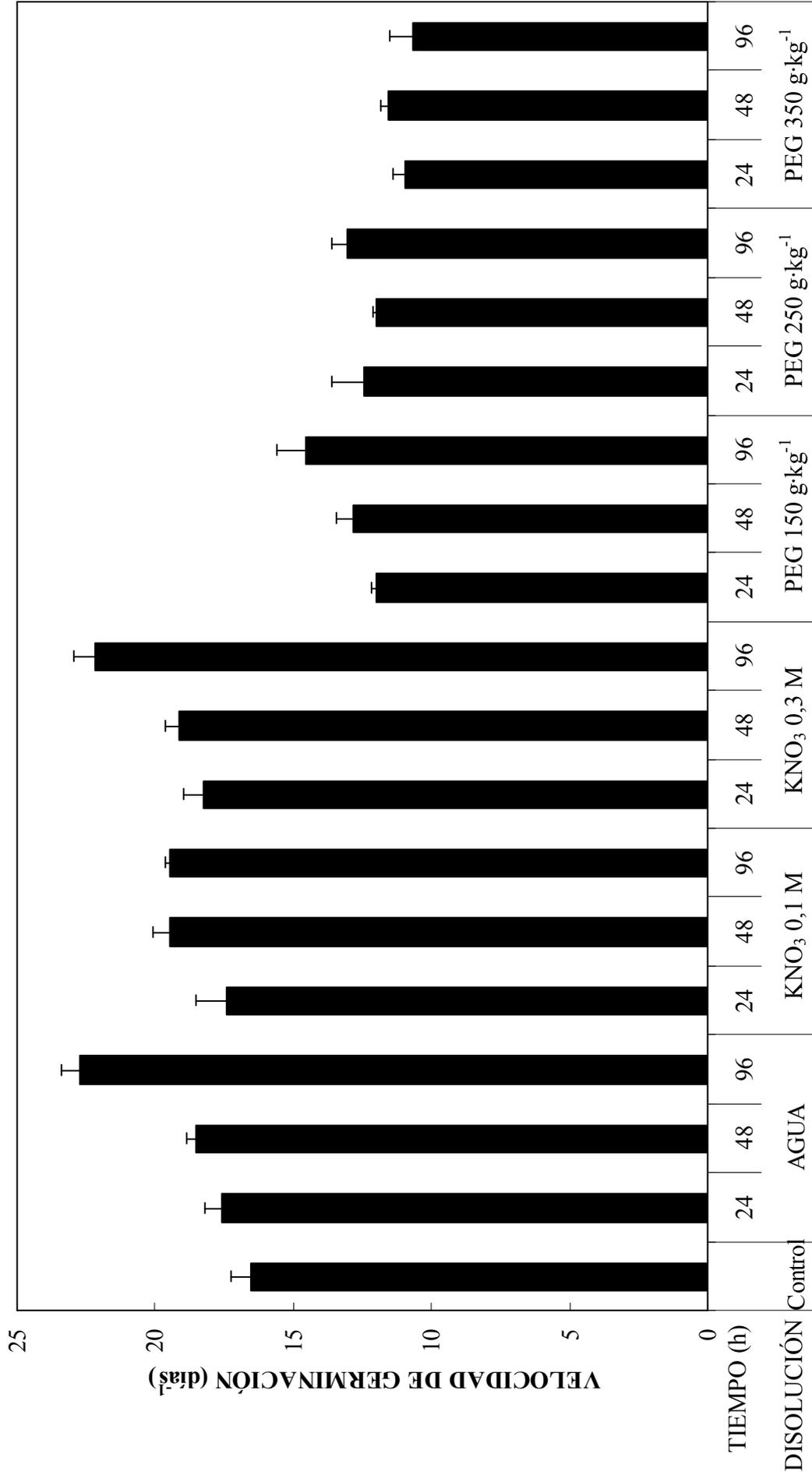


Fig. 20. Velocidad de germinación de la fracción de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) del Lote 1 de cebolla (*Allium cepa* L.) por tratamiento de acondicionamiento osmótico. Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

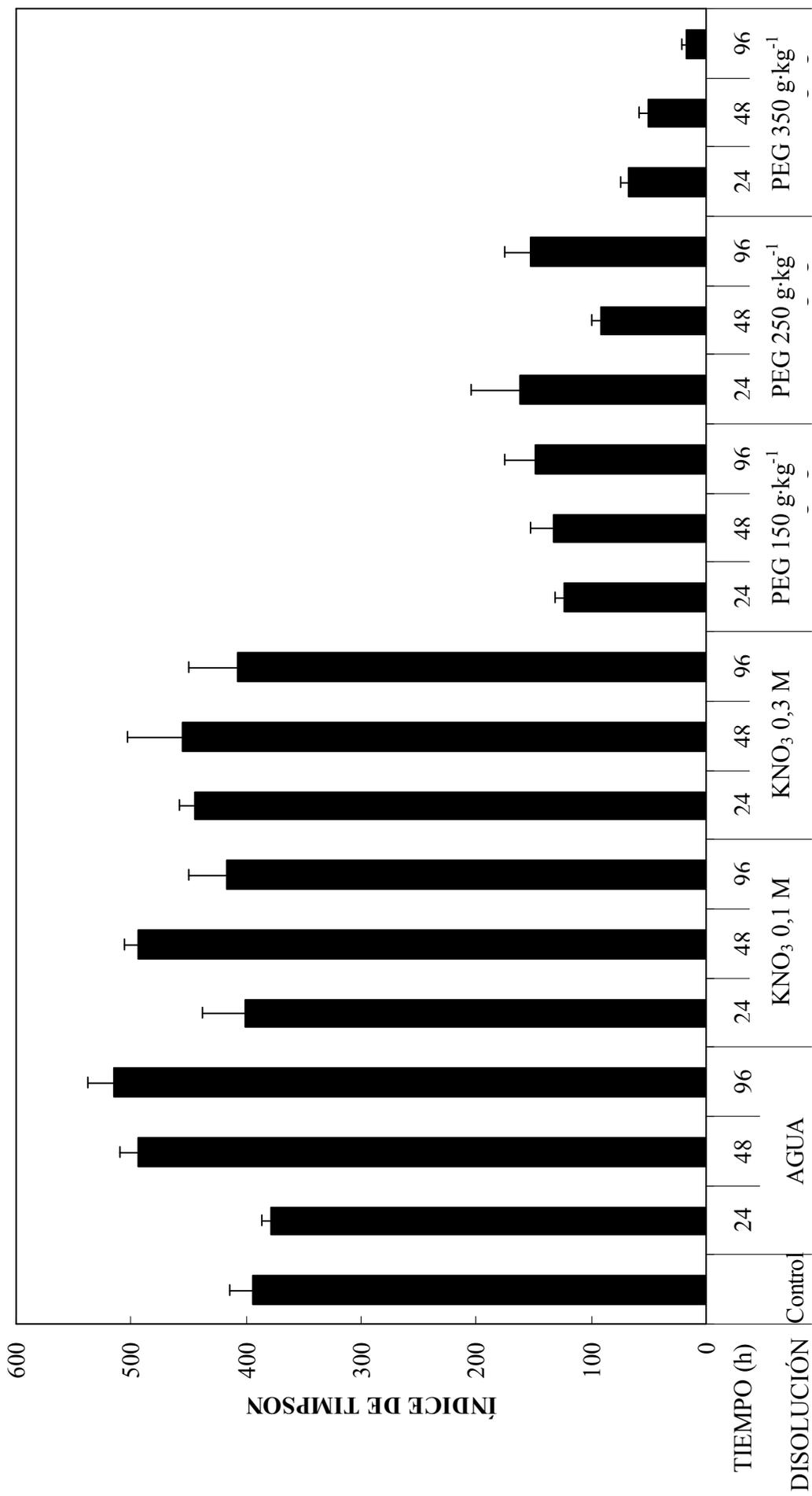


Fig. 21. Índice de Timpson de la fracción de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) del Lote 1 de cebolla (*Allium cepa* L.) por tratamiento de acondicionamiento osmótico. Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

3.3.2. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO

El acondicionamiento mátrico ha tenido más efecto en semillas ligeras que con la fracción de mayor peso medio (Tabla 9).

El acondicionamiento ha dado los mejores resultados con las semillas ligeras (caracterizadas por una germinación muy baja). Con esas semillas, todos los tratamientos con una duración de 6 días obtuvieron mejores resultados independientemente de la proporción semilla: matriz: agua (S:M:A). También los tratamientos con una duración de 4 días han dado resultados satisfactorios (Fig. 22).

En ambos tipos de semillas, no se detectó ninguna interacción entre la duración del tratamiento y la proporción semilla: matriz: agua, siendo la variable el porcentaje de germinación a los doce días tras la siembra.

La germinación de las semillas de la fracción ligera es independiente de la proporción semilla: matriz: agua pero si depende de la duración del tratamiento. El tratamiento con mejores resultados en esas semillas es el tratamiento de 6 días con proporción semillas: matriz: agua de 1:10:1,5 aumentando el porcentaje de germinación de 95 %. La germinación al día 6 es tres veces mayor a la germinación del control con este tratamiento, lo que supone una mejora del vigor muy importante (Fig. 22).

Las semillas más pesadas y de mejor calidad germinativa que las semillas ligeras no respondieron tan bien al acondicionamiento mátrico. No se pudo mejorar el poder germinativo. En cuánto más largo era el tratamiento, más negativo era el efecto sobre el poder germinativo. En este caso, es el tratamiento con la proporción 1: 10: 2 que mejor funcionó durante 4 y 6 días. Se puede concluir que el acondicionamiento mátrico no funcionó para aumentar la capacidad germinativa en el caso de esas semillas (Fig. 23).

Como se observan diferencias significativas con el testigo al día seis de germinación en las semillas ligeras, se puede que el acondicionamiento haya incrementado la velocidad de germinación, pero se hubiera podido confirmar esa hipótesis solo con unos conteos diarios de las semillas germinadas.

De forma general, los resultados del acondicionamiento mátrico son muy heterogéneos. La respuesta de ambos tipos de semillas de calidad muy diferenciada al acondicionamiento osmótico es muy ambigua. La fracción de semillas ligeras responde muy bien al acondicionamiento mátrico y la germinación depende del periodo de acondicionamiento. Por otro lado, en semillas pesadas, el acondicionamiento tiene un efecto negativo sobre la germinación de esas mismas.

En conclusión, se puede decir que las semillas más deterioradas son las que mejor responden al acondicionamiento mátrico, siendo, con esas mismas, la duración de 6 días el mejor tiempo de acondicionamiento y la proporción 1:10:1,5 la mejor proporción. En semillas más pesadas y de mayor calidad, el factor importante es la proporción, siendo la proporción de 1:10:2 la proporción más interesante. Las Fig. 22 y 23 resumen esta información.

Tabla 9. Porcentaje de germinación de de semillas ligeras ($P_{100} = 0,31 \pm 0,04$ g) y pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 por acondicionamiento mátrico. Dentro de cada columna y por tipo de semillas, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

SEMILLAS	(S:M:A) ⁽¹⁾	DURACIÓN (Días)	GERMINACIÓN (%)		
			DÍA 6	DÍA 12	
Ligeras	1:10:1	4	21 ^b	26 ^c	
		6	31 ^a	38 ^a	
	1:10:1,5	4	21 ^b	23 ^c	
		6	34 ^a	41 ^a	
	1:10:2	4	21 ^b	28 ^{bc}	
		6	31 ^a	36 ^{ab}	
	Control			10 ^c	21 ^c
	Pesadas	1:10:1	4	34 ^{bcd}	46 ^c
6			28 ^d	44 ^c	
20			11 ^e	24 ^d	
1:10:1,5		4	32 ^{cd}	47 ^{bc}	
		6	41 ^{ab}	50 ^{abc}	
		20	10 ^e	25 ^d	
1:10:2		4	45 ^a	52 ^{abc}	
		6	44 ^a	56 ^{ab}	
		20	41 ^{ab}	44 ^c	
Control			43 ^{ab}	57 ^a	

⁽¹⁾ S:M:A, Semilla: Matriz: Agua.

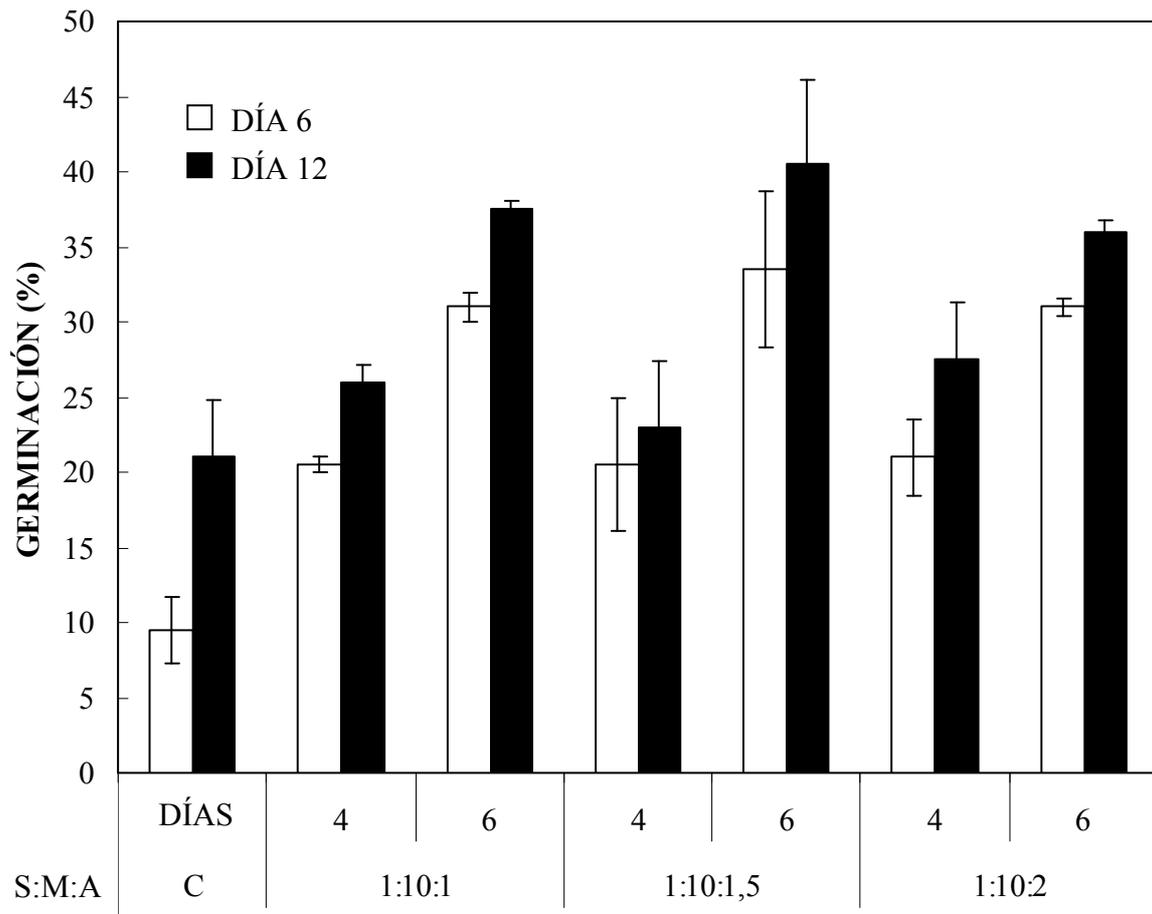


Fig. 22. Porcentaje de germinación de semillas ligeras ($P_{100} = 0,31 \pm 0,04$ g) de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 por tipo de acondicionamiento mátrico. C, control y S:M:A (semilla: matriz: agua). Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

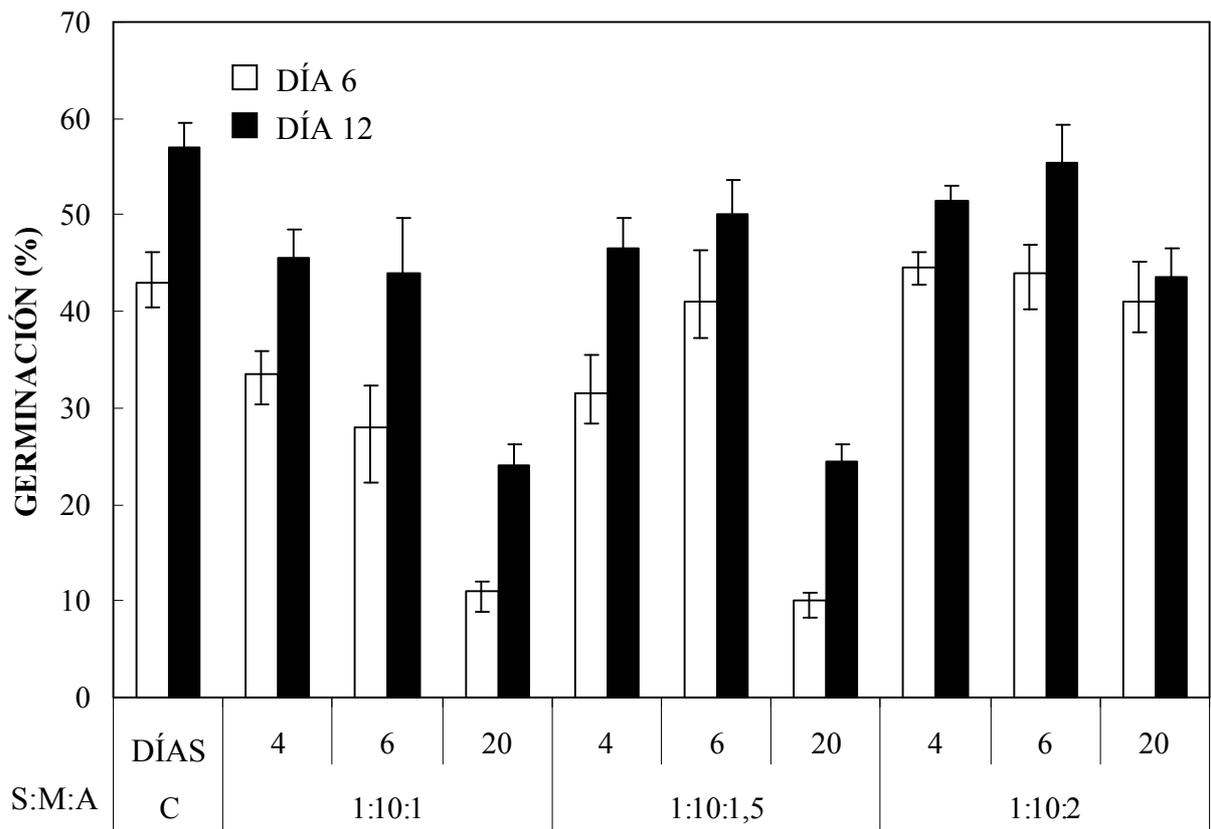


Fig. 23. Porcentaje de germinación de semillas pesadas ($P_{100} = 0,47 \pm 0,01$ g) de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 por tipo de acondicionamiento mátrico. C, control y S:M:A (semilla: matriz: agua). Las barras indican el error estándar de la media (EEM).

3.4. SEPARACIÓN DE SEMILLAS

La separación de semillas es sin duda la técnica que mejor resultados ha dado con el Lote 1. Permitió separar el Lote en sublotes de calidad diferenciada. Además, se encontró una correlación lineal entre el peso medio de las semillas de cien semillas (P_{100}) del Lote 1 y el porcentaje de germinación (Fig. 26).

Antes de realizar la separación con corriente de aire forzado, se hizo una separación visual por tamaño de semillas. La Tabla 10 y las Fig. 24 y 25 enseñan los resultados obtenidos con este pre-ensayo. Se observaron diferencias importantes y se decidió realizar una separación por corriente de aire forzado de Lote 1.

En la separación con corriente de aire forzado, se ha tenido que calibrar el sistema, buscando el las corrientes de aire que permiten separar las semillas en fracciones bien equilibradas. Se he obtenido la mejor separación con una corriente de aire de una fuerza de 85 en la escala arbitraria del separador con corriente de aire (Tabla 11).

Con la fracción de semillas más pesadas ($P_{100} = 0,5$ g) que representa el 25 % en peso de Lote 1, se mejoró la germinación hasta alcanzar un 64 % mientras que la germinación de este Lote sin separar es de un 46% a la fecha del ensayo de separación de semillas.

El bajo coeficiente de uniformidad y velocidad de germinación obtenidos en las semillas más pesadas se pueden justificar por una germinación que no llega un su punto asintótico después de 12 días de germinación mientras que en las otras fracciones si. Es decir, el proceso de germinación de las semillas más pesadas no se había acabado a los doce días (Fig. 26).

Por otro lado, el índice de Timpson, que toma en cuenta a la vez el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación, es más representativo del vigor de las diferentes fracciones (Tabla 12).

En la Fig. 27, se puede observar que la germinación de las semillas está relacionada con su peso medio. Se encontró la siguiente relación lineal:

$$G_{12} = 123,21 P_{100} + 3,0857 \quad [10]$$

donde G_{12} corresponde al porcentaje de germinación acumulada doce días después de la siembra y P_{100} al peso medio de cien semillas (g). El coeficiente de correlación R^2 vale 0,9858. Esta formula es valida con valores de P_{100} comprendidos entre 0,21 y 0,5 g.

La fórmula [10] ha sido realizada con tan solo 4 muestras originarias del Lote 1, lo que limita su extrapolación a otros Lotes o a más semillas de cebolla (*Allium cepa* L.).

La gran variabilidad en peso de las semillas de este Lote puede provenir de una componente genética de la variedad. En efecto, como se trata de una variedad local, que son variedades ya estabilizadas pero aún con cierto grado de variabilidad intravarietal, las plantas madres pueden producir semillas de características intrínsecas más heterogéneas.

También, otra explicación a esta variabilidad en peso de las semillas, podría ser que la maduración este ligada con el peso de la semillas. En efecto, tras el análisis al TZ de este Lote, se detectó un gradiente de madurez en esas mismas. Podría ser que las semillas más pesadas correspondan a las semillas más maduras y viables mientras que las semillas ligeras serían las semillas menos maduras con menos reservas y con un embrión subdesarrollado.

El tratamiento con GA₃ 10 mg·L⁻¹ por fracción de semillas, con el cual se esperaban diferencias de respuestas en función del tamaño de las semillas, no ha tenido el efecto esperado (Tabla 13.). Este ensayo confirma los resultados anteriormente presentados. El GA₃, a la concentración de 10 mg·L⁻¹ mejora la uniformidad de germinación pero no mejora el porcentaje de germinación. El efecto se nota más en las semillas de mayor peso y calidad. En efecto, existe una interacción significativa entre la fracción de semilla obtenida con el separador de semilla y el tratamiento con GA₃. En semillas de mayor peso, se ve más afectado el porcentaje de germinación que baja con el tratamiento, pero se obtienen diferencias significativas en la uniformidad de germinación que se mejora al tratar con GA₃, pero esto solo con las semillas de mayor peso.

Tabla 10. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, del tiempo medio para el 25 % de germinación (T_{25}), de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U_{12}) y del índice de Timpson (T_i) de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas visualmente por tamaño. Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con la prueba Z.

TAMAÑO	GERMINACIÓN (%)		T_{25} (días)	VG (días ⁻¹)	U_{12}	T_i
	DÍA 6	DÍA 12				
Pequeñas	10 ^b	20 ^b	-	14,7	33	124
Medianas	38 ^a	46 ^a	5,5	18,5	46,1	351
Grandes	50 ^a	56 ^a	5,1	18,4	44,9	424

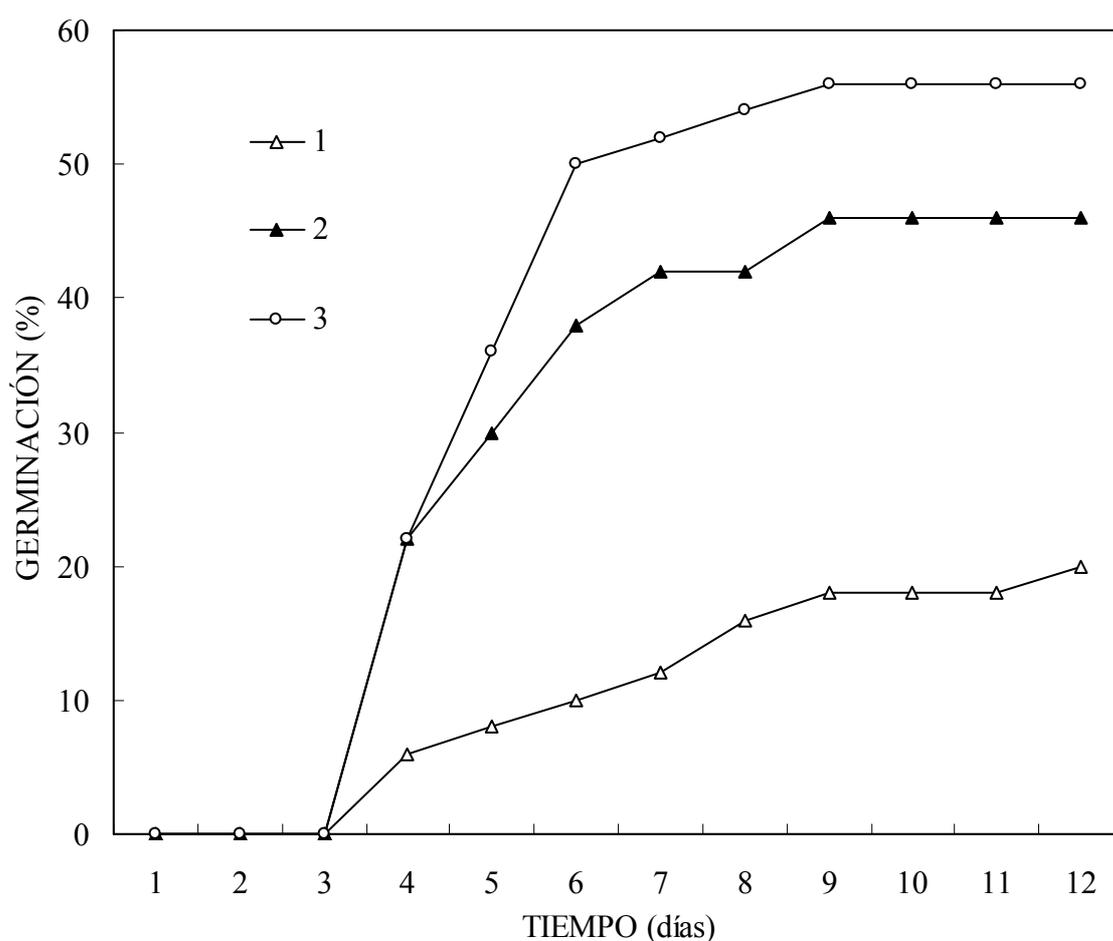


Fig. 24. Germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas visualmente por tamaño: 1, semillas pequeñas; 2, semillas medianas y 3, semillas pesadas.

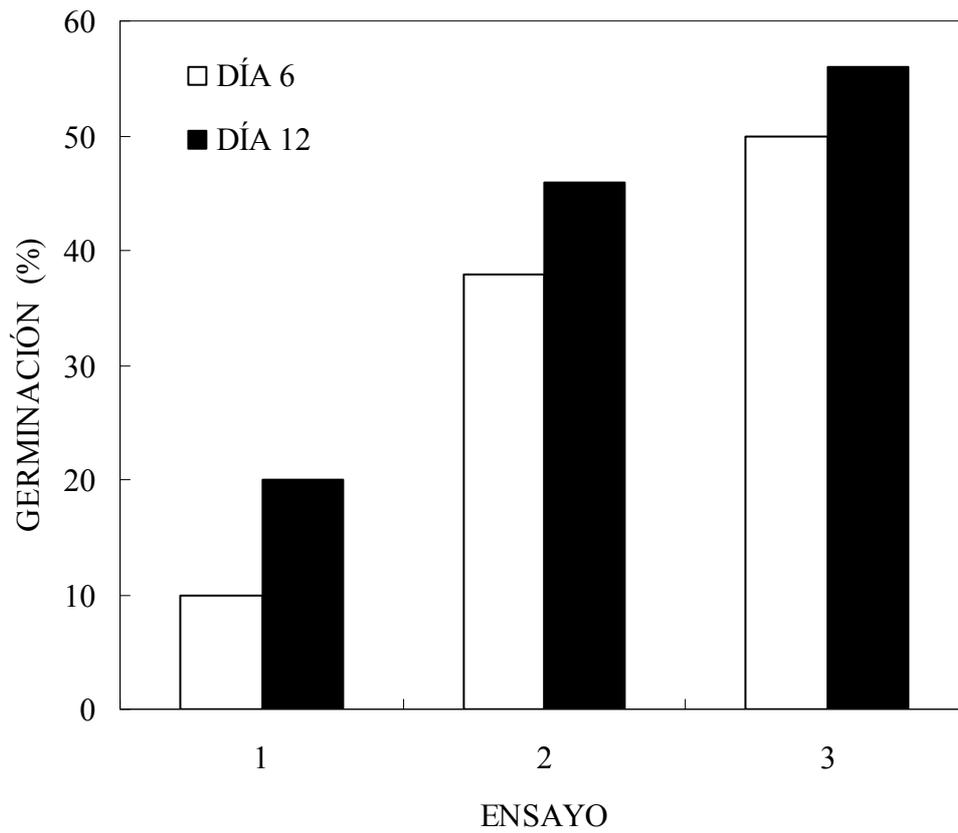


Fig. 25. Porcentaje de germinación a los 6 y 12 días de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas visualmente por tamaño: 1, semillas pequeñas; 2, semillas medianas y 3, semillas pesadas.

Tabla 11. Peso medio de 100 semillas (P_{100}) por fracciones del peso total de las muestras de semilla obtenidas con varias corrientes de aire del separador densimétrico de semillas.

CORRIENTE DE AIRE	FRACCIÓN	PORCENTAJE EN PESO	P_{100} (g)
75	1	34	0,27
	2	44	0,37
	3	20	0,36
	4	2	0,50
80	1	27	0,28
	2	43	0,31
	3	24	0,36
	4	6	0,50
85	1	17	0,21
	2	20	0,32
	3	37	0,34
	4	26	0,50

Tabla 12. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U_{12}) y del índice de Timpson (T_i) de diferentes fracciones de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas por corriente de aire. Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

FRACCIÓN	P_{100} ⁽¹⁾	GERMINACIÓN (%)		VG (días ⁻¹)	U_{12}	T_i
		DÍA 6	DÍA 12			
1	0,21	22,75 ^c	28,25 ^c	17,3 ^a	41,2 ^{ab}	204 ^c
2	0,32	29,75 ^b	41,75 ^b	16,3 ^a	37,6 ^{ab}	288 ^{bc}
3	0,34	31,75 ^b	47,75 ^b	15,5 ^a	34,5 ^{bc}	313 ^b
4	0,5	41 ^a	64 ^a	15,4 ^a	33,7 ^c	417 ^a

⁽¹⁾ P_{100} , peso medio de cien semillas (g).

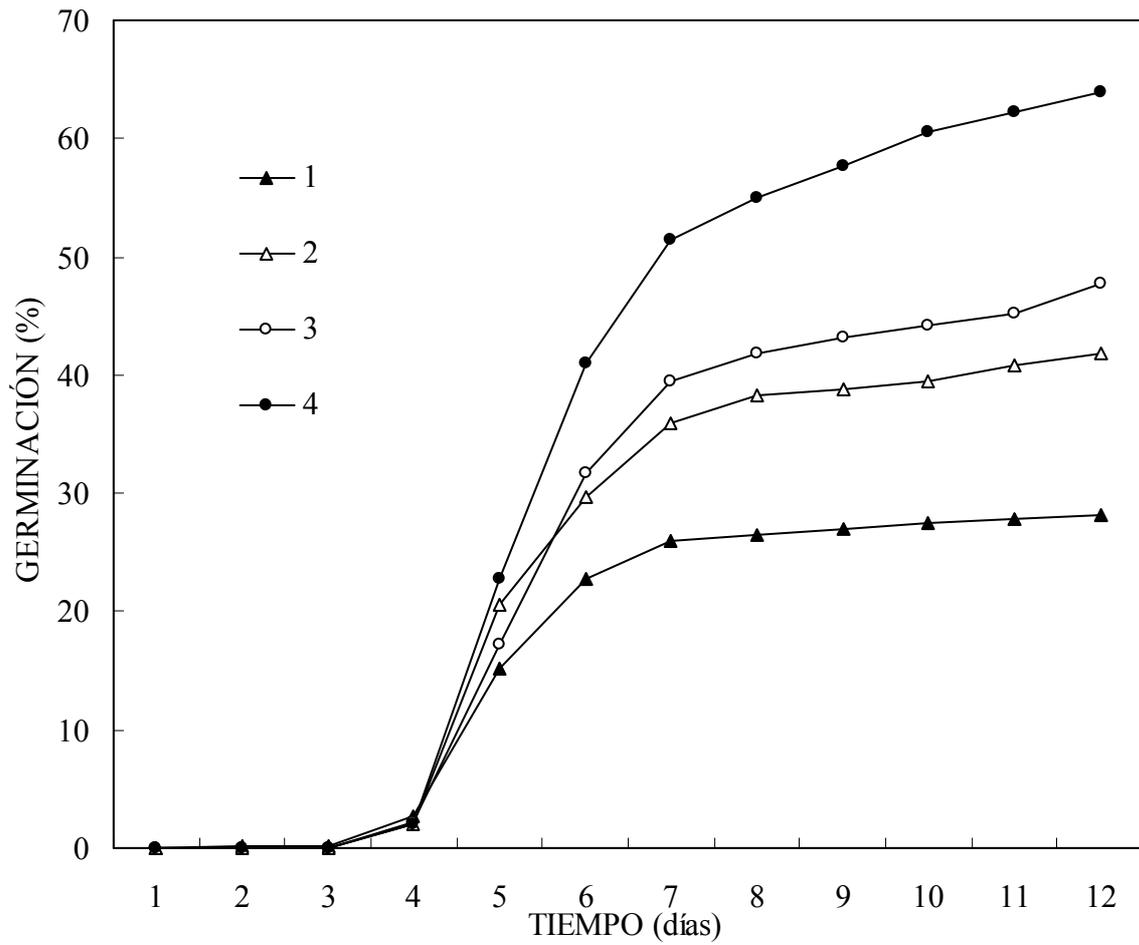


Fig. 26. Germinación de diferentes fracciones de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas por corriente de aire: 1, semillas ligeras ($P_{100} = 0,21$ g); 2, semillas de peso medio ($P_{100} = 0,32$ g); 3, semillas con un $P_{100} = 0,32$ g y 4, semillas más pesadas ($P_{100} = 0,5$ g).

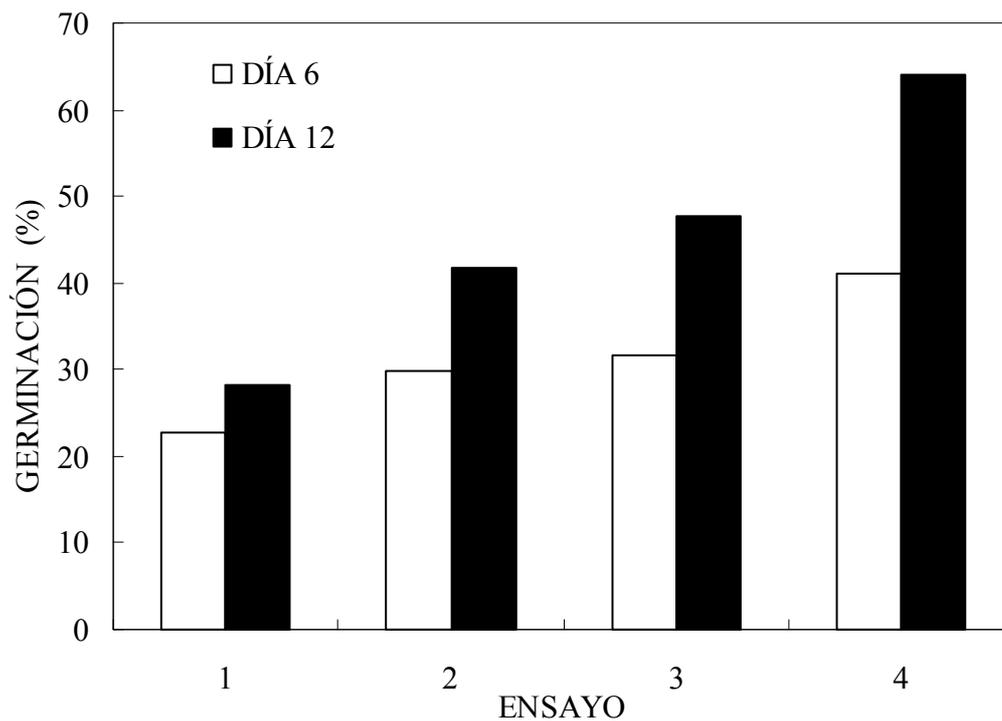


Fig. 27. Porcentaje de germinación a los seis y doce días de diferentes fracciones de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas por corriente de aire: 1, semillas ligeras ($P_{100} = 0,21$ g); 2, semillas de peso medio ($P_{100} = 0,32$ g); 3, semillas con un $P_{100} = 0,32$ g y 4, semillas más pesadas ($P_{100} = 0,5$ g).

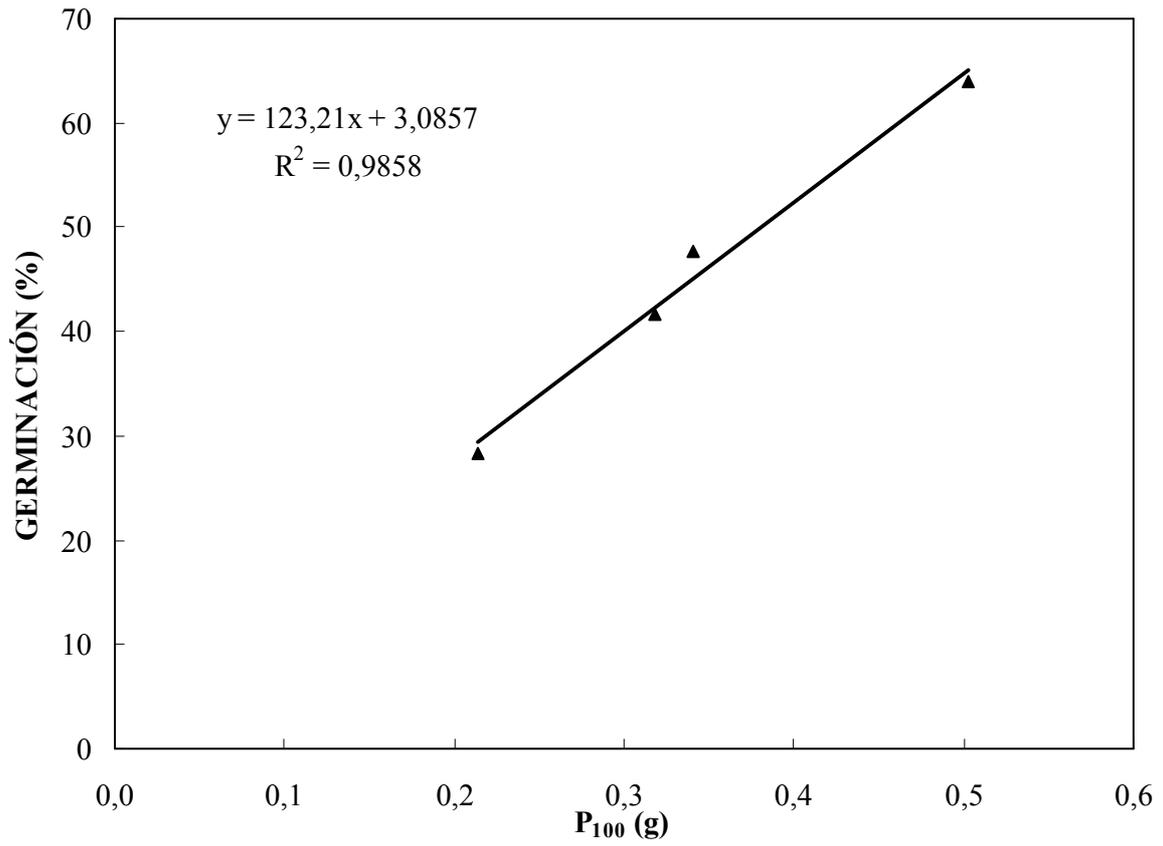


Fig. 28. Porcentaje de germinación en función del peso medio de cien semillas (P_{100}) de fracciones de semillas del Lote 1 separadas por corriente de aire y correlación entre ellos.

Tabla 13. Comparación del porcentaje de germinación al día 6 y 12, de la velocidad de germinación (VG), de la uniformidad de germinación al día 12 (U_{12}) y del índice de Timpson (T_i) de diferentes fracciones de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 separadas por corriente de aire forzado y tratadas con GA_3 . Dentro de cada columna, los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

ENSAYO		GERMINACIÓN (%)		VG	U_{12}	T_i
P_{100} (g)	GA_3 ($mg \cdot L^{-1}$)	DÍA 6	DÍA 12			
0,21	0	22,5 ^c	28 ^{ef}	17,2 ^a	40,7 ^{ab}	202 ^{cd}
	10	17,25 ^c	23,25 ^f	16,9 ^a	39,4 ^{ab}	165 ^d
0,32	0	29,75 ^{bc}	41,75 ^{cd}	16,3 ^a	37,6 ^{ab}	287 ^{bc}
	10	26,75 ^{bc}	36 ^{de}	17,4 ^a	40,8 ^{ab}	261 ^c
0,34	0	31,75 ^{abc}	47,75 ^{bc}	15,5 ^a	34,5 ^{bc}	313 ^b
	10	39,5 ^{ab}	49,75 ^{bc}	17,3 ^a	41,2 ^a	360 ^{ab}
0,5	0	41 ^a	64 ^a	15,4 ^a	33,7 ^c	417 ^a
	10	40 ^{ab}	58 ^b	16,8 ^a	39,2 ^{ab}	410 ^a

3.5. ENSAYO TOPOGRÁFICO AL TETRAZOLIO

Los resultados del análisis de viabilidad al TZ están presentados en las Tablas 14 y 15.

En el ensayo al TZ de ambos Lotes, se ha detectado la falta de madurez del embrión que a menudo no tiene el cotiledón completo. Esto se puede explicar por una cosecha y/o deshidratación demasiado temprana que no permitió a las semillas madurar hasta el desarrollo completo del embrión.

También un estrés hídrico durante la fase final de maduración del embrión puede haber impedido la translocación de los nutrientes desde las hojas hasta las semillas. La causa del estrés hídrico pudiendo ser de origen abiótico (problema de riego, clima) o biótico (ataque de la planta madre por fitopatógenos o plagas).

Las semillas viables sin síntomas de debilidad de la primera variedad representan el 25 % del Lote 1. Las semillas viables y de grado de madurez suficiente pero deterioradas constituyen el 27,5 % de este mismo Lote.

El alto porcentaje de semillas débiles en ambos Lotes se podría explicar por el elevado contenido en humedad de esas semillas y a la duración del almacenamiento de las semillas. En efecto, a fecha del ensayo, los Lotes llevaban 5 meses de almacenamiento a 7 °C, pero con un contenido en humedad mayor de 11 %. El almacenamiento con este contenido en humedad pueden haber afectado sensiblemente el vigor aunque la temperatura de almacenamiento este adecuada a la conservación.

La fracción de semillas inmaduras se lleva el 47,5 % de las semillas. El Lote 2 tiene 63 % de semillas viables y las semillas inmaduras representan casi la totalidad del porcentaje de semillas muertas en el momento del análisis.

En conclusión del análisis al tetrazolio, se puede decir que el mayor defecto del Lote de semillas es la falta de maduración de las semillas cuyo embrión no ha alcanzado una madurez suficiente para permitir la germinación o al menos cuyo vigor se encuentra muy afectado. Esto puede ser la causa de la difícil mejora del Lote 1. También puede la explicación de las diferencias encontradas entre las fracciones de semillas de densimetría creciente. Las semillas más pesadas deben representar a la vez la fracción de semillas más madura con el embrión bien desarrollado.

En fin, la razón de la falta de germinación de este Lote es la falta de madurez de sus semillas cuyo desarrollo está incompleto.

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad en semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de los Lotes 1 y 2.

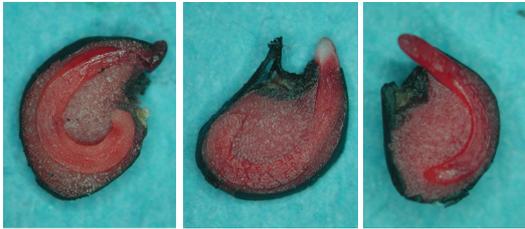
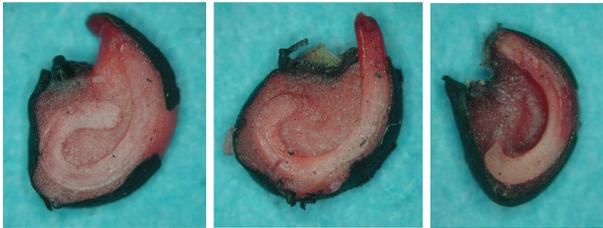
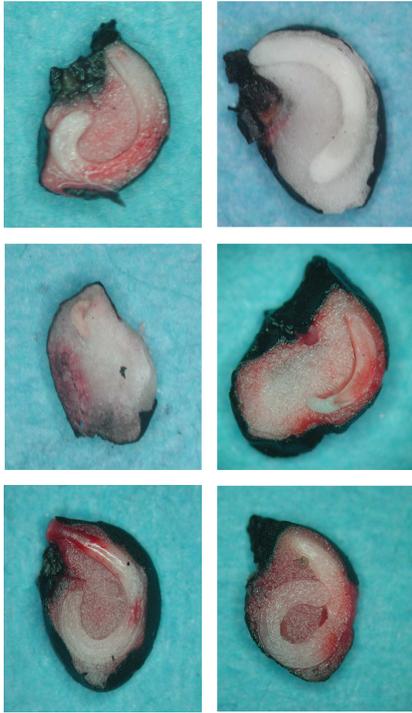
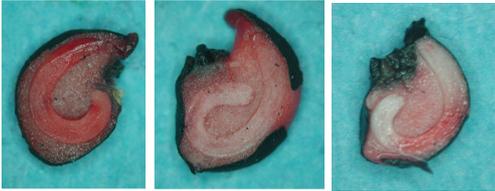
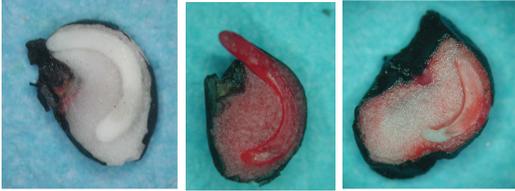
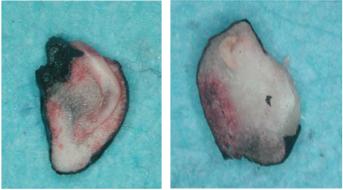
VIABILIDAD		LOTE 1		LOTE 2	
Viabiles		25	52,5	31,5	63
				27,5	
Débiles		47,5	37		
Muertas		100	100		
TOTAL		100	100		
Germinación		45	49		

Tabla 15. Porcentaje de maduración de las estructuras de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de los Lotes 1 y 2.

MADURACIÓN (PRESENCIA DEL TEJIDO)		LOTE 1	LOTE 2
Cotiledón		61,5	65
Primordio caulinar		75	75,5
Radícula		79,5	82
Tejido nutritivo		87,5	87
Tejido nutritivo sin desarrollar			
Total semillas inmaduras		38,5	35
Germinación		45	49

4. CONCLUSIONES

De los tratamientos de mejora de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) de Lote 1, la separación de semillas por su densidad y los acondicionamientos osmóticos y mátricos son los que mejores resultados han dado.

El ensayo de viabilidad al tetrazolio destacó la falta de maduración de las semillas. Esa falta de maduración debe ser la razón por la que en la separación de semillas se han obtenido buenos resultados. Las semillas de mayor densidad y peso ciertamente son las más maduras y más vigorosas. Un ensayo de viabilidad al TZ de cada fracción obtenida con la separación densimétrica hubiera permitido confirmar esta hipótesis. La ventaja de la separación es de obtener diferentes sublotos de semillas de que se pueden manejar en función de su calidad. La falta de maduración es la barrera principal a la mejora de este Lote.

En efecto, se ha observado que el acondicionamiento mátrico permite mejorar de manera significativa la calidad de las semillas más deterioradas pero no la de semillas de mayor calidad germinativa que son las semillas de mayor peso. Entonces, este tratamiento es el más aconsejable para los Lotes de peor calidad. El acondicionamiento mátrico más adaptado es en el que se utiliza una proporción semilla: matriz: agua de 1:10:1 o 1:10:1,5 durante un periodo de seis días. La explicación que las semillas más deterioradas responden mejor al acondicionamiento puede ser que este proceso ayude al desarrollo y a la maduración del embrión mientras que en semillas más pesadas y de mayor calidad, el embrión ya desarrollado sufre daños irreversibles debidos al inicio del proceso de germinación.

En las semillas de mayor peso y calidad, solo se han logrado pequeñas mejoras de la capacidad germinativa. Las mejoras se han observado sobre todo en la velocidad y la uniformidad de germinación, es decir, en el vigor.

Es con el acondicionamiento osmótico que se logró la mayor uniformidad y velocidad de germinación. El PEG no se debe usar en el acondicionamiento de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). Las semillas osmoacondicionadas con la disolución de KNO_3 de 0,3 M y el agua desionizada durante 96 h son las que mejores índices de germinación han obtenido. Por otro lado, las mayores tasas de germinación se han obtenido con las mismas soluciones, pero durante 48 h.

Una duración de osmoacondicionamiento mayor de 48 h afecta la tasa de germinación, la explicación es que las semillas ya entran en germinación después de este periodo y sufren cambios irreversibles que las hacen sensibles al proceso de desecación subsiguiente al acondicionamiento. La solución a este problema podría ser bajar la temperatura a la que se realiza el acondicionamiento para ralentizar el proceso de germinación. También se puede intentar aumentar el potencial osmótico por encima de -1,1 MPa, este potencial siendo el potencial mínimo para permitir la germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) (BREWSTER, 2001).

El hecho que el agua desionizada ha sido una de las soluciones que han dado los mejores resultados en el osmoacondicionamiento abre la posibilidad que una pre-imbibición de una duración mayor de 48 h puede ser el mejor tratamiento para las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). En efecto, como el ensayo de pre-hidratación se realizó hasta máximo 24 h de imbibición, es muy posible que sea mayor el efecto del tratamiento por encima de este periodo, por lo visto con el acondicionamiento osmótico utilizando agua desionizada. También es muy posible que el sistema de pre-imbibición utilizado no habrá sido adaptado al acondicionamiento de semillas de por su difícil control de la oxigenación de las semillas aunque se haya observado una bajada de la contaminación de las semillas por los microorganismos.

El acondicionamiento hormonal ayudó a mejorar la uniformidad de las semillas, usando GA₃ a concentraciones entre 10 y 50 mg·L⁻¹. Por encima de estas concentraciones no se debe usar porque disminuye el porcentaje de germinación de las semillas y por debajo, no se observan diferencias con el testigo en la germinación.

Las semillas de mayor peso responden mejor al tratamiento con ácido giberélico, mientras que en semillas más pequeñas, no se observan mejoras en la germinación con el este tratamiento. Por lo tanto, es muy posible que el ácido giberélico tenga más efecto en semillas bien desarrolladas y maduras.

Las mejoras con el GA₃ son muy pequeñas. Esto se puede explicar que las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) tienen una dormición muy ligera que se elimina con unas semanas de conservación en seco (BREWSTER, 2001) en la que ciertamente influye poco el ácido giberélico. ELLIS *et al.* (1985) detallan los tratamientos con GA₃ como poco efectivos sobre la dormición de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) y aconsejan más bien un tratamiento con frío para eliminar una eventual dormición de esas semillas. En cuánto a la mejora de la uniformidad de germinación, el acondicionamiento osmótico se adapta mejor a la aplicación práctica, ya que pequeños cambios en la concentración de GA₃ pueden dar resultados contrarios a lo esperado.

En conclusión, se puede decir que si se ha logrado mejorar este Lote *a posteriori* de la cosecha. La mejora del Lote se realizó gracias a la separación de semillas. Como la separación se realizó con un solo Lote, no se puede extender la hipótesis que la separación densimétrica de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) da resultados en todos los lotes. Habría que intentar averiguar esta hipótesis analizando extendiendo esta investigación a más Lotes y variedades de cebolla (*Allium cepa* L.).

Para mejorar la uniformidad y acelerar la germinación, se aconseja el acondicionamiento osmótico con agua desionizada o con KNO₃ 0,3 M durante entre 48 y 96 horas.

En casos de semillas muy deterioradas, como en el caso de las semillas más ligeras del Lote 1, el acondicionamiento mátrico ayuda a mejorar el porcentaje de germinación de esas semillas. Se puede realizar utilizando Algalita[®] como matriz en la proporción S:M:A en volumen de 1:10:1,5 durante 6 días.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ANÓNIMO (2006). Directiva del Consejo Europeo (2002/55/CE), de 13 de junio de 2002, referente a la comercialización de las semillas de plantas hortícolas.
- BANDEIRA, B. (1995). Osmocondicionamiento y recubrimiento de semillas de Especies Hortícolas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, 239 p.
- BASU, R. (1995). Seed Viability. *In: Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications* (ed. A. Basra). Food Products Press, New York, pp 1-44. ISBN: 1-56022-850-4.
- BERESNIEWICZ, M.M.; TAYLOR, A.G.; GOFFINET, M.C.; TERHUNE, B.T. (1995). Characterization and Location of a Semipermeable Layer in Seed Coats of Leek and Onion (*Liliaceae*), Tomato and Pepper (*Solanaceae*). *Seed Science and Technology*, 23: 123-134.
- BEWLEY, J.D. (1997). Seed Dormancy and Germination. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- BODSON, M. (2004). Physiologie de la reproduction végétale. Apuntes. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- BRADFORD, K (1986). Manipulation of Seed Water Relations via osmotic priming to Improve Germination under Stress Conditions. *HortScience* 21:1105-1112.
- BREWSTER, J.L. (2001). Las cebollas y otros *Alliums*. Editorial Acribia, Zaragoza. 253 p. ISBN: 84-200-0941-5
- BROCKLEHURST, P.A.; DEARMAN, J.; DREW, R.L.K. (1987a). Improving Establishment of Vegetable Crops by Osmotic Seed Treatments. *Acta Horticulturae*, 198: 73-80.
- BROCKLEHURST, P.A.; DEARMAN, J.; DREW, R.L.K. (1987b). Recent Developments in Osmotic Treatment of Vegetable. *Acta Horticulturae*, 215:193-200.
- BUJALSKI, W.; NIEWOW, A.W.; GRAY, D. (1989). Establishing the Large Scale Osmotic Priming of Onion Seeds by Using Enriched Air. *Annals of Applied Biology*, 115: 171-176.
- CARRAVEDO, M.; MALLOR, C. (2007). Variedades Autóctonas de Cebollas Españolas. CITA-Aragón. 382 p. ISBN: 84-8380-006-5.

- CASEIRO, R.F. (2003). Métodos para condicionamento fisiológico de sementes de cebola e influência da secagem e armazenamento. Tesis Doctoral. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Sao Paulo. 109 p.
- CÔME, D. (1970). Les Obstacles à la Germination. Masson et Cie, Paris. 160 p.
- CONTRERAS, S. (2002). The international seed industry. *In: Proceedings International Seed Seminar: Trade, Production and Technology* (eds. M. McDonald and S. Contreras). Universidad Católica Pontificia de Chile, Santiago (Chile). pp 1-9.
- CORBINEAU, F.; CÔME, D. (2006). Priming: A Technique for Improving Seed Quality. *Seed Testing International*, 132: 38-40.
- DURÁN, J.M.; HIERRO, J. del (1993). La viabilidad de semillas y su estimación en condiciones de laboratorio. *Agricultura*, 734: 762-765.
- DURÁN, J.M.; PÉREZ GARCÍA, F. (1984). Aspectos fisiológicos de la germinación de semillas. Universidad Politécnica, Madrid. 245 p.
- DURÁN, J.M.; RETAMAL, N. (1996). ¿Qué entendemos por calidad de un lote de semillas? *Agricultura*, 763:129-133.
- DURÁN, J.M.; RETAMAL, N. (1997). El Acondicionamiento matricio. *Agricultura*, 775: 120-122.
- ELLIS, R.H.; BUTCHER, P.D.(1988). The Effects of Priming and “natural” Differences in Quality amongst Onion Seed Lots on the Response of the Rate of Germination to Temperature and the identification of the Characteristics under genotypic Control. *Journal of Experimental Botany*, 389: 935-950.
- ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. (1981). The Quantification of Ageing and survival in orthodox Seeds. *Seed Science and Technology*, 9: 373-409.
- ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H.; HONG, T.D. (1985). Handbook of Seed Technology for Genebanks Volume II: Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations, Chapter 44: *Liliaceae*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. ISBN: 91-9043-119-9
- EVENARI, M. (1984). Seed Physiology: Its History From Antiquity to the Beginning of the 20th Century. *Botanical Review*, 50: 119142.
- FAOSTAT (2005). <http://faostat.fao.org>. 7 de julio de 2007.

- FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. (2006). Seed Dormancy and the Control of Germination. *New Phytologist*, 171:501-523.
- FOURY, C.; SCHWEISGUTH, B. (1993). L'oignon. *In: Amélioration des espèces végétales cultivées*. INRA, Paris, pp. 404-419.
- GABRIEL, E.L.; MAKUCH, M.A.; PICCOLO, R.J. (1997). Seed Size, Germination And Bulb Uniformity in Onion (*Allium cepa* L.) cv. Valcatorce INTA. *Acta Horticulturae*, 433: 573-584.
- GIMÉNEZ SAMPAIO, T.M. (1992). Pre-acondicionamiento osmótico y recubrimiento de semillas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica, Madrid. 266 p.
- INSPV (1987). Manual Ensayos al Tetrazolio. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Madrid, 92 p. ISBN: 84-7479-399-0.
- ISTA (1993). International Rules for Seed Testing Association. Edition 1993/5: 1200 copies. Zürich. ISBN: 3-906549-27-5.
- ISTA (1995). Understanding Seed Vigour. ISTA Vigour Test Committee. Zurich.
- ISTA (2003). ISTA Flower Seed Testing Workshop. 12-16 May, 2003, Budapest (Hungary).
- KEPCZYNSKA, E.; PIEKNA-GROCHALA, J.; KEPCZYNSKI, J. (2003). Effects of Matriconditioning on Onion Seed Germination, Seedling Emergence and Associated Physical and Metabolic Events. *Plant Growth Regulation*, 41: 269-278.
- LÓPEZ-APARICIO, D (2005). Estructuración y dinámica de un semillero hortícola. *In: Dirección Técnica de Semilleros Hortícolas. Curso de especialización*. (eds. IM Cuadrado; MC García; MM Fernández). Ed FIAPA. Almería. pp 9-24. ISBN: 84-88246-24-2.
- LOVATO, A. (1981). Advances in Research and Technology of Seeds. Part 6. PUDOC, Wageningen, pp 86-120. ISBN: 90-220-0786-3.
- MESSAIEN, C.M.; COHAT, J.; LEROUX, J.P.; PICHON, M.; BEYRIES, A. (1993). Les *Allium* alimentaires reproduits par voie vegetative. INRA, Paris. 228 p. ISBN: 2-7380-0422-9.
- MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. (1973). The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51: 914-916.

- PLEGUEZUELO, P. (2005). Semillas hortícolas. *In: Dirección Técnica de Semilleros Hortícolas. Curso de especialización.* (eds. I.M. Cuadrado; M.C. García; M.M. Fernández). Ed. FIAPA. Almería. pp. 209-224. ISBN: 84-88246-24-2.
- REQUENA, J.I. (2005). Etiquetado y requisitos legales del material vegetal: semillas y plántulas. *In: Dirección Técnica de Semilleros Hortícolas. Curso de especialización.* (eds. I.M. Cuadrado; M.C. García; M.M. Fernández). Ed. FIAPA. Almería. pp. 25-50. ISBN: 84-88246-24-2.
- ROJO, C. (2005). Acondicionamiento osmótico de simientes de girasol (*Helianthus annuus* L.) para el avance de la germinación en siembras precoces para zonas áridas. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, 262 p.
- SÁNCHEZ, A.; ORTA, R.; MUÑOZ, B. (2001). Tratamientos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*, 25: 67-92.
- SCHWEISGUTH, B. (1976). L'oignon. Chapitre II: le matériel vegetal. INVUFLEC. Paris. pp 27-44.
- SIVRITEPE, H.O.; SIVRITEPE, N. (2007). NaCl Priming Affects Salt Tolerance of Onion (*Allium cepa* L.) Seedlings. *Acta Horticulturae*, 729: 157-161
- SZAFIROWSKA, A.; GRZESIK, M.; HABDAS, H.; STANIASZEK, M. (2002). Improving Germination and Vigour of Aged and Stored Onion Seeds by Matricconditioning. *Acta Physiologiae plantarum*, 24: 167-171.
- TARQUIS, A.M. (1990). Efecto del pretratamiento de semillas (*Lactuca sativa* L.) sobre la germinación y vigor. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica, Madrid.
- TERENTI, O. (2004). Calidad de semilla, lo que implica y como evaluarla. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental San Luis. San Luis, Argentina. <http://www.inta.gov.ar/sanluis/info/tematica/>.
- TORRES, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1990). Effect of seed size on the germination and vigour of sunflower. *Agricultura Mediterranea*, 120: 220-225.
- TRIGO, M.F.O.O.; NEDEL, J.L.; TRIGO, L.F.N. (1999). Condicionamento em sementes de cebola: Efeitos sobre a germinação. *Scientia Agrícola*, 56: 1059-1067.

ANEXO I: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

I.1. TRATAMIENTO HORMONAL

Tabla 16. Análisis de varianza (ANDEVA) del T₂₅ (días) de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) según la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	5	3,814	0,763	6,99*
Error	6	0,655	0,109	
Total	11	4,469		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 17. Análisis de varianza de la velocidad de germinación (días⁻¹) de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) según la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM
Concentración	5	10,717	2,143*
Error	6	2,22	0,37
Total	11	12,937	

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 18. Análisis de varianza de uniformidad de germinación de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) según la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	5	152,28	30,46	6,1*
Error	6	29,97	5	
Total	11	182,2		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 19. Análisis de varianza del índice de Timpson de las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) según la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	5	19206	3841	5,99*
Error	6	3845	641	
Total	11	23051		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

I.2. ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO

Tabla 20. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día seis de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las disoluciones (agua desionizada, KNO₃ 0,1 y 0,3 M). FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Disolución	2	12,67	6,33	0,11ns
Tiempo	2	278	139	2,33ns
Disolución·Tiempo	4	583,33	145,83	2,45ns
Error	27	1609	59,59	
Total	35	2483		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 21. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día doce de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las disoluciones (agua desionizada, KNO₃ 0,1 y 0,3 M). FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Disolución	2	80,67	40,33	0,87ns
Tiempo	2	474	237	5,11*
Disolución·Tiempo	4	411,33	102,83	2,22ns
Error	27	1253	46,41	
Total	35	2219		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 22. Análisis de varianza de VG (días⁻¹) de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las disoluciones (agua desionizada, KNO₃ 0,1 y 0,3 M). FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Disolución	2	7,421	3,71	2,09ns
Tiempo	2	85,711	42,855	24,13***
Disolución·Tiempo	4	20,144	5,036	2,84*
Error	27	47,96	1,776	
Total	35	161,236		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 23. Análisis de varianza del coeficiente de uniformidad de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las disoluciones (agua desionizada, KNO₃ 0,1 y 0,3 M). FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Disolución	2	38,57	19,29	1,25ns
Tiempo	2	1204,11	602,06	39,16***
Disolución·Tiempo	4	122,19	30,55	1,99ns
Error	27	415,08	15,37	
Total	35	1779,96		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 24. Análisis de varianza del índice de Timpson de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las disoluciones (agua desionizada, KNO₃ 0,1 y 0,3 M). FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Disolución	2	5281	2640	0,77ns
Tiempo	2	32289	16144	4,73**
Disolución·Tiempo	4	36189	9047	2,65ns
Error	27	92193	3415	
Total	35	16595		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 25. Análisis de varianza del coeficiente de uniformidad de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según los tratamientos realizados. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamiento	18	17711,3	984	26,22***
Error	57	2138,9	37,5	
Total	75	19850,1		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 26. Análisis de varianza de VG (días⁻¹) de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según los tratamientos realizados. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamiento	18	1087,41	60,41	33,71***
Error	57	102,15	1,79	
Total	75	1189,5		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 27. Análisis de varianza del índice de Timpson de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según los tratamientos realizados. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamiento	18	2292773	127376	51,39***
Error	57	141286	2479	
Total	75	2434058		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

I.3. ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO

I.3.1. FRACCIÓN DE SEMILLAS LIGERAS

Tabla 28. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día seis de la fracción de semillas ligeras de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las proporciones semilla: matriz: agua. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Proporción	2	7	3,5	0,1ns
Tiempo	1	748,17	748,17	20,62***
Proporción·Tiempo	2	10,33	5,17	0,14ns
Error	18	653	36,28	
Total	23	1418,5		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

I.3.2. FRACCIÓN DE SEMILLAS PESADAS

Tabla 29. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día seis de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las proporciones semilla: matriz: agua. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Proporción	2	470,22	235,11	28,05***
Tiempo	2	2164,22	1082,11	24,57***
Proporción·Tiempo	4	983,11	245,78	5,58**
Error	27	1189	44,04	
Total	35	6806,56		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 30. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día doce de la fracción de semillas pesadas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la duración y las proporciones semilla: matriz: agua. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Proporción	2	20,22	510,11	11,38***
Tiempo	2	2664,22	1332,11	29,72***
Proporción·Tiempo	4	315,78	78,94	1,76ns
Error	27	1210	44,81	
Total	35	5210,22		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

I.4. SEPARACIÓN DE SEMILLAS

Tabla 31. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día 6 de de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción y la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	1	1,53	1,53	0,02ns
Fracción	3	1921,34	640,45	10,2***
Concentración·Fracción	3	199,09	66,36	1,06ns
Error	24	1506,75	62,78	
Total	31	3628,72		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 32. Análisis de varianza del porcentaje de germinación al día 12 de de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción y la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	1	108,78	108,78	2,64ns
Fracción	3	5361,84	1787,28	43,34***
Concentración·Fracción	3	87,34	29,11	0,71ns
Error	24	989,75	41,24	
Total	31	6547,72		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 33. Análisis de varianza de VG (días⁻¹) de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción y la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	1	7,3153	7,3153	12,66**
Fracción	3	4,8984	1,6328	2,82ns
Concentración·Fracción	3	5,7684	1,9228	3,33*
Error	24	13,8725	0,578	
Total	31	31,8547		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 34. Análisis de varianza del coeficiente de uniformidad de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción y la concentración en GA₃. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	1	90,182	90,182	9,98**
Fracción	3	67,533	22,511	2,49ns
Concentración·Fracción	3	84,431	28,144	3,12*
Error	24	216,828	9,034	
Total	31	458,957		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 35. Análisis de varianza del índice de Timpson de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción y la concentración en GA₃.FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Concentración	1	351	351	0,13ns
Fracción	3	224841	74947	28,09***
Concentración·Fracción	3	8577	2859	1,07ns
Error	24	64029	2668	
Total	31	297798		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 36. Análisis de varianza de VG (días⁻¹) de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción obtenidas con la corriente de aire forzado. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Fracción	3	9,647	3,216	5,1*
Error	12	7,573	0,63	
Total	15	17,219		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 37. Análisis de varianza del coeficiente de uniformidad de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción obtenidas con la corriente de aire forzado. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Fracción	3	137,44	45,81	4,98*
Error	12	110,35	9,2	
Total	15	247,79		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)

Tabla 38. Análisis de varianza del índice de Timpson de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) del Lote 1 según la fracción obtenidas con la corriente de aire forzado. FV, Fuentes de variación; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM, cuadrados medios; F, prueba F de Fisher y P, probabilidad.

FV	GL	SC	CM	F
Fracción	3	92069	30690	13,58***
Error	12	27120	2260	
Total	15	119189		

ns diferencias no significativas

* diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

** diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$)

*** diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$)