

Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres

Proyecto Banco de Semillas de Boyacá, Colombia.

Junio de 2018 V1.2



Autores:

Alice Di Sacco; Michael Way (Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido)

Pedro León Lobos (Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile)

Carlos Ivan Suarez Ballesteros (Jardín Botánico de Bogotá, Colombia)

Reconocimientos

Texto derivado de publicaciones anteriores:

- Ana Sandoval S.
- Gustavo Bolados C.
- Marcelo Rosas C.
- Darian Stark S
- Kate Gold

Imagenes derivados de publicaciones anteriores:

- Jorge Berríos
- Jojo Way
- Francisco Ramos

Instituciones involucradas

- Royal Botanic Gardens Kew
- Instituto de Investigaciones Agropecuarias
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt

Cita Bibliografía Correcta:

Di Sacco, A; Way, M; Leon Lobos, P. y Suarez Ballesteros, C.I. (2018) **Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres**. V1.2. Royal Botanic Gardens Kew.

Disponible en <http://brahmsonline.kew.org/msbp/Training/Resources>

Autoriza la reproducción total o parcial citando la fuente y/o autores

Table of Contents

1. Introducción / Prólogo.....	6
Para qué recolectar semillas	6
Bancos de semillas y conservación ex situ	7
La conservación de semillas de plantas silvestres en Colombia	8
Proyecto piloto de desarrollo de capacidad	8
2. Planificación de recolección de semillas.....	9
2a. Selección de las especies	10
2b. Selección de las áreas de recolección.....	11
2c. Preparación de materiales y equipamiento.....	12
2d. Permisos de acceso.....	12
2e. Programación de la expedición.....	13
Grupo de recolección	14
Época y duración de las expediciones	15
3. Recolección de semillas	15
3a. Evaluación de poblaciones.....	16
3b. Evaluación de la madurez de las semillas.....	16
3c. Evaluación de la calidad física de las semillas	18
3d. Tamaño y representatividad de la muestra a recolectar.....	19
Recomendaciones generales de muestreo para recolección de semillas	20
3e. Métodos de recolección de semillas	21
Cosecha de los frutos a mano	22
Apretar la panícula o espiga con la mano y deslizarla hacia arriba	22
Cortar ramas con frutos	22
Sacudir o golpear las ramas para desprender frutos o semillas	23
Recolección de semillas del árbol vía escalamiento	23
Línea de tiro	23
Recolectar desde el suelo	24
4. Recolección de datos asociados	25
4a. Ficha de recolección.....	25
4b. Asignación de número de colecta.....	26
4c. Recolección de muestras de herbario.....	26
4d. Recolección de muestras para estudios moleculares.....	28
5. Manejo post-cosecha de las semillas recolectadas – durante la expedición	29

5a. Semillas inmaduras, o posiblemente recalcitrantes	29
5b. Frutos carnosos.....	29
5c. Frutos secos o semillas.....	29
6. Procesamiento de las semillas – después de la expedición	30
6a. Registro, identificación y clasificación de la muestra	30
6b. Evaluación de la madurez de las semillas	31
6c. Limpieza de las semillas	32
Frutos secos dehiscentes	32
Frutos secos indehiscentes	33
Frutos carnosos	33
Semillas mucilaginosas	34
Separación de los desechos	34
6d. Prueba de corte para determinar la calidad de las semillas.....	34
6e. Conteo de semillas.....	35
7. Pruebas de viabilidad.....	37
7a. Ensayo de germinación	37
7b. Prueba de tetrazolio	40
8. Almacenamiento de semillas.....	41
8a. Secado de las semillas.....	42
Medición de la humedad relativa de equilibrio (HRe) de las muestras de semillas utilizando un higrómetro	45
8b. Almacenamiento.....	46
Extracción y devolución de objetos desde y hasta un cuarto frío a -20°C	46
9. Manejo de los datos	47
Bibliografía	48
Anexo 1. Materiales y equipamiento	52
1a. Para la recolección de semillas y herbarios	52
1b. Para el procesamiento y almacenamiento de semillas	53
Anexo 2. Fichas de campo	54
2a. Ficha de evaluación previa a la recolección.....	54
2b. Ficha de recolección	55
Anexo 3. Hojas de seguimiento, de resumen y de uso de las accesiones	56
3a. Hoja de seguimiento	56
3b. Hoja de resumen.....	57

3c. Hoja de uso.....	58
Anexo 4. Familias que contienen especies con semillas con dormancia física	59
Anexo 5. Ejemplo de ficha de germinación.....	60
Anexo 6. Ejemplo de ficha de análisis de tetrazolio.....	61
Anexo 7. Salud y seguridad.....	62
Anexo 8. Categorías de almacenamiento de semillas.....	63
Anexo 9. Recolección de tejidos biológicos	65
Anexo 10. Preparación de agar.....	66

1. Introducción / Prólogo

El objetivo **del presente manual** es entregar conocimientos básicos y herramientas metodológicas que sirvan de guía a las personas e instituciones interesadas en recolectar y conservar semillas de plantas silvestres. Se pretende que los potenciales recolectores y curadores de semillas aprendan a:

- Seleccionar y priorizar las especies para su recolección de semillas.
- Preparar y organizar expediciones de recolección de semillas.
- Identificar y evaluar poblaciones de especies priorizadas potenciales a ser recolectadas.
- Recolectar semillas, muestras de herbario e información asociada.
- Extraer, limpiar, procesar semillas, evaluar su calidad y viabilidad.
- Manejar en forma apropiada las muestras de semillas recolectadas.
- Almacenar las semillas optimizando su calidad y uso futuro

Los autores han revisado y utilizado material libremente de los manuales INIA-Kew Boletín INIA N° 280 (León-Lobos *et al*, 2014) y Boletín INIA N° 110 (Gold *et al*, 2004), las guías de colecta y fichas técnica de información del Millennium Seed Bank Partnership (MSBP), para generar esta publicación.

Para qué recolectar semillas

La conservación *ex situ* de especies vegetales adquiere cada día más relevancia como parte de una estrategia integrada para conservar la diversidad biológica existente en el mundo. Las actividades agrícolas, forestales y mineras así como las ciudades, complejos turísticos e industriales están expandiendo aceleradamente sus fronteras, generando degradación de ecosistemas naturales, pérdida de hábitats y, como consecuencia, la extinción local de especies. Esto sin contar con otros factores, como la constante degradación por pastoreo, desertificación, especies exóticas invasoras y el cambio climático. Los bancos de semillas y los jardines botánicos son los métodos más usados para conservar *ex situ* la diversidad biológica vegetal. Los primeros, en particular, permiten conservar por mucho tiempo y en un espacio reducido muestras representativas de diversidad genética de una gran cantidad de especies de plantas.

La semilla, la unidad básica de reproducción en plantas, es la forma más práctica y eficiente para recolectar, transportar, estudiar y almacenar la diversidad vegetal, por corresponder a un estado compacto, resistente e independiente dentro del ciclo de vida de una planta. Cada una de ellas es, potencialmente, un nuevo individuo que contiene parte de la variabilidad genética presente en toda una población. No obstante, el conjunto de semillas producidas en un año determinado, contiene toda o gran parte de la diversidad genética constituyente de la población original. Es así como las muestras de semillas de alta calidad pueden representar la diversidad genética de una población de plantas desde donde fueron recolectadas y proveer materiales para conservación *ex situ* (conservación fuera del hábitat natural, por ejemplo en bancos de semillas). La mayoría de las especies de plantas estudiadas a la fecha tienen semillas, cuya latencia natural y tolerancia a la desecación, permiten que sean almacenadas por varias décadas, sin que su viabilidad se deteriore en forma significativa.

Mantener muestras representativas de semillas adecuadamente preservadas y disponibles, facilitará su incorporación dentro de planes integrados de conservación *ex situ*, aumentando así su impacto potencial, en restauración ecológica y reintroducción de poblaciones al proveer material para propagación, multiplicación y estudios de diversidad genética (IUCN/SSC (2014).

Bancos de semillas y conservación *ex situ*

Se estima que de las 250.000 a 300.000 especies de plantas existentes en el mundo, cerca de un 20% están amenazadas (RBG Kew 2016). Más del 80% de las especies amenazadas es por causa directa de la acción humana. Según modelos climáticos, en promedio, un 14% de la flora mundial se extinguiría a causa del cambio climático al año 2100 (Maclean y Wilson 2011), siendo América del Sur la región con la mayor probabilidad de extinción, cercana a un 25% de su flora (Urban 2015).

Con los recursos y condiciones actuales, la conservación *in situ* no permite asegurar la supervivencia de todas las especies en peligro de extinción —en todos los países las áreas protegidas abarcan sólo una fracción de los hábitats de especies amenazadas, haciendo esto difícil y más complejo de cumplir con las Metas Aichi y las metas asociadas al Objetivo Nº 15 para el Desarrollo Sostenible acordados por la Naciones Unidas. Por ello el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), reconoce la necesidad de complementar la conservación *in situ* con medidas de conservación *ex situ*. En el caso de las especies raras, en alto riesgo de erosión genética o en extinción, la conservación *ex situ* puede ser la única forma de conservarlas. Para otras especies, la conservación *ex situ* sirve como una medida complementaria a los métodos de conservación *in situ*.

Los bancos de semillas representan uno de los métodos más efectivos de conservación *ex situ*. La conservación en bancos de semillas consiste en secar las semillas hasta bajos niveles de humedad y almacenarlas a temperaturas bajo cero.

Este método es apto para la gran mayoría de especies (cerca de 92%; Wyse & Dickie 2017) cuyas semillas toleran la desecación (Ortodoxas; Roberts 1973). Las semillas de otras especies, menos representadas en la flora, toleran parcialmente (Intermedias; Ellis et al. 1989) o no toleran la desecación (Recalcitrantes; Roberts 1973). Estas últimas se conservan *ex situ* por otros métodos (por ejemplo, *in vitro*, criopreservación), los cuales no serán abordados en el presente manual. Las semillas ortodoxas pueden sobrevivir décadas e incluso siglos, conservadas a baja humedad y temperatura. Por esto, representa una medida segura de respaldo de la diversidad genética contra la pérdida de poblaciones *in situ*.

Además de ser muy eficiente en términos de tiempo y espacio (gran número de especies y poblaciones conservadas en espacio reducido y por largo tiempo), los bancos de semillas conservan muestras de germoplasma en forma conveniente y accesible y generan información (p.ej. protocolos de germinación y propagación) que facilita la utilización posterior del material conservado.

La conservación de semillas de plantas silvestres en Colombia

Dentro de los 74 ecosistemas naturales reconocidos por el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SIB), las 22.000 plantas en la flora colombiana colocan al país como segundo a nivel mundial por diversidad de plantas, aunque se estima que 798 especies de plantas están actualmente amenazadas. La flora del páramo resulta particularmente rica de diversidad florística. Según Luteyn (1999), el páramo de centro y sur America, aunque a nivel de género no tiene alto nivel de endemismo, y no hay algunas familias endémicas, el nivel de endemismo a nivel de especies es muy alto (60%). Por esta razón, y por la pérdida de hábitat por causa de la agricultura y la minería, y las preocupaciones sobre el impacto del cambio climático en este frágil ecosistema, el páramo se ha convertido en una prioridad especial para la conservación.

Los páramos como área geográfica se localizan en el norte de la cordillera de los Andes, extendiéndose en las regiones más altas del norte del Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela con algunas ramificaciones en Costa Rica (Monasterio 1980). Este se localiza arriba de los bosques montanos, entre el límite arboleo y el límite de las nieves perpetuas, aproximadamente entre 3.200 y 4.500 m de altitud, ocupando el 4,3% de los Andes de Colombia. Las familias más importantes en este ecosistema son Asteraceae, Orchidaceae, Poaceae, Melastomataceae, Bromeliaceae y Ericaceae (Bernal et al. 2016).

El germoplasma de especies de interés agrícola de Colombia está conservado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), que incluye accesiones de semilla, *in vitro* y en campo con fines de investigación y mejoramiento genético. La experiencia técnica en bancos de germoplasma de especies agrícolas también está disponible en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), que es parte de la red CGIAR. Sin embargo, no existen capacidades de escala significativa en la conservación de germoplasma, especialmente semillas, de la flora nativa y endémica de Colombia. Dado lo anterior, la participación de instituciones colombianas en el programa Millennium Seed Bank Partnership liderado por los Jardines Botánicas Reales Kew, aceleraría la recolección y conservación en los bancos de semillas de las especies de plantas silvestres.

Proyecto piloto de desarrollo de capacidad

El Programa Nacional “Colombia Bio” fue establecido por el gobierno colombiano en el Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018 con el objetivo principal de promover un uso económico sostenible de los recursos de biodiversidad de Colombia. Este Programa ofrece una oportunidad única para que las organizaciones en Colombia lleven a cabo investigaciones sobre biodiversidad y servicios ecosistémicos en partes del país que aún no han sido adecuadamente exploradas.

El Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (Instituto Humboldt) es la organización gubernamental cuya misión es promover, coordinar y realizar investigación que contribuya al conocimiento, la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad como un factor de desarrollo y bienestar de la población colombiana. El Instituto Humboldt trabaja en red con múltiples organizaciones nacionales, con capacidad para incidir en la toma de decisiones y en las políticas públicas en Colombia. El Instituto Humboldt se encarga de realizar, en el territorio

continental de la Nación, la investigación científica sobre biodiversidad, incluyendo los recursos hidrobiológicos y genéticos. Así mismo, coordina el SIB de Colombia y la conformación del inventario nacional de la biodiversidad.

Los datos de especímenes de herbario georreferenciados, disponibles en SIB sugieren que la biodiversidad de Boyacá ha sido poco explorada con respecto a las otras regiones del País. En particular, debido a falta de exploración botánica, no está claro el número de taxa endémicos de la flora del páramo (Luteyn 1999). Además, aunque tiene el Jardín Botánico de Bogotá un banco de semillas el cual se enfoca en semillas de páramo y bosque altoandino, no existe un banco de semillas regional para conservar en forma segura la diversidad genética de las especies amenazadas, endémicas y útiles de Boyacá, y para apoyar la restauración ecológica y la bio-economía en desarrollo del país.

En 2017-2018, los científicos de Kew apoyaron técnicamente a contrapartes del Instituto Humboldt y Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) en Colombia para establecer las capacidades técnica y científica para la conservación en bancos de semillas de la flora de Boyacá, con enfoque en el bioma de Páramo. Este proyecto piloto emprendido por Kew y Instituto Humboldt, con el apoyo del *Department for Business, Energy and Industrial Strategy* (BEIS) del Reino Unido y Colciencias, se centró en:

1. Desarrollar conocimiento científico en la recolección, conservación y evaluación de semillas de la flora silvestre prioritaria de Boyacá;
2. Fortalecer la capacidad de las infraestructuras nacionales para evaluar y almacenar las accesiones de semillas de acuerdo con los estándares internacionales; y
3. Recolectar y conservar muestras de semillas de 50 especies prioritarias, como plan piloto.

El propósito detrás de este proyecto piloto desarrollado por el Instituto Humboldt en conjunto con el MSBP Kew es promover el desarrollo y establecimiento de proyectos a largo plazo para la conservación *ex situ* y el uso sostenible del capital natural colombiano.

2. Planificación de recolección de semillas

Los objetivos de la recolección de semillas deben estar claros desde el comienzo, ya que en ellos se sustenta el proceso de planificación, estrategias a seguir, las técnicas y la logística de las expediciones, así como también, el resto de las etapas que siguen al proceso de recolección. El objetivo de este proceso es obtener muestras de semillas de alta calidad, en la que se debe capturar la diversidad genética de la población muestreada, procurando además que la calidad fisiológica de las semillas sea la mejor. Contar con una alta diversidad genética en las muestras de semillas, otorga mayores posibilidades de éxito a largo plazo en los programas de restauración ecológica.

Muestras de semillas de alta calidad pueden ser utilizadas para múltiples propósitos, como conservación *ex situ*, jardines botánicos, restauración ecológica, investigación, entre otros. Semillas recolectadas sin estas consideraciones, podrían tener sólo estrechas aplicaciones.

Los programas de recolección de recursos genéticos cultivados y forestales se han enfocado corrientemente en la selección de ciertas características, seleccionando fenotipos ("plus") y luego genotipos particulares ("elite"), relacionados con el mejoramiento de la producción. Esta selección

provoca un estrechamiento de la diversidad genética hacia estas características deseables. Sin embargo, las características superiormente productivas, no siempre se relacionan con las características que las especies necesitan para adaptarse al ambiente y sus constantes cambios. Cuando se pretende recolectar semillas de plantas silvestres para conservación, se debe tener clara esta base teórica, para orientar los esfuerzos hacia la obtención de diversidad genética representativa de las poblaciones, tratando de maximizar su representatividad en el material recolectado.

Las plantas silvestres, a diferencia de las variedades cultivadas mejoradas, pueden contener una amplia diversidad genética en sus poblaciones naturales. Es por esto que una muestra representativa de una población puede contener suficiente diversidad genética para ser utilizada en conservación o investigación, o incluso puede intentar recrear la población original, en caso que ésta se extinga. Sin embargo, para especies con amplios rangos de distribución geográfica, será necesario planificar muestreos en varias poblaciones a lo largo de su distribución, para intentar capturar una mayor diversidad. Poblaciones ubicadas en sus límites de distribución podrían contener interesantes adaptaciones que podrían no estar representadas en las poblaciones más centrales.

2a. Selección de las especies

Las especies deben elegirse primero según los criterios acordados, tales como la rareza/endemismo, el estado de conservación y su utilidad, tomando en cuenta datos sobre el potencial comportamiento de sus semillas en almacenamiento. Las semillas ortodoxas, pueden sobrevivir al proceso de almacenamiento en bancos de semillas (más informaciones en el Anexo 8), sin embargo, otras medidas como la preservación *in vitro* o

jardines botánicos se necesitarán para preservación de germoplasma no ortodoxa. La decisión de recolectar una especie en particular también puede basarse en su abundancia, accesibilidad y tiempo de dispersión de sus semillas. También se puede tomar en cuenta si está actualmente ausente en las colecciones *ex situ* actuales. Esto se puede saber a través de un 'gap análisis' cruzando las localidades de ejemplares de herbario, con los orígenes de colecta de las accesiones de germoplasma.

Maunder et al (2004) propone 5 criterios técnicos claves para priorizar especies para incluirlas en un plan de conservación *ex situ*, denominados "criterios E": En Peligro de extinción, Endemismo (especies únicas a un país o región), Económico (especies de valor económico y social local), Ecológico (especies que cumplen un rol clave en mantener procesos ecológicos), Emblemático (especies insignia usadas para promover la conservación de hábitat). La posición o unicidad filogenética también es un criterio importante de priorización de especies.

En el caso que se desconozca el estado de conservación de las especies, otros criterios técnicos adicionales deben ser usados para priorizar, como son la amenaza inminente de pérdida de la población, la intensidad y magnitud de los factores de amenazas, el grado de erosión de ecosistema, el número de individuos y poblaciones remanentes entre otros.

2b. Selección de las áreas de recolección

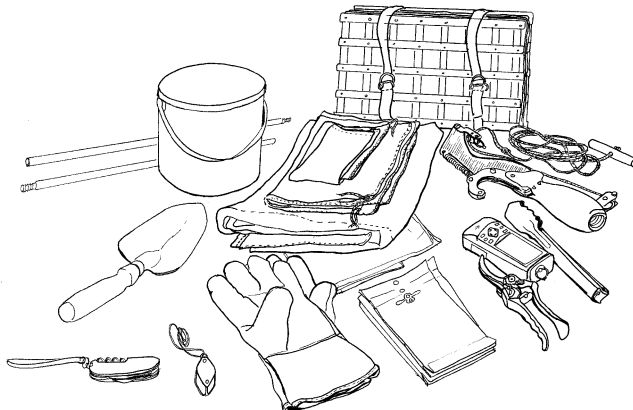
Las recolecciones de especies objetivo deben realizarse a partir de poblaciones naturales dentro del rango de distribución natural de las especies. Es importante que se recolecte de hábitats naturales o semi-naturales que no hayan sido plantados o cultivados con las especies objetivo. Busque señales de manejo, tales como patrones organizados de siembra o misma clase de edad de las plantas. Se recomienda realizar una visita prospectiva a los sitios antes de recolectar las semillas. Al momento de prospectar, podrá confirmar la identificación de la especie, recolectar especímenes de herbario cuando esté en flor y monitorear la madurez de las semillas. Esta información le será de mucha utilidad para definir la fecha de recolección, de modo que podrá recolectar semillas en el momento que estas se estén dispersando naturalmente.

Es importante incluir información sobre el rango de distribución de las especies, distribución y estructura espacial de las poblaciones y comunidades, además de información geográfica que caracterice los diferentes hábitats. Esta información facilitará la identificación y caracterización de las áreas a prospectar, intentando abarcar la mayor cantidad de condiciones ambientales considerando su rango altitudinal, latitudinal, ambiental, y aumentando la posibilidad de capturar mayor diversidad intraespecífica. De esta manera, si se considera por ejemplo, recolectar una especie en particular, con un enfoque geográfico, se pueden ubicar de forma sistemática las distintas poblaciones a prospectar, abarcando la mayor diversidad genética de la especie.

Si el objetivo de la recolección es obtener semillas para fines de restauración ecológica, el origen o procedencia de la muestra de semillas, junto a su diversidad genética, son criterios claves de considerar al momento de planificar la recolección. Si este es el caso, se recomienda recolectar semillas de poblaciones cercanas al sitio a restaurar, para así aprovechar la adaptación local (mejor sobrevivencia y crecimiento) del germoplasma. En caso de no disponer de suficientes fuentes locales de semillas, como pocos individuos en poblaciones muy fragmentadas, la opción es localizar dentro del rango de distribución de la especie, idealmente dentro de áreas relativamente cercanas al sitio a restaurar, poblaciones que cumplan, presenten o estén sometidas a similares características ambientales de la población original. En todo caso es recomendable recolectar las pocas semillas obtenidas de la fuente local. Independiente de lo anterior, se recomienda recolectar semillas de la mayor cantidad posible de poblaciones a lo largo del rango de distribución natural de las especies, sobre todo pensando conservar y disponer germoplasma para restauración ecológica en escenarios de cambio climático futuro.

2c. Preparación de materiales y equipamiento

Para realizar una expedición de recolección en forma adecuada, se requiere considerar una amplia gama de materiales, insumos y equipos, adaptada a las condiciones ambientales, el clima, y los hábitats a visitar. Para la recolección de semillas, muestras de herbario, material para análisis de ADN, y para la captura de datos, se necesitan insumos y materiales específicos, además de algunos equipos específicos básicos como GPS y cámara fotográfica de calidad, con



buen mantenimiento y con personal experto en su uso. Para las actividades relacionadas, como navegación, cartografía, identificación de especies, toma de fotos, etc., el grupo de la expedición puede asignar y distribuir responsabilidades para adquirir, mantener, usar y cuidar estos equipos. Si el vehículo cuenta con adaptador toma corriente y el lugar de hospedaje cuenta con electricidad, se puede llevar un cargador para pilas, y también llevar datos e imágenes digitales en laptop o tablet para apoyar la toma de decisiones en el campo sobre identificación y ruta a seguir. Es aconsejado llevar cajas o recipientes vacíos las que sirven para mantener ordenadas las muestras colectadas durante la expedición. En el Anexo 1a se entrega una lista detallada de los materiales, insumos y equipos esenciales, con el fin de facilitar la preparación logística de la expedición de recolección.

2d. Permisos de acceso

Toda recolección de semillas y de cualquier otro material biológico debe estar sujeta a las leyes y reglamentos nacionales, locales y a los acuerdos internacionales. Los permisos correspondientes deberán ser tramitados con las instituciones públicas encargadas. A partir de la Convención sobre la Diversidad Biológica (CDB), de 1992, muchos países tienen iniciativas legales para regular el acceso a los recursos genéticos. La CDB, define un marco acordado internacionalmente para el manejo nacional de acceso a los recursos genéticos y participación en beneficios. Dependiendo de la legislación nacional, todas las entidades nacionales y locales (p.ej. comunidades indígenas y locales, propietarios de la tierra, científicos y agencias gubernamentales) pueden participar en las decisiones sobre qué recursos genéticos pueden ser recolectados, así como en los términos para compartir los potenciales beneficios que surjan de su investigación y utilización. También están avanzando en normativas locales, por lo que constantemente se debe estar actualizando el conocimiento de éstas a través de los organismos públicos competentes u organizaciones locales, para tramitar los permisos necesarios. En estos casos es importante tener presente y demostrar que las metodologías empleadas en la recolección de semillas contribuyen a la conservación de las especies en lugar de transformarse en una amenaza contra las poblaciones.

Cada país, además tiene estipulado en su normativa los derechos de propiedad. En el caso de Colombia y los miembros de la Comunidad Andina, se necesita el consentimiento previo fundamentado de los proveedores de los recursos genéticos, y normalmente un convenio firmado

con una agencia gubernamental. En estos casos el proveedor de las semillas (recurso genético) por lógica es el propietario de la tierra, ya sea público o privado, donde se localiza la(s) especie(s) a recolectar. Es necesario contar con autorización previa del propietario de la tierra antes de ingresar a recolectar, así se respeta el derecho de propiedad y se evitan potenciales peligros y conflictos. Cualquier acceso al conocimiento tradicional de los proveedores (p.ej. el uso tradicional, valor, y nombre común de las plantas lo que no se ha publicado hasta ahora) debe seguir las reglamentos nacionales, las normas establecidas por las agencias nacionales y de las comunidades las mismas.

En caso que el material recolectado vaya a ser utilizado en investigaciones fuera del país, comienzan a regir, además, otros acuerdos internacionales. Estos regulan el movimiento de material vegetal entre países. Uno de ellos, es la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), que controla el movimiento internacional de especies en Peligro de Extinción. Para las especies contenidas en sus listas, se requiere un certificado de exportación e importación de las autoridades nacionales competentes. Otro de los acuerdos internacionales se relaciona con las regulaciones fitosanitarias de los países, su fin es proteger la industria agropecuaria del ingreso de plagas y enfermedades. Es importante consultar a las autoridades competentes, por la lista de especies con restricción de ingreso al país, donde será enviado el material recolectado y solicitar los certificados respectivos.

2e. Programación de la expedición

Se recomienda planificar la expedición de colecta, utilizando información de localización geográfica y fenología de las especies priorizadas (Cuadro 1), además de información logística, como el tipo y condición de caminos, accesibilidad, topografía, etc. Este itinerario debe incluir las rutas principales a seguir, los sitios prioritarios de exploración y recolección, considerando los tiempos de viaje, descanso, búsqueda de información local, recolección y toma de datos, así como la recolección de ejemplares de herbario. Se deben además ubicar las probables fuentes de abastecimiento de combustible y de alimentación, así como lugares para alojamiento o camping. Se debe tener en cuenta el tiempo para el manejo inicial de post-cosecha de las semillas, la recolección y el tratamiento de muestras de herbario, así como el tiempo para el mantenimiento del vehículo, y para dialogar con los propietarios de las tierras, administradores de las áreas protegidas o las comunidades locales. Ver el Anexo 1a como indicación del material útil de llevar.

Este programa debe ser flexible ya que queda sujeto a las modificaciones que puedan encontrarse en terreno, variaciones meteorológicas o cualquier inconveniente que surja durante la expedición. Siempre evaluar la situación según las necesidades de seguridad que tiene prioridad sobre todo (ver el Anexo 7). Considerar las ventajas de hacer una prospección preliminar para establecer comunicación con los habitantes de la región y para actualizar la información botánica (véase sección 3a)

Especies	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic
<i>Holographis virgata</i> var. <i>glandulifera</i>												
<i>Justicia insolita</i> var. <i>insolita</i>												
<i>Justicia insolita</i> var. <i>tastensis</i>												
<i>Justicia palmeri</i>												
<i>Justicia purpusii</i>												

Cuadro 1. Ejemplo de una tabla fenológica compilada a través de los ejemplares de herbario de México. Las celdas verdes indican los meses con disponibilidad de flores y las celdas naranjadas la disponibilidad de frutos.

Grupo de recolección

Para recolectar semillas se requiere experiencia y preparación, no sólo en la identificación de las especies, preparación de ejemplares de herbario o descripción del hábitat, también se requieren conocimientos generales en fisiología de semillas y detallados en técnicas de recolección y manejo de semillas, además de experiencia y compatibilidad con el trabajo en terreno, conducción de vehículos 4 x 4, preparación de campamentos, primeros auxilios, etc. Debido a estas razones, la recolección debe ser un trabajo coordinado en equipo, en donde la experiencia de los integrantes puedan complementarse adecuadamente. Al inicio del trabajo de campo, el equipo debe discutir y analizar los riesgos principales y las medidas de seguridad. Por seguridad y rápida reacción ante una emergencia, se recomienda tener a mano y compartir los datos personales para contactos de familiares, personal médico y de seguridad ante una emergencia. Además, se recomienda anotar en una hoja cualquier condición médica del personal y guardarla dentro o cerca del botiquín de primeros auxilios (véase Anexo 7).

Se aconseja trabajar y desplazarse en grupos de 2 a 4 personas en un vehículo. Por seguridad se puede utilizar un segundo vehículo para expediciones en lugares remotos, por ejemplo, en los desiertos y montañas. Se recomienda no distanciarse demasiado de los otros miembros del grupo, de tal forma que siempre sean ubicables a simple vista. En algunas regiones se puede utilizar radio-comunicadores, para una comunicación frecuente entre los grupos, sin embargo, su uso no es recomendable en áreas post-conflicto. Lo que sí, es recomendable el uso de un teléfono satelital en áreas remotas y poco accesibles.

El éxito de la colecta, en términos número de accesiones recolectadas, puede ser variable y depende de varios factores entre los que cuentan la experiencia del grupo, la accesibilidad del terreno, la abundancia de la especie y la disponibilidad de semillas. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que, un equipo de dos personas es capaz de recolectar dos muestras bien documentadas por día como promedio.

Época y duración de las expediciones

La época y la duración de las expediciones de colecta dependen de varios factores, entre los que cuentan la accesibilidad, distancia, y tamaño de las poblaciones, el número de especies priorizadas, la productividad de semillas por individuo y población y, la experiencia del equipo de trabajo, entre otros factores. De todas maneras, se debe tener en cuenta durante la planificación que muchas veces una única expedición no será suficiente para cubrir todas las especies objetivo, sino que se requerirán realizar varias expediciones por temporada e incluso años al lugar de recolección. Primero, es necesario planificar salidas de prospección, en donde el principal objetivo es ubicar las poblaciones de las especies objetivo, o en otros casos, identificar las especies presentes en un área objetivo. Se aconseja que estas salidas se efectúen durante la temporada de floración, dado que es más fácil ubicar e identificar las especies con flores o estructuras reproductivas. En esta etapa es importante ubicar, describir y georeferenciar las poblaciones para volver cuando las semillas ya estén listas para ser cosechadas. Además, en esta etapa, se pueden tomar buenas muestras de herbario, junto con información ecológica y poblacional. Se recomienda registrar las informaciones de cada especie en una ficha como la del Anexo 2a (ficha de evaluación previa a la recolección).

De acuerdo al estado fenológico en que se encuentren las distintas especies, se puede estimar la fecha probable de recolección, aunque si se tiene suerte, en algunas de las salidas de prospección se podrían recolectar las primeras semillas. La fenología de las especies puede variar año a año, debido a las condiciones climáticas, pero se puede utilizar la información biológica disponible, por ejemplo en los ejemplares de herbarios, para estimar cuando ocurrirá la dispersión de las semillas. Las salidas de recolección deben ser previstas para la época de dispersión de semillas, para obtener semillas fisiológicamente maduras.

Las expediciones pueden durar unos pocos días, hasta varias semanas. En caso de expediciones muy largas, se deberá considerar el envío al laboratorio de las semillas y muestras de herbario recolectadas, esto al menos una vez por semana, con el fin de no exponerlas al deterioro en terreno. Para ello se deberá además contar con material suficiente para su embalado y envío, y se deberá escoger la vía más rápida de transporte.

3. Recolección de semillas

Las semillas recolectadas podrán, posiblemente, ser almacenadas en condiciones adecuadas por siglos, pero el tiempo que puedan sobrevivir dependerá en gran parte de su calidad y viabilidad inicial al momento de ingresarlas al banco de semillas. Esto a su vez dependerá de la madurez de las semillas al momento de su cosecha, los niveles de infestación por insectos u otros daños físicos y el manejo post-cosecha durante y después de la expedición.

Además de la calidad, el recolector también debe asegurarse que la cantidad de semillas existente en la población potencial sea suficiente para satisfacer los requerimientos de investigación, conservación y distribución, ya que esto influirá en la utilidad final de la recolección (Way & Gold, 2014a) [Technical Information Sheet 02](#).

3a. Evaluación de poblaciones

Prospección preliminar: Se recomienda realizar una prospección preliminar para ubicar la o las poblaciones potenciales, confirmar la identificación de la o las especies y determinar la época de producción de semillas para estimar la fecha de recolección. Para registrar los datos asociados a la muestra de semillas, se recomienda utilizar la Ficha de evaluación previa a la recolección reportada en el Anexo 2a. Si no es posible realizar una prospección preliminar, se puede consultar a lugareños o naturalistas locales para ubicar potenciales poblaciones de las especies prioritarias. Esta información debe ser complementada con datos de herbario, monografías, floras, etc. Todo esto ahorrará tiempo en el momento de la recolección.

Identificación botánica: Se debe identificar la especie a recolectar. Lo ideal es contar con un botánico experimentado dentro del equipo. También se puede utilizar guías botánicas, guías de colecta, y revisar imágenes digitales de los herbarios. Es fundamental que todos los miembros del grupo puedan reconocer y distinguir en terreno la especie a ser recolectada de otras especies similares.

Dimensión de poblaciones: Se necesita, estimar el tamaño y extensión geográfica de la población. Es decir, cuantos individuos adultos la componen y cuantos de estos están en floración/fructificación, su superficie, accesibilidad de individuos, etc. Esto permitirá definir adecuadamente una estrategia de muestro para recoger muestras adecuadas de la diversidad genética presente y que asegure una cantidad mínima de semillas. La accesibilidad de la población es otro factor a considerar, lo cual es importante para poblaciones de plantas localizadas en sectores de difícil acceso. El conocimiento de la accesibilidad permitirá evaluar el factor de riesgo y, en caso de ser necesario, utilizar equipo de seguridad y escalamiento.

Por otro lado, si la población ha sido perturbada, por ejemplo, por incendios, uso de herbicidas, etc., los recolectores deben tomar en cuenta que dichos eventos puede haber afectado la viabilidad y longevidad potencial de las semillas.



3b. Evaluación de la madurez de las semillas

El próximo paso es evaluar si la población está o no en la fase de dispersión natural. Hay que escoger con cuidado el momento de recolectar semillas con el fin de asegurar que éstas sean capaces de germinar, puedan tolerar el secado y alcanzar la máxima longevidad. El mejor indicador de estas cualidades no visibles es la dispersión natural.

¿Cómo se reconoce si la población está en la fase de dispersión natural?:

El recolector que tiene conocimiento específico de la especie reconocerá fácilmente dicha fase. Si no, tendrá que guiarse por la morfología de los frutos y semillas y, el probable método de dispersión natural. Cabe notar que los indicadores morfológicos no siempre son clarificadores, pero, en todo caso, pueden ser de utilidad para determinar el tiempo adecuado de recolección:

- a. En los frutos carnosos dispersados por animales como la uva camarona (*Macleania rupestris*), el pericarpio cambia de color (normalmente de verde a rojo o morado), la pulpa se vuelve suave y adquiere un olor característico.
- b. Los frutos tipo vainas y cápsulas se vuelven gradualmente más secos. En algunas especies, por ejemplo *Prosopis* spp. u otras leguminosas como el pajarito (*Crotalaria agatiflora*), se puede agitar los frutos y escuchar las semillas ya desprendidas dentro del fruto.
- c. Los frutos secos dehiscentes comienzan a abrirse y se encuentran algunas semillas en el suelo, ya dispersadas como ocurre con el chicalá (*Tecoma stans*).

Además de los frutos, las semillas también muestran señales o indicadores de madurez: la testa se pone más dura y cambia de color; el endosperma de suave, gelatinoso o lechoso, se vuelve firme y ceroso, y finalmente duro y seco en la fase de dispersión natural. La forma tradicional que los agricultores utilizan para comprobar el momento adecuado de cosecha, es presionar las semillas con la uña del dedo pulgar, para comprobar si está dura y resistente. Sin embargo, es altamente recomendable partir unas semillas utilizando una tijera e inspeccionar el contenido con una lupa (ver sección 3c, Prueba de Corte).

Dependiendo del tipo de dispersión natural de las especies (p.ej. por animales, viento, gravedad, etc.), algunas semillas pueden permanecer adheridas a la planta madre durante un largo período, aún después de que han alcanzado su madurez máxima. En casos extremos, podrían ser de la estación anterior. Mientras más tiempo permanezcan las semillas en la planta madre después de que se despeguen del fruto, menos viables van a estar, y menos tiempo permanecerán viables almacenadas en los bancos de semillas.

Por otro lado, para fines de conservación *ex situ*, no se recomienda recolectar semillas antes de la dispersión natural, porque si no están completamente maduras serán sensibles a la deshidratación y por eso no se podrán secar para almacenar en bancos de semillas (figura 1). Sin embargo, en algunos casos, si las semillas se encuentran cerca del momento de dispersión natural y los tejidos están completamente formados, es posible llevar a cabo una maduración post-cosecha para completar el proceso de desarrollo y maduración.

Para más informaciones consultar en Gold (2014). [Technical Information Sheet 04](#).

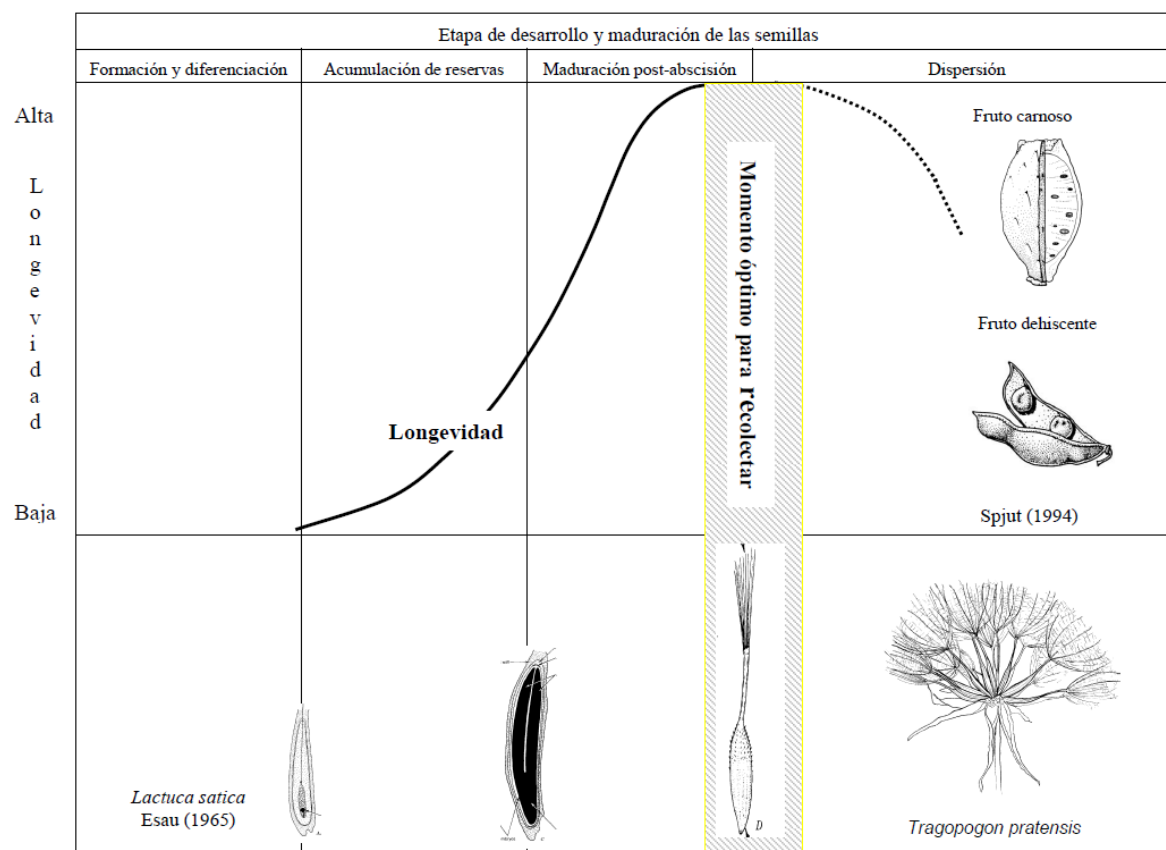


Figura 1. Diagrama de las fases de desarrollo y maduración de semillas

3c. Evaluación de la calidad física de las semillas

La proporción de semillas vacías, abortadas, mal formadas o infestadas variará según la especie, la población y el año.

Por estas razones es esencial que el recolector evalúe la calidad física de las semillas a través de una **prueba de corte** antes de realizar la recolección (figura 2). Esto le dará una idea de la cantidad de frutos o semillas a recolectar. Al mismo tiempo esta prueba servirá para darse cuenta de la madurez de las semillas. La prueba de corte consiste en seccionar semillas (10 a 20) utilizando tijeras podadoras, tijeras, cuchillos, navajas, cortaúñas o cualquier utensilio adecuado que permita partir las semillas (a veces son muy duras), para comparar el número de semillas llenas con el de las vacías, abortadas o infestadas. Una lupa de campo (10x o 20x) ayudará a esta inspección. Realizar la prueba de corte a frutos/semillas de varias plantas tomados al azar, para que la muestra sea representativa, al mismo tiempo permitirá dar una idea del aspecto general de semillas abortadas o infestadas, los que si es posible, deberán ser evitados durante la recolección. Registrar el resultado en la ficha de evaluación previa a la recolección (figura 3, Anexo 2a).

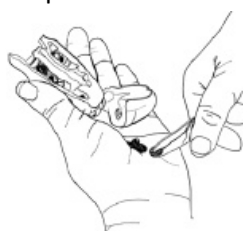


Figura 2. Prueba de corte en *Yucca* sp.

El resultado de la prueba de corte provee de un cálculo aproximado del número de semillas ‘llenas’ disponibles (ver sección 6d). Si la proporción de semillas vacías e infestadas es alta (p.ej. mayor a 30%), se deberá recolectar un número mayor para compensar la pérdida por esta vía. La prueba de corte permitirá además decidir si vale la pena o no realizar la recolección, ya que, si la proporción de semillas llenas es baja, tal vez sea necesario buscar otra población para recolectar. Esta decisión dependerá del esfuerzo y tiempo requerido para recolectar la cantidad de semillas deseada, así como la importancia y estado de conservación de la especie.

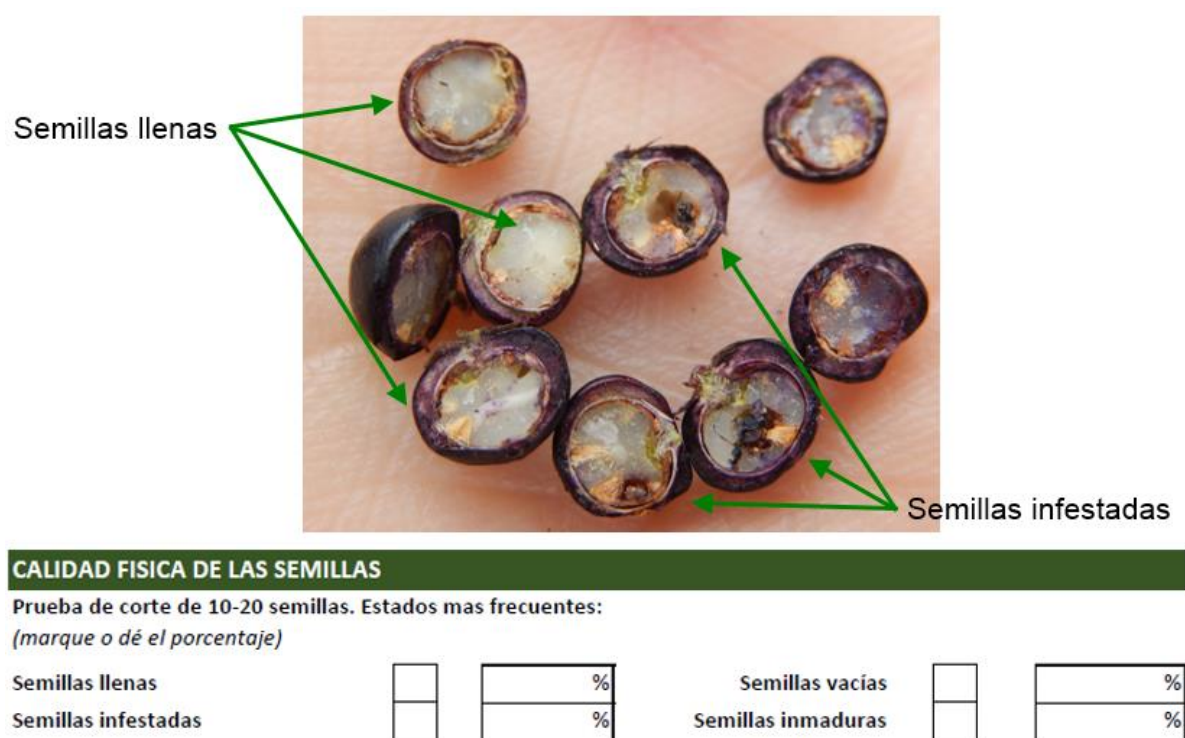


Figura 3. Ejemplo de prueba de corte en el campo y relativo cuadro en la ficha de evaluación previa a la recolección.

3d. Tamaño y representatividad de la muestra a recolectar

Tamaño ideal de una muestra: El tamaño ideal de una muestra para conservación a largo plazo es entre 10.000 a 20.000 semillas. En la práctica se recomienda, como mínimo, entre 3.000 y 5.000 semillas. Para especies raras y en peligro de extinción, dado a que son poblaciones pequeñas, una cantidad aceptable es de 500 a 1.000 semillas viables (cuadro 2). La cantidad de semillas de una muestra para fines de restauración ecológica o repoblamiento dependerá de la magnitud de cada una de estas medidas.

Limite a la colecta: Es importante que la recolección de semillas para fines de conservación *ex situ* o para cualquier fin, no ponga en peligro las poblaciones *in situ*. Se debe tomar no más del 20% de las semillas sanas disponibles en el momento de la recolección, esto para asegurar que haya suficientes semillas para la regeneración natural de la población, lo que es especialmente crítico para especies en peligro de extinción. Una excepción es cuando se requiere realizar un rescate de una población cuya destrucción por factores antropogénicos o naturales es inminente.

Otras opciones: Si la calidad no es adecuada o la cantidad no es suficiente se recomienda no recolectar. Se debe buscar otra alternativa, ya sea otra población de la misma especie o de otra especie.

Nº de semillas	Uso potencial
<300	Colectas excepcionales de especies extremadamente raras o amenazadas.
500	Para germinación, propagación, identificación y para muestrario.
1.000	Cantidad mínima para conservación y para llegar a establecer una población potencial representativa de la población original.
2.000	Para desarrollar además protocolos de germinación.
5.000	Para monitoreo de viabilidad de la muestra conservada a largo plazo.
10.000	Además, para duplicado de la accesión en un segundo banco de semillas.
20.000	Además, para distribución de muestras para fines de investigación o para multiplicación y posterior reintroducción del material.

Cuadro 2. Número de semillas sugerido según objetivos de recolección.

Aunque la diversidad genética de la muestra no siempre puede ser evaluada, se debe aspirar a obtener muestras genéticamente representativas de la población, apuntando a que gran parte sino todos los alelos presentes en la población estén presentes en la muestra recolectada. Como no se puede tener certeza de ello, los esfuerzos deben enfocarse en recoger toda esta diversidad. El muestreo puede ser al azar, donde cada individuo de la población tiene la misma probabilidad de ser escogido y aportar a la muestra. Puede ser estratificado al azar, es decir primero se distinguen dentro de la población distintos ambientes, y luego se muestrea al azar en cada una de ellos, por ejemplo ante el gradiente altitudinal. Finalmente, se puede utilizar el muestreo sistemático, en este caso se utilizan transectos o grillas como guías que determinan el distanciamiento entre muestras.

Recomendaciones generales de muestreo para recolección de semillas

Con el fin de obtener una muestra de alta diversidad, en la cual esté representado el 95% de los alelos presentes en la población a una frecuencia mayor a 5%, se recomienda:

- Recolectar semillas de al menos 30-50 individuos en forma aleatoria dentro de la población. Para especies con dispersión a corta distancia (p.ej. polen por insectos, semillas por gravedad), es mejor coleccionar de un número mayor de plantas para alcanzar la meta.
- Recolectar una cantidad similar de semillas por individuo, de esta manera el aporte o representación genética de cada individuo en la muestra será equilibrada.
- En general, es mejor recolectar menos semillas de un número mayor de plantas que una gran cantidad de semillas de menos individuos.
- Se aconseja aplicar una técnica de muestreo aleatorio o 'por cuadro', que cubra la extensión de toda la población. No se recomiendan las técnicas por puntos o por singulo transecto porque la diversidad genética que se resulta es significativamente inferior. Tampoco se recomienda el muestreo sesgado, siguiendo la tentación de recolectar de las plantas con más disponibilidad de semillas o de plantas "deseables".
- Si la especie se reproduce vegetativamente, se debe aumentar la distancia entre los individuos a muestrear. Mantener una distancia de separación entre individuos para evitar una sobre –

representación de plantas genéticamente muy relacionados. P.ej. normalmente esta aconsejado separar 50-100 m para árboles.

- En caso de contar con muy pocos individuos por población (<20), como normalmente es el caso de especies Raras y en Peligro de Extinción, se debe recolectar y mantener las semillas de cada individuo en bolsas separadas. Esto permitirá mantener la variación genética de la población al momento de regenerar la muestra.
- Si en la población se observan diferencias importantes entre grupos de individuos, es preferible recolectarlos en forma separada.

3e. Métodos de recolección de semillas

Existen varias técnicas de recolección de semillas. La selección de la técnica más apropiada depende de la especie, particularmente de la unidad de dispersión (ej. frutos carnosos, frutos secos indehiscentes, semillas individuales) y del tipo de dispersión (Way & Gold, 2014b) [Technical Information Sheet 03](#). Se debe tener en mente maximizar la recolección de semillas en la fase de dispersión natural en la forma más eficiente, en términos de tiempo y esfuerzo.

Es importante asegurarse que se recolecten semillas/frutos de todas las partes de las plantas, p.ej. las localizadas en ramas más bajas y más altas, las que están expuestas al norte, al sur, etc., para que la muestra sea representativa de diferentes plantas fuentes de polen que rodean la planta fuente de semillas.

La elección del recipiente de recolección depende del tipo de fruto o semilla y de la especie a recolectar.

En general:

- El balde o cubo plástico es adecuado para la recolección de frutos enteros de árboles bajos y arbustos, y permite a los recolectores usar las dos manos para la recolección.
- La bolsa o sobre grande de papel facilita la recolección de semillas de gramíneas, semillas con 'aristas' o frutos con ganchos que normalmente quedan trabados en las bolsas de tela.
- La bolsa plástica sirve para recolectar frutos carnosos muy maduros.
- La bolsa de tela sirve para recolectar y transportar la mayoría de las muestras, salvo de frutos carnosos maduros.

Entre las técnicas de recolección más útiles están:

Cosecha de los frutos a mano

Es el método más básico, de fácil ejecución (figura 4). Sin embargo, se debe considerar si existe otro método más eficiente.

Este método es apropiado para los casos en que:

- No se pueda separar los frutos inmaduros y dañados con otro método de recolección más eficiente.
- Los frutos están en una ubicación accesible, permitiendo el uso de las dos manos para depositar las semillas en un balde u otro recipiente amarrado a la cintura.
- Los frutos contengan un alto número de semillas, sean carnosos o secos indehiscentes.

Figura 4. Cosechando frutos enteros a mano.



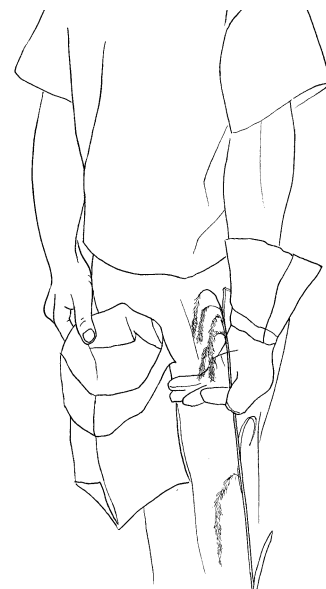
Apretar la panícula o espiga con la mano y deslizarla hacia arriba

Es el método más efectivo para las gramíneas u otras especies con infrutescencias compactas. En la mayoría de las gramíneas, consiste en sostener y apretar suavemente la base de la panícula o espiga con la mano enguantada moviéndola desde la base al ápice de la misma (figura 5). De esta manera se desprenderán la mayoría de las semillas maduras. Normalmente las semillas maduras se separan más fácilmente, entonces con experiencia se podrá aplicar la presión adecuada para recolectar solo las semillas maduras y dejar las inmaduras.

Este método es más apropiado para:

- Poblaciones que no se sobreponen en su distribución con poblaciones de especies taxonómicamente relacionadas.
- Poblaciones uniformes en su fenología, es decir, con todas las panículas y toda la espiga en la fase de dispersión.

Figura 5. Recolectando panículas o espigas.



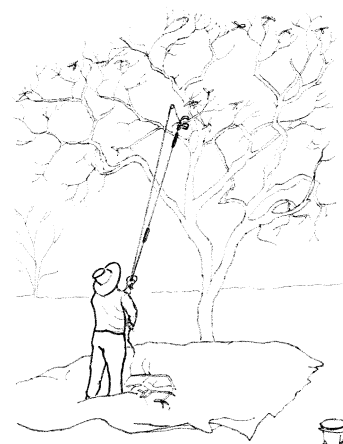
Cortar ramas con frutos

Este método consiste en cortar racimos o grupos de frutos, utilizando tijeras extensoras (figura 6). Se debe revisar cada racimo recolectado para evitar la posibilidad de incluir frutos inmaduros y semillas de baja calidad física. Tiene la desventaja de que se puede causar algún tipo de daño posterior a los árboles (por ejemplo, ingreso de hongos o insectos a través del área cortada).

El método es apropiado para:

- Árboles o arbustos cuyos frutos se encuentren en las partes terminales de las ramas y fuera del alcance del recolector.
- Especies abundantes, que toleren el corte de algunas ramas y follaje.

Figura 6. Cortando racimos o grupos de frutos de árboles con tijeras.



Sacudir o golpear las ramas para desprender frutos o semillas

Este método es muy efectivo cuando se observan frutos con distintos grados de madurez en una planta. Al sacudir suavemente las ramas con la mano o ganchos, los frutos o semillas que se encuentren en la fase de dispersión natural se desprenderán fácilmente. En cambio, los frutos o semillas menos maduras, no caerán. Para recogerlos, se puede colocar, por ejemplo, una lona bajo los árboles, o un balde bajo un arbusto (figura 7), y luego sacudir las ramas. Este método también puede ser aplicado para recolectar semillas de herbáceas (ej. Asteraceae), cuando exista una alta proporción de semillas por planta en la fase de dispersión natural, insertando la cima de los tallos adentro de bolsas de tela o papel y sacudiéndola para que las semillas maduras se desprendan. También es posible ayudar a que se desprendan las semillas frotando con una mano las infrutescencias. La ventaja de este método, además de ser muy rápido y eficiente, es que la mayoría de las veces no es necesario cortar ramas o tallos, y el daño a las plantas es mínimo.



Figura 7. Sacudiendo las ramas para desprender semillas.

Recolección de semillas del árbol vía escalamiento

Existen algunas especies arbóreas cuyos frutos/semillas no pueden ser recolectados accediendo desde el suelo. Esto ya sea por altura excesiva de los individuos o porque las semillas no se desprenden fácilmente de las ramas. En estos casos es necesario escalar a las copas de los árboles para recolectar las semillas o frutos. Sin embargo, dado que escalar árboles requiere mucho tiempo, entrenamiento y considera un riesgo importante, debería ser utilizada sólo cuando no hay otra alternativa. Dado que es una labor peligrosa, debe ser efectuada sólo por personal capacitado y con experiencia. Para mas detalles de esta técnica ver en Williams (1987) y Schmidt (2000)

Línea de tiro

Esta técnica consiste en alcanzar las ramas altas de un árbol con la ayuda de una lienza. Para ello, se utiliza un saquito a modo de peso atado a la lienza. Ésta puede ser lanzada manualmente, simplemente balanceando el peso hasta darle impulso, o también pueden ser utilizados algunos lanzadores para alcanzar mayores alturas y aumentar la precisión de los lanzamientos (figura 8).

Esta técnica puede constituir una técnica de recolección de semillas por sí sola, al permitir agitar las ramas alcanzadas. Para grupos que cuentan con gente especializada en subir árboles, también puede ser utilizada en combinación con otras técnicas de escalada.

Entre los múltiples usos de esta técnica se encuentran:

- Para ubicar una línea ascendente, una escalera de cuerdas o una malla para escalamiento
- Para colocar una línea de seguridad durante escalamiento
- Para instalar una sierra flexible para cortar ramas
- Para bajar y sacudir ramas.

Con lanzamientos manuales, dependiendo de la experiencia, es posible alcanzar ramas de entre 5-10 m de altura. Para alturas superiores, el lanzamiento puede mejorarse utilizando arcos y flechas, ballestas u hondas.

El lanzamiento ideal se logra cuando la lienza, con el peso en la punta, pasa por sobre la rama escogida y cae inmediatamente al otro lado de la rama, no quedando enganchada y pudiendo ser tirada fácilmente de ambos extremos (figura 9). Este es un lanzamiento difícil de lograr, para ello se debe escoger una rama y un ángulo de tiro que tenga suficiente espacio para realizarlo. Normalmente se requieren varios lanzamientos hasta alcanzar la rama escogida y aun así es común que la lienza quede enganchada en ramas y no se pueda recuperar. Estas condiciones se vuelven más difíciles en bosques densos, ya que se requiere de suficiente espacio para el lanzamiento de la lienza. El lanzamiento debe realizarse en forma segura, con uso de cascos por los operadores, despejando el área de otras personas para evitar accidentes y tratando de recuperar la lienza y el peso.

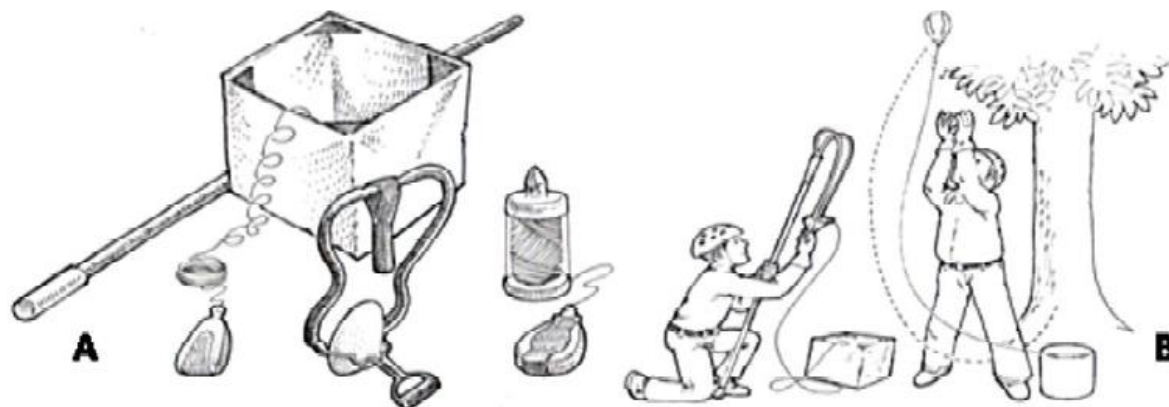


Figura 8. A, Materiales utilizados para la técnica de línea de tiro, pesos, lienzas, lanzador, pértiga, caja para la lienza; B, Método de lanzamiento con lanzador y pértiga telescópica, y lanzamiento manual.

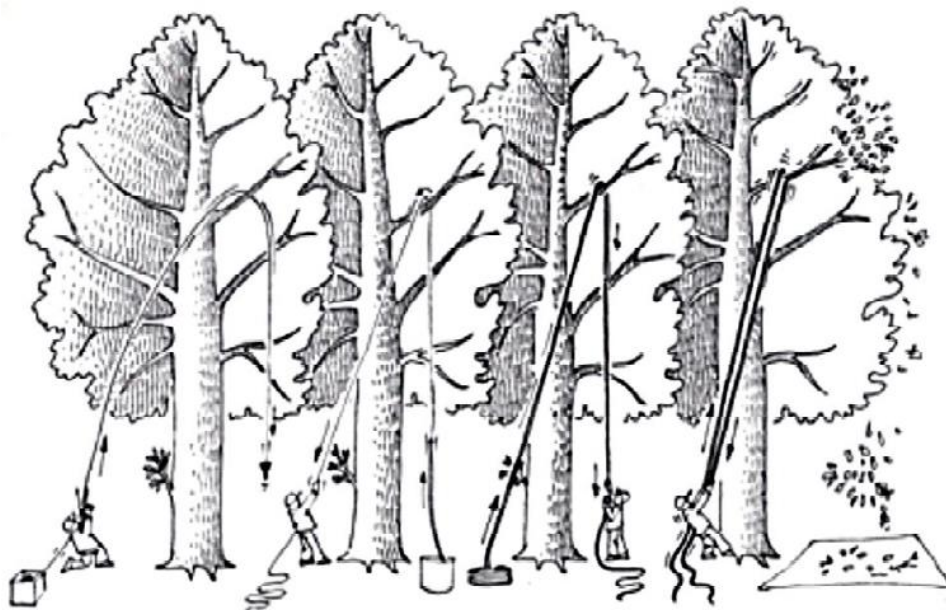


Figura 9. Diagrama del uso de la técnica de la línea de tiro como técnica de recolección de semillas.

Recolectar desde el suelo

Muchas veces es posible encontrar frutos o semillas en el suelo, los cuales pueden ser recolectados para fines de conservación.

Sin embargo, se corre el riesgo de que estén atacados por insectos o patógenos. Además, mientras mas tiempo las semillas dispersadas permenezcan en el suelo perderán mas viabilidad, por lo tanto no se recomienda recogerlas, salvo en casos muy particulares. Por ejemplo, semillas de especies en

peligro de extinción y/o que estén destinadas a propagación inmediata. Además, estas semillas podrían ser confundidas con semillas de años anteriores o con las de otras especies, se correrá el riesgo de transportar plagas o enfermedad si son trasladadas a otras regiones o países. Por lo tanto hay que revisar las semillas con cuidado, notando diferencias en color, textura, etc. Sólo se debe recolectar semillas del suelo cuando se ubica a la planta madre (en algunos casos esto es difícil), cuando las semillas se han dispersado recientemente, cuando no se observa daños físico o cuando no es posible utilizar una técnica más apropiada.

Una alternativa a este método es instalar mallas, lonas o plásticos bajo los individuos objetivos y recogerlas al cabo de unas semanas, una vez que las semillas han caído. Esto sólo funciona en lugares con poco viento y con semillas relativamente pesadas.

4. Recolección de datos asociados

4a. Ficha de recolección

La ficha presenta una forma ordenada y concisa de recopilar toda la información posible de obtener en terreno para la muestra recolectada. La ficha de recolección acompañará a la muestra de semillas y servirá como fuente de referencia. Esta información es clave, ya que representa la información de pasaporte que identifica el origen y caracteriza en forma básica la especie, la población y el área de muestreo. Es posible introducir los datos directamente en una planilla electrónica de un computador portátil o usar una ficha de papel, escrita a mano (ver Anexo 2b).

Los datos mínimos que debieran registrarse en esta ficha son los siguientes:

a) Información taxonómica. Familia, género y especie que se está recolectando, si se ha logrado una identificación de terreno, también es útil incorporar nombres comunes, si se conocen. Esto debe ir acompañada de una muestra de herbario con el nombre de colector y número de colección que respalde la muestra de semillas. Esta muestra de herbario permitirá posteriormente confirmar la identificación realizada en terreno.

b) Información geográfica. Se debe registrar la región, provincia, comuna y localidad, lo más preciso posible donde se hizo la recolección. Es muy importante registrar las coordenadas geográficas con la ayuda de un GPS. Además de las características topográficas generales del lugar, como pendiente, tipo de suelo, exposición y hábitat (p.ej. a orillas de cursos de agua, bajo el dosel, etc.)

c) Información ecológica. Tipo de vegetación, especies asociadas, dominancia, etc.

d) Información de población. Tamaño estimado, estructura especial y número estimado de individuos de la población. Además de cualquier información asociada como estado fenológico, sanitario, regeneración natural, evidencia de predación / herbivoría, etc.

e) Información de recolección. Fecha de recolección, nombre de los recolectores, número de colecta (ver sección 4b), número asociado a la muestra de herbario, cantidad de plantas muestreadas, superficie muestreada, calidad de las semillas, tipo de fruto, número de semillas por fruto, número estimado de frutos por planta y método y/o estrategia de recolección utilizada.

4b. Asignación de número de colecta

Es de suma importancia asignar un código que vincule la muestra de semillas a la ficha de recolección y al resto de la información asociada (muestras de herbario, fotografías, etc.). Este corresponde al número de colecta el cual debe ser único, exclusivo y seriado. Se recomienda utilizar uno de estos sistemas:

- i) Usar sigla de letras invariadas (p.ej. las iniciales del proyecto o institución), seguida de un número seriado.
- ii) Usar el número de colecta personal único del botánico responsable para las muestras.

Dicho número debe ser asignado inmediatamente durante la recolección. El número de colecta debe quedar escrito en dicha ficha y en las bolsas de las muestras colectadas, tanto dentro como fuera. Se recomienda usar pequeñas etiquetas, como las observadas en la figura 10.

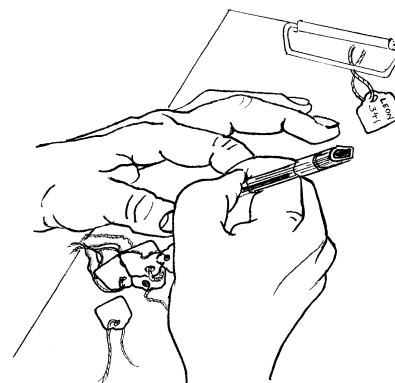


Figura 10. Preparando etiquetas para sujetar el número de colecta a la muestra recolectada.

4c. Recolección de muestras de herbario

Es necesario tomar una muestra de herbario para respaldar la correcta identificación de la especie, especialmente cuando éstas presentan problemas taxonómicos o son de difícil identificación. Esta muestra idealmente debe ser tomada al realizar la recolección de semillas, sin embargo, en ocasiones no se cuenta con caracteres taxonómicos importantes como flor, fruto o follaje para la identificación y es preferible tomarla en otra época del año, durante las visitas de prospección, o cultivar un ejemplar posterior a la colecta de las semillas. Es necesario rotular las muestras asociando el número de herbario con la muestra de semillas, para que cuenten con toda la información de la colecta. Las muestras de herbario deben ser prensadas cuidadosamente entre papel de diario y cartón (figura 11), luego deben ser secadas y enviadas a algún herbario nacional o especialista para su identificación.

Para mantener al máximo la forma, color y características de las plantas, es necesario cambiar todos los días el papel periódico (o papel secante), hasta que las plantas estén secas. En viajes de larga duración, para acelerar el proceso de secado, además del cambio diario de papel, la prensa se puede colocar cerca de una estufa portátil o secadora eléctrica.

En el laboratorio las muestras se secan en estufa (75°C por 3 a 5 días) y se deben revisar y cambiarles el papel periódicamente.

En las expediciones a los ambientes húmedos (paramo, bosque húmedo tropical) sin acceso a secadoras, se puede echar alcohol encima de las muestras prensadas, y cerrar las prensas dentro de bolsas plásticas gruesas hasta que regresen al herbario para su secado rápido.

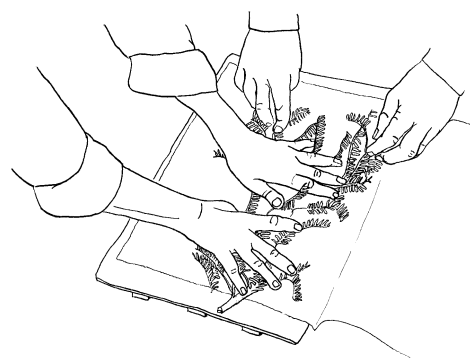


Figura 11. Preparando un ejemplar de herbario

En el caso de material difícil de prensar, es recomendable:

- Arreglarlo apropiadamente el día siguiente de su recolección, al momento de cambiar las hojas de papel periódico.
- Si las muestras contienen partes gruesas (ramas leñosas, frutos), se debe acolchar debajo de las partes menos gruesas (flores, hojas) con papel doblado, con la finalidad de nivelar toda la muestra. Los tallos y raíces muy gruesas (bulbos de geófitas) deben ser seccionados longitudinalmente.
- Si el material es resinoso o pegajoso, en vez de papel periódico se usa un papel delgado transparente o gasa. Es recomendable colocar, además del periódico, papel secante, para acelerar la deshidratación.
- Todo material leñoso frágil, fácil de romperse durante el proceso de prensado, debe mojarse rápidamente (10-20 segundos) en agua tibia, antes de prensar.
- Algunos de los frutos dehiscentes se pueden amarrar con cuerda para mantener su forma original durante el secado.
- Las semillas sueltas se ponen dentro de un sobre de papel grueso registrado con el número de recolección y, al final de la recolección, se colocan en los respectivos ejemplares de herbario.
- Preservar en alcohol las partes carnosas.
- Son importantes las bases de hojas de las palmas.
- Para proteger los tejidos delicados se debe usar papeles encerados.
- En el caso de especies de cactus en estado crítico de conservación *in situ*, se debe evitar la extracción de las plantas. En su lugar se recomienda hacer una descripción exhaustiva del número de costillas, forma de las areolas, número y tamaño de las espinas marginales y centrales, tamaño y forma de la planta, disposición de las flores y frutos.

Es recomendable tomar fotografías que apoyen las muestras de herbario. En general se aconseja tomar fotografías del aspecto general de la planta, flores, frutos, esto permite recoger información de características que pueden perderse en la muestra de herbario, como podría ser colorido y morfología de las flores. Sin embargo, mucho más útil para su identificación taxonómica es fotografiar aquellos caracteres más específicos que distinguen a la especie de otras y que permiten el uso de las claves, como podría ser la forma del ovario, la inserción de los pétalos, disposición de las hojas, la pilosidad de la hoja, la nervadura, entre otros caracteres. Se recomienda además tomar fotografías del hábitat en que se encuentra la especie recolectada. Se recomienda tomar una foto de la etiqueta conteniente el número de colecta para cruzar la información fotográfica con los datos de campo.

4d. Recolección de muestras para estudios moleculares

El ADN puede ser dañado por el secado en altas temperaturas o al preservar las muestras en alcohol. Entonces para proveer muestras de buena calidad para la investigación taxonómica o molecular se necesita coleccionar una muestra para análisis de ADN, según los siguientes lineamientos:

1. Preparar una cantidad de gel de sílice extra fino del 22A° (28-200 de malla) mezclado con gel de sílice conteniendo indicadores de humedad. Se recomienda utilizar una mascarilla para asegurarse de no inhalar el gel de sílice fino.
2. Mida aproximadamente 30-60 g de la mezcla de gel de sílice y colóquela en bolsas Ziploc de aproximadamente 10x10 cm, junto a un juego de papel filtro (por ejemplo, el usado para café o té).
3. Coseche algunas hojas maduras, no demasiado joven ni demasiado vieja, rasguelas en pedazos y colóquelas entre el papel filtro.
4. Inserte el papel filtro en una bolsa Ziplog preparada como descrito en el punto 2; cada bolsa plástica debe etiquetarse con el nombre y número de colecta (figura 12).
5. Selle la bolsa de plástico herméticamente. Cambie el gel de sílice cuando el color del indicador de humedad cambie de anaranjado a transparente.

El Anexo 9 contiene el protocolo utilizado en el Instituto Humboldt y preparado por Mailyn A. Gonzalez y Lorena Quintero.



Fig 12. Muestras para estudios moleculares en bolsas con gel sílice.

5. Manejo post-cosecha de las semillas recolectadas – durante la expedición

Dependiendo de las condiciones ambientales, las semillas pueden envejecer rápidamente después de ser recolectadas. Todo el esfuerzo resultaría en vano si el recolector no maneja las muestras de semillas en forma apropiada para evitar daño o disminución de su calidad. Siguiendo algunas normas y reglas prácticas, puede asegurarse de obtener semillas de alta calidad física y que llegarán al banco de germoplasma en buenas condiciones.

La longevidad de las semillas dependerá de las condiciones ambientales y del manejo post-cosecha. Para el manejo de una muestra de semillas parcial o totalmente inmaduras, véase el capítulo 5a. Dentro de determinados límites, la longevidad y potencial de almacenamiento de las semillas maduras y tolerantes a la desecación disminuye con el aumento del contenido de humedad (ver capítulo 8). Por lo tanto, es esencial mantener o reducir la humedad de estas semillas a un nivel que minimice el envejecimiento, aprovechando las condiciones ambientales favorables durante el día y evitando que se incremente cuando la humedad relativa (HR) del aire aumente durante la noche.

Las temperaturas altas también aceleran el proceso de envejecimiento. Por ello, en terreno las colectas nunca deben ser dejadas dentro un vehículo cerrado a pleno sol o a temperaturas elevadas. En este caso es preferible dejarlas escondidas bajo el vehículo o colgadas de un árbol a la sombra. Mantenerlas en bolsas de algodón o papel para facilitar la ventilación.

5a. Semillas inmaduras, o posiblemente recalcitrantes

Este tipo de semillas resultan ser las más delicadas de manejar durante todas las etapas, se deben recolectar en bolsas o recipientes de plástico que permitan mantener su humedad para conservar su viabilidad, así que se aconseja mantener las bolsas cerradas y sus frutos intactos hasta la llegada al laboratorio, abriendo de vez en cuando las bolsas para mejorar la aireación de las muestras y evitar su pudrición.

5b. Frutos carnosos

Los frutos carnosos como los de las chirimoyas (*Annona cherimola*), deben ser recolectados, en bolsas o recipientes de plástico, nunca en recipientes cerrados, cuidando de no llenar excesivamente el recipiente para que se mantenga una buena ventilación y evitar sobrecalentamiento, fermentación y pudrición de los frutos. Si es posible, el procesamiento podría realizarse en terreno antes que las semillas se empiecen a pudrir, para que luego sean manejadas como semillas.

5c. Frutos secos o semillas

Para frutos secos como los de los frailejones (*Espeletia* spp) se recomienda el uso de bolsas de papel o tela, ya que de esta manera las semillas pueden continuar secándose hasta que sean procesadas. Se debe tener cuidado con especies espinosas como el cardo (*Dipsacus fullonum*), con puntas o ganchos, ya que pueden romper las bolsas de papel, provocando pérdidas de semillas o mezcla entre muestras. Se aconseja para ello poner las bolsas de papel dentro de bolsas de tela para evitar que se rompan o se queden enganchados en la tela. Las bolsas de papel también son más aconsejables para

semillas con vilano como algunas especies de la familia Asteraceae, ya que puede ser difícil desprenderlas de las bolsas de tela. No conviene comprimir excesivamente semillas de este tipo para evitar dañarlas.

6. Procesamiento de las semillas – después de la expedición

En el laboratorio, las muestras recibidas deben ser procesadas con el objetivo de obtener una muestra de semillas viables, limpias y de alta calidad para ser almacenada, manipulada, transportada y utilizada de manera fácil y eficiente.

Durante el procesamiento de semillas se deben eliminar todo tipo de desechos vegetales y material inerte (piedrecillas, granos de arena). Semillas dañadas o infestadas también deberán ser retiradas para disminuir la propagación de insectos u hongos que puedan dañar a las semillas viables, en la medida que éstas puedan ser detectadas.

En términos generales el procesamiento de semillas se debe realizar lo antes posible después de la colecta, para asegurar la mantención de la calidad de las semillas recolectadas. La tolerancia a la desecación es una consideración muy importante al momento de recolectar, manejar y procesar una muestra de semillas. Semillas recalcitrantes tienen la primera prioridad en el procesamiento para evitar pérdidas en la calidad y viabilidad de las semillas, mientras que semillas ortodoxas son capaces de esperar un poco más por su limpieza (ver más detalles en el Anexo 8).

Es esencial, además, asegurar la integridad de la muestra durante todo el proceso, evitando que ésta pueda ser contaminada. Para ello todos los equipos, herramientas, utensilios y recipientes utilizados en cada etapa en este proceso, deben estar limpios y libres de semillas de otras especies. Una cuidadosa limpieza de utensilios, incluyendo mesones y el lugar de trabajo deberá realizarse entre el procesamiento de una muestra y otra para evitar mezclas entre muestras. Por su tamaño las muestras de semillas pequeñas corren mas riesgo de ser contaminadas con semillas de otras muestras. Ponga mucho cuidado y limpie muy bien los tamices y envases utilizados.

En el Anexo 1b se entrega un listado de materiales y equipo útiles por el procesamiento de semillas.

6a. Registro, identificación y clasificación de la muestra

Es esencial mantener una adecuada identificación de las muestras en cada etapa, desde la recolección hasta el almacenamiento y por supuesto también en las etapas intermedias del procesamiento. Es fundamental mantener las etiquetas, con el número de colecta que identifica la muestra desde el campo hasta el laboratorio. Es común que la colecta se subdivide durante el procesamiento debido a los pasos propios de la limpieza, por eso cada parte de la muestra siempre debe estar debidamente identificada. Por ello, además de las etiquetas, se recomienda anotar el código de identificación en un trozo de papel dentro de los envases y escribirlo en la parte exterior para el caso de bolsas de papel o de plástico.

Al recibir las muestras recolectadas, por procedimiento, los bancos de semillas le asignan un número de acceso único, exclusivo y seriado, típicamente compuesto de una sigla característica del banco de semillas o del proyecto, seguida de un número único y seriado. Este código de acceso es el identificador único del banco de semillas y debe estar vinculado con los códigos de colecta y el de la muestra de herbario que fueron asignados en el campo (ver sección 4b).

Es de vital importancia además llevar un registro de las colectas con el fin de realizar un seguimiento y evaluación de los procedimientos realizados, donde registra el método de limpieza utilizado, el personal a cargo de esta tarea, tiempos y equipos empleados, valores de humedad relativa, calidad y cantidad de semillas, fechas de cada etapa, etc. Esta información podrá también resultar útil para futuras colectas. En el Anexo 3a se da un modelo de hoja de seguimiento en la cual, por cada colecta, todos los procesos descritos en las secciones de 6a a 6e y 8a pueden ser registrados. Esta ficha se empieza a completar en el momento del ingreso de la muestra de semillas al laboratorio y se va actualizando por cada etapa del procesamiento.

6b. Evaluación de la madurez de las semillas

La primera consideración que se hace a la llegada al laboratorio de una muestra recolectada es evaluar el estado de madurez de sus semillas.

En el caso que los frutos recolectados no estén lo suficientemente maduros se requiere facilitar la maduración post-cosecha de los frutos previa a la limpieza. Para ello las semillas no deben ser extraídas de los frutos, sino que los frutos completos deben dejarse en un ambiente fresco y bien ventilado, evitando que se deshidraten. En general, las condiciones de maduración post-cosecha que se aconsejan son temperaturas alrededor de 20°C, con humedad relativa alrededor de 60-65%. Temperaturas más altas aceleran el metabolismo y por lo tanto aceleran el envejecimiento de semillas, reduciendo su viabilidad y por ende su calidad.

Para permitir su maduración, los frutos pueden ser mantenidos en las bolsas de colecta o bien ser esparcidos en bandejas y de ser necesario, se debe considerar la aspersión periódica de pequeñas cantidades de agua para mantener una alta humedad. Alternativamente, se puede recolectar los frutos en ramas cortas y poner la base de estas ramas en recipientes con agua. Lo mismo se puede realizar para las espigas de las gramíneas y las varas de bulbosas. Las condiciones de humedad deben ser más altas al inicio para ir reduciéndolas gradualmente a medida que las semillas van madurando. Los frutos deben ser continuamente revisados y mezclados, con el fin de mantener condiciones homogéneas.

Estas condiciones de temperatura y humedad son necesarias incluso para frutos cercanos a madurez, provenientes de ambientes secos, ya que mientras los frutos se mantienen adheridos a la planta madre, la humedad es regulada por la planta a través del pedicelo. Este aporte continuo de humedad, permite una alta tasa de evapotranspiración que evita el sobrecalentamiento de los tejidos, especialmente del embrión. Sin embargo, una vez que el fruto es cortado o extraído de la planta madre, éste sólo cuenta con la humedad que posee para terminar su maduración. Un ambiente relativamente húmedo reduce la evapotranspiración, dándole mayor tiempo para alcanzar la madurez fisiológica requerida. Se debe tener cuidado con ambientes excesivamente húmedos y mal ventilados, ya que generarán condiciones propicias para el ataque de hongos, poniendo en riesgo las semillas.

La completa maduración de las semillas puede tomar unos días a unas pocas semanas. Al final del proceso, los frutos que no hayan alcanzado a madurar deben ser eliminados para evitar que semillas de baja calidad sean incluidas en la muestra. Los frutos completamente maduros deben pasar al procesamiento.

Si una muestra posee una mezcla de frutos con diferente grado de maduración, a juzgar por sus características (color, consistencia o dehiscencia), es buena práctica separar los frutos inmaduros de

los maduros, evitando que la muestra quede heterogénea en madurez y pierda calidad. Los frutos cercanos a madurez requerirán una etapa de post-maduración, antes de ser mezclados con el resto de la muestra, mientras que frutos completamente maduros pueden ingresar de inmediato al procesamiento. Por razones de tiempo no siempre esto es posible, y se necesitará tomar una decisión general sobre el manejo de toda la colecta, por ejemplo dejarla madurar por algunos días incluyendo los frutos ya maduros.

6c. Limpieza de las semillas

El proceso de limpieza debe ser eficiente, cuidando de no causar daño a las semillas ni el desperdicio innecesario de las muestras. Para cada muestra recolectada es necesario probar las metodologías, que se pretende utilizar, sobre una pequeña muestra de semillas, y aplicarla a toda la colecta solo después de un meticuloso examen de eventuales daños o pérdida de semillas. Se vea el Anexo 1b para un listado de los equipos útiles.

En algunos casos no es posible limpiar la colecta hasta llegar a tener una muestra pura. Esto porque se dañaría las semillas o por cuestiones de tiempo, equipo faltante etc. Siempre es preferible dejar una parte de desecho en lugar de dañar o perder algunas semillas. También es muy común almacenar las semillas en forma de frutos secos los que contienen varias semillas, por ejemplo, los frutos con endocarpo pétreo. Por más informaciones se recomienda consultar Terry & Sutcliffe (2014) [Technical Information Sheet 14](#).

Frutos secos dehiscentes

Este tipo de frutos son probablemente los más fáciles de procesar. Muchos de ellos (cápsulas, silicuas, folículos y vainas dehiscentes) se abren fácilmente en la etapa de dispersión, por tanto, lo aconsejable es recolectarlos en el momento justo antes de esta etapa como ocurre con los siete cueros (*Tibouchina grossa*, *Tibouchina lepidota*). Durante el secado se debe dispersar las semillas en una capa delgada sobre bandeja o papel y en un espacio temperado y con suficiente circulación de aire. Se aconseja cubrir las bandejas donde se están secando los frutos con una red a malla fina bien amarrada a los bordes para evitar que se pierdan semillas al momento de abrirse los frutos. También se puede dejar dentro de bolsas grandes de papel.

Liberar o extraer las semillas de frutos dehiscentes varía según la especie. En algunas, basta un movimiento leve como rastrillarlas, sacudirlas o dejarlas caer para que todas las semillas sean liberadas de los frutos. Comúnmente, se utiliza un tamiz y un tapón de goma para triturar suavemente los frutos sobre el tamiz dejando caer las semillas a través del tamiz. Es importante asegurarse que el proceso no dañe las semillas. Si el uso del método tamiz y tapón resulta en daño de semillas, se puede optar por el frotado con guantes de cuero o goma resistente sobre alfombra rugosa de goma o incluso sobre el tamiz.

Sin embargo, las semillas de ciertas especies, como en algunas leguminosas, mantienen una unión más fuerte a través del funículo y las semillas pueden requerir extracción manual más laboriosa, en algunos casos será necesario triturar los frutos para separar los restos vegetales y las semillas. Esto es posible hacerlo colocando los frutos en sacos o esparcidos por una superficie, para ser triturados manualmente, pisoteados o golpeados para que se rompan y liberen las semillas.

Frutos secos indehiscentes

Los frutos indehiscentes no se abren naturalmente para dispersar sus semillas, por lo que requieren que sean partidos, quebrados o triturados para liberarlas como ocurre con el castaño (*Bertholletia excelsa*). Un secado inicial puede facilitar la extracción, ya que los frutos normalmente se tornan más quebradizos.

Esta tarea puede hacerse en forma manual por frotación, pisoteo o golpeteo, tal como fue descrito para frutos dehiscentes. Para la limpieza de cantidades grandes de semillas, p.ej. para uso en restauración de hábitats, en algunos casos el uso de molinillos manuales o eléctricos puede facilitar la tarea, aunque se debe tener el cuidado de calibrar bien la máquina para que sólo triture los frutos, sin dañar las semillas (figura 13).

Una vez secos, de la molienda sólo se genera una harina que es fácilmente separada de las semillas. Sin embargo, en algunas ocasiones la extracción de las semillas puede ser más fácil en húmedo, debido a que frutos frescos (pero maduros), recién colectados pueden ser más fácilmente cortados para liberar las semillas, labor que se vuelve extremadamente difícil cuando se secan y endurecen.

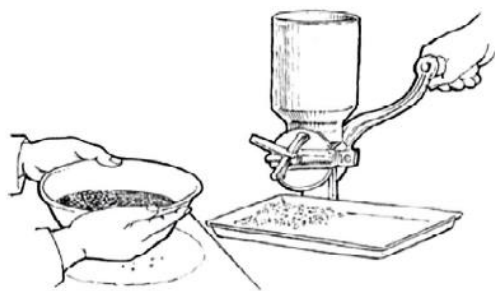


Figura 13. Para la limpieza de cantidades grandes de semillas p.ej. para uso en restauración de hábitats, extracción de semillas de vainas indehiscentes utilizando un molinillo manual de granos.

Frutos carnosos

Los frutos carnosos tienen prioridad en el procesamiento debido a que la cubierta pulposa comienza la fermentación y las semillas corren el riesgo de deteriorarse.

El método de extracción de frutos carnosos puede variar según las características del fruto. Frutos más grandes, como drupas o bayas de mayor tamaño como las guayabas (*Psidium* spp), pueden ser apretados, abiertos o cortados, dejando caer la pulpa con las semillas en un recipiente para luego ser separadas. De esta manera, en esta primera etapa, puede ser fácilmente eliminada la cáscara o cubierta del fruto que normalmente tiende a ser más difícil de eliminar ya que es más gruesa o coriácea. Frutos más pequeños, blandos o pulposos con los de los tunos (*Miconia* spp) pueden ser macerados completamente en forma manual en recipientes con agua. En ambos casos el resultado será una mezcla de pulpa con semillas que puede ser separada utilizando mallas, cribas o tamices. La pulpa puede ser fácilmente separada de las semillas, debido a que normalmente flota y puede ser eliminada junto con el agua, mientras que las semillas se van al fondo. Frutos un poco más resistentes como el mortiño (*Hesperomeles goudotiana*), pueden romperse apretándolos con las manos o con el tapón sobre tamices bajo el agua y cuidando de calibrar la fuerza empleada para evitar daños a las semillas.

Para cantidades grandes de pulpa que contienen semillas pequeñas se puede utilizar una licuadora, pero hay que tener cuidado de no sobrepasar el tiempo de licuado y arruinar las semillas. Se puede

licuar por períodos cortos y en forma intermitente, a velocidades bajas. Es necesario cubrir las cuchillas de la licuadora con un revestimiento de caucho o goma para también minimizar el daño. Cualquiera haya sido la técnica usada, después de lavar las semillas, éstas deben ser secadas inmediatamente. Para ello las semillas deben ser esparcidas en capas delgadas sobre papel grueso, malla de acero o plástico, o de diario, y dejadas a la sombra donde circule el aire, tratando de evitar el calor, hasta que se sequen. Si luego del secado, aún presentan restos de pulpa, entonces pueden seguir su procesamiento como semillas de frutos secos, soprándolas o separándolas usando tamices.

Semillas mucilaginosas

Algunas semillas están cubiertas por mucílago como es el caso de algunas semillas de cactáceas, o por una pulpa muy espesa y mucilaginosa como el moquillo (*Saurauia scabra*). En estos casos el lavado se vuelve algo complicado, por lo que se pueden seguir algunos de estos consejos.

- Para semillas pequeñas se aconseja usar una bolsa de tela, tul, malla o una media de nylon en lugar de tamices, así es más fácil apretar o exprimir.
- Con la mano enguantada, frotar con cuidado las semillas mojadas sobre una malla o colador de plástico que retenga las semillas mientras la pulpa pasa a través de ella.
- En algunos casos basta con apretar o exprimir los frutos sobre un papel absorbente dejando salir las semillas y la pulpa, esparciéndolas en capas delgadas sobre papel absorbente. Frotar con la mano cuando las semillas están secas para que se despeguen del papel y de la pulpa seca.
- También es posible mezclar las semillas con un poco de arena gruesa o ceniza, frotando cuidadosamente para luego lavarlas retirándole la arena y el mucílago. Se debe tener cuidado de utilizar una arena de tamaño diferente a lo de las semillas, para que luego se pueda separar.

Separación de los desechos

Cualquiera que haya sido el método utilizado para extraer las semillas de los frutos, el resultado inicial será de una mezcla de semillas con gran cantidad de restos vegetales, frutos y polvo. Para separar las semillas de estos desechos se puede utilizar tamices de varios tamaños de rejilla y una malla fina para eliminar el polvo.

Cuando las semillas y los desechos tienen similar tamaño, pero peso diferente, o para eliminar residuos livianos, como cascarillas o incluso las semillas vanas, se puede utilizar el viento, un ventilador o un soplador de semillas. En caso de utilizar equipos mecanizados, se debe tener en cuenta limpiar meticulosamente todas sus partes entre una muestra y otra para evitar contaminación.

Es importante, luego de cada proceso de soplado, verificar que no se estén eliminando semillas viables, devolviendo a la muestra las semillas en caso de ser necesario.

6d. Prueba de corte para determinar la calidad de las semillas

Esta prueba consiste en seccionar con la ayuda de tijeras, cuchillos o bisturís al menos 20 semillas, idealmente 50, escogidas al azar y examinar bajo la lupa o el estereoscopio sus estructuras. Semillas aparentemente sanas lucen firmes, blanquecinas y ocupan la totalidad del interior de la semilla. Bajo la lupa estereoscópica se puede distinguir más claramente sus estructuras internas: el embrión con sus cotiledones y las sustancias de reserva (endosperma o perisperma). En semillas viables, la textura del embrión es firme, en ocasiones hasta brillante. Los tejidos de reserva, en cambio, presentan

colores y texturas que pueden variar desde blanco harinoso, hasta más aceitosa como en caso de semillas de algunas palmeras, que se vuelven de un color blanco más amarillento a grisáceo. Es recomendable consultar la literatura sobre la morfología de las semillas, como por ejemplo Martin (1946).

Evalúe el interior de la semilla, especialmente el embrión, y registre el número de **semillas llenas**, **vacías** e **infestadas**. El daño de los insectos puede aparecer como un túnel de tamaño creciente, generalmente con una cavidad donde se encuentra la larva. Un orificio de salida también puede ser evidente.

Esta prueba de corte es similar a la que fue realizada en el campo al momento de la colecta (ver sección 3c), pero aquí el resultado será representativo de la muestra de semillas limpia, que estamos almacenando, además de ser más precisa gracias a los mejores equipos disponibles en el laboratorio. Anote cualquier otra cosa de interés, como el tamaño y el posicionamiento del embrión, y cualquier indicación de que la semilla puede no estar completamente madura.

$$\text{Proporción de semillas llenas} = \text{N. de semillas llenas} / \text{N. de semillas cortadas}$$

Nota: Las semillas llenas podrían potencialmente ser viables, pero eso solo se puede averiguar con los ensayos de viabilidad (germinación o tetrazolio, ver cap. 7). Sin embargo, la proporción de semillas llenas corresponde a la proporción de semillas potencialmente viables dentro de la muestra colectada. Si la muestra esta bien procesada y de calidad, esta variará en el tiempo, y permitirá calcular la cantidad ajustada de semillas de la muestra colectada (ver cap. 6e).

Esta proporción siempre tendrá que tomarse en cuenta cada vez se necesite utilizar una cantidad de semillas por cualquier uso, como un ensayo de germinación, un proyecto de investigación, etc., debido a que las semillas vanas e infestadas en práctica no son semillas funcionales y se pueden tratar como desecho.

Si se detecta una gran cantidad de semillas vanas que es posible descartar con métodos de limpieza, retroceda en el procesamiento: se debe repetir el soplado para mejorar la calidad de la muestra y nuevamente realizar la prueba de corte.

Registre los resultados en la hoja de seguimiento (ver Anexo 3a)

Nota: Una máquina de rayos X también puede proporcionar los mismos resultados y puede emplearse si el volumen de recolección de semillas justifica su compra. Si este es el caso, se requerirá un conjunto adicional de pautas y protocolos de trabajo y operación de este equipo.

6e. Conteo de semillas

El valor estimado de la cantidad de semillas que contiene una muestra recolectada se usará para determinar:

1. La cantidad de semillas disponibles para las pruebas de germinación e investigación;
2. Si la accesión estará o no disponible para su distribución;
3. Si la accesión necesita ser regenerada o nuevamente recolectada debido al bajo número de semillas colectadas.

Hay varios métodos para contar las semillas de una muestra colectada. Aquí hay algunos:

Estimación simple

Este método puede ser aplicable a la mayoría de las muestras colectadas. En una balanza electrónica de 4 a 5 decimales (dependiendo del tamaño de la semilla) pesar 1 muestra de *n* semillas o frutos. Se aconseja utilizar como mínimo 50 semillas (*n*). Luego, pesar el resto de la muestra y realizar el siguiente cálculo:

$$\text{Peso medio de 1 semilla} = (\text{peso de la muestra de } n \text{ semillas}) / n$$

$$\text{Cantidad actual} = (\text{peso del resto}) / (\text{peso medio de 1 semilla}) + n$$

Máquina de conteo de semillas

Su uso es práctico para muestras de semillas de tamaño y forma adecuados, por ejemplo, semillas similares al maíz o trigo, y que no contengan desechos. Se sugiere hacer un contra chequeo contando a mano una submuestra para verificar si el conteo con máquina es confiable.

Conteo manual

Si hay muy pocas semillas / frutos (menos de 200) puede ser más rápido y práctico contarlas manualmente que usar la máquina de conteo.

Recomendaciones:

- Mezcle bien la accesión y saque las muestras en forma aleatoria con una cuchara para asegurarse de que se tomen muestras representativas. Utilizar un papel grueso doblado al centro, coloque la muestra representativa sobre el papel doblado e inclínelo, dejando caer gradual y lentamente las semillas sobre un contenedor dispuesto abajo y a corta distancia del papel doblado con las semillas. Puede utilizar una pinza para ayudar desplazar y contar las semillas (figura 14).



Figura 14. Método de conteo de las semillas.

- Cualquier residuo u otro material extraño que se encuentre dentro de la muestras de *n* semillas / frutos debe ser incluido en el peso. La omisión de dicho material exagerará el cálculo del número final de semillas.
- Si la muestra ya procesada es almacenada como frutos, estos se cuentan como si fueran semillas, con uno de los métodos arriba, pero un cálculo adicional es requerido: el número promedio de semillas por fruto. Para eso es necesario abrir como mínimo 5 frutos, contar cuantas semillas hay en cada uno, y calcular el valor promedio de estos.
- Registre los resultados en la hoja de seguimiento (ver Anexo 3a)

Una vez que la cantidad de semillas actual está calculada, es necesario utilizar la proporción de semillas llenas estimada con la prueba de corte (ver sección 6d) para calcular la cantidad ajustada de semillas, es decir la cantidad final de semillas llenas contenida en la accesión.

Cantidad ajustada = cantidad actual x proporción de semillas llenas

7. Pruebas de viabilidad

Las pruebas de viabilidad confirman si las semillas llenas son viables y entonces son capaces de generar nuevas plantas, o si están muertas. La cantidad de semillas llenas no varía en el tiempo, mientras la cantidad de semillas viable inevitablemente bajará en el tiempo. La velocidad de esta disminución determina la longevidad de semillas de la accesión, la cual a su vez depende de muchos factores, como la viabilidad inicial, la madurez al momento de la recolección, el manejo y procesamiento post-cosecha en terreno y en laboratorio, las condiciones de almacenamiento, la especie, el hábitat y el clima donde se colectó las semillas.

La viabilidad de las semillas se puede evaluar directamente a través de ensayos de germinación y pruebas de tetrazolio. Ver el Anexo 1b para la lista de los materiales utilizados en estos ensayos.

7a. Ensayo de germinación

La evaluación de la capacidad de germinación determina directamente la viabilidad de las semillas. A su vez se puede definir los requerimientos de las semillas y los parámetros que gatillan la germinación.

Bajo condiciones controladas de laboratorio se puede evaluar la respuesta de semillas sometidas a diferentes condiciones de temperatura, luz, tratamientos pre-germinativos, promotores químicos, condiciones de stress, entre otros, generando información valiosa que permite relacionar estos parámetros con la época, condiciones y lugares donde la germinación se estaría produciendo naturalmente.

Existen varios métodos para evaluar la germinación, desde los más sencillos que pueden realizarse directamente sobre la siembra en vivero donde, conociendo el número de semillas iniciales, se puede determinar el porcentaje de germinación, basándose en las plántulas generadas en el almácigo; hasta técnicas más complicadas como la germinación bajo condiciones *in vitro*.

Por germinación se refiere a un mínimo de 2 mm de protrusión de la radícula. Si no se tiene la intención de propagar las plántulas, a este momento las semillas germinadas se desechan y se cuentan como germinadas. Este conteo puede ser efectuado cada semana o con mayor frecuencia (Smith *et al.*, 2003).

En laboratorio, la germinación se puede realizar en distintos envases como cajas de Petri, bandejas, frascos, dependiendo de los objetivos y los parámetros que se quieran medir. Los sustratos utilizados también son variables: papel filtro, agar, medios de cultivo, arena, perlita, etc. Uno de los más utilizados son las placas Petri con agar (figura 15), debido a que es fácil manipularlas para el montaje y conteo de semillas germinadas y tienen la ventaja que no requieren hidratación tan frecuente como es el caso del papel filtro. Sobre cómo preparar el agar ver el Anexo 10. Este método es adecuado para semillas pequeñas y medianas. Sin embargo, en el caso de semillas grandes es mejor sembrarlas

en bandejas con arena, dado que por su tamaño quedan con mayor contacto con la arena que se amolda a su forma y de esta manera se mantienen húmedas.



Figura 15. Placa Petri con semillas de *Prosopis* germinadas sobre agar.

Los factores básicos que influyen sobre la germinación son agua, luz, temperatura y gases. El sustrato siempre tiene que ser húmedo, pero se debe tener cuidado que las semillas no sean sumergidas en agua, porque en este caso faltaría el oxígeno. La excepción son algunas plantas acuáticas que necesitan condiciones anóxicas para germinar. Las semillas de la mayoría de las especies son insensibles a la luz, sin embargo, hay algunas que necesitan luz y otra que necesitan oscuridad. La temperatura es un factor muy importante y todas las especies tienen un óptimo de temperatura, donde las semillas germinan más rápidamente y en mayor proporción, y umbrales de temperatura mínima y máxima fuera del cual ninguna semilla germina. Además, la temperatura requerida puede ser constante o alternante entre día y noche. En muchos casos las semillas no responden, en otros casos necesitan una o la otra condición. Por ejemplo, es conocido que la familia Cyperaceae generalmente necesita temperatura alterna para germinar.

Si se dispone de incubadoras, se puede evaluar la germinación a diferentes temperaturas. Las incubadoras tendrán luz por el día y oscuridad por la noche, típicamente por 12 horas cada una. Para elegir las temperaturas que se quiere probar, se requiere conocer las temperaturas del área donde se recolectó la semilla, especialmente de la temporada en que se prevé ocurra la germinación.

Una proporción consistente de especies tiene algún tipo de dormancia (Baskin & Baskin, 2014), y necesitarán un tratamiento pre-germinativo (Davies *et al.*, 2015b) [Technical Information Sheet 13b](#). Uno de los tipos más comunes es la dormancia física, en la cual las semillas son impermeables al agua. El tratamiento clásico en estos casos es la escarificación mecánica. Utilizando un bisturí, se realiza un pequeño corte transversal en la testa, en el lado opuesto y alejado del área donde emergerá la radícula. Esto hará la testa permeable permitiendo una rápida absorción de agua por el embrión. En el Anexo 4, se entrega un listado de las familias de plantas donde es posible encontrar especies con este tipo de dormancia.

Otro tipo es la dormancia fisiológica, la cual normalmente se puede romper o superar poniendo las semillas a temperatura más baja (estratificación fría) o más alta (estratificación caliente) que la temperatura de germinación. El tiempo de estratificación puede ser por algunas semanas o meses, esto último especialmente para la estratificación fría. Durante este tiempo las semillas tienen que estar sobre sustrato húmedo como lo descrito arriba. Este pre-tratamiento simula la temporada adversa que hay entre la dispersión y la germinación. Como referencia para elegir la temperatura y la duración de la estratificación, se usan los datos climáticos del sitio de colecta. Otro método para superar la dormancia fisiológica es utilizando hormonas como el ácido giberélico incorporándolo en el sustrato (Davies *et al.*, 2015a) [Technical Information Sheet 13a](#). Este método puede acelerar

considerablemente la germinación, pero puede resultar en plántulas excesivamente alargadas y más frágiles.

Cada vez que se prueba un pre-tratamiento es buena idea realizar una prueba de control, sin pre-tratamiento.

Al final de la prueba de germinación, es decir después de 4 semanas sin germinación alguna, es recomendable realizar una **prueba de corte** a las semillas que no germinaron. Para esto se diseccionan las semillas bajo lupa o estereoscopio y se clasifican como frescas (con tejidos firme y sano), muertas (con hongos y tejido suave), vanas/vacías (sin contenido) o infestadas (con evidencia de infestación de insectos). Se puede suponer con bastante confianza que las semillas frescas sean viables, y que necesitarían otras condiciones de germinación o diferentes pre-tratamientos para germinar. En particular si no absorbieron agua significa que necesitan escarificación. Las semillas muertas podrían representar las semillas no viables de la colecta o podrían estar muertas producto de las condiciones y tiempo que duró el ensayo de germinación.

Para calcular la proporción de semillas germinadas, por cada ensayo, se excluyen en el cálculo las semillas vanas e infestadas y se incluye solo las semillas llenas. Esto porque se quiere saber cuantas semillas son viables entre las semillas llenas, potencialmente germinables. Se puede también estimar la proporción de semillas viables asumiendo que las semillas frescas son viables y las muertas no son viables. Este cálculo necesita una evaluación experta porque no siempre es correcto. Las únicas semillas seguramente viables son las que germinaron.

$$\text{Germinación (\%)} = (G / L) * 100$$

$$\text{Viabilidad (\%)} = [(G + F) / L] * 100$$

G = número de semillas germinadas

F = número de semillas frescas en la prueba de corte

L = número de semillas llenas = número de semillas sembradas – (vacías + infestadas en la prueba de corte)

En caso que una muestra contenga una alta proporción de semillas vanas e infestadas, información obtenida en la prueba de corte para determinar la calidad de las semillas (ver sección 6d), es recomendable aumentar el número de semillas (sobre-siembra) a usar en la prueba de germinación. De esta manera nos aseguramos que el ensayo tendrá aproximadamente el número de semillas potencialmente viables requerido.

$$\text{Sobre-siembra} = \text{semillas necesarias por el ensayo} / \text{proporción de semillas llenas}$$

Por ejemplo, si la proporción de semillas llenas resultó 0.9, la sobre-siembra de un ensayo que requiere 50 semillas es de 56 semillas ($50 / 0.9 \approx 56$).

Para que la prueba de germinación sea reflejo de la viabilidad de la muestra, se recomienda utilizar idealmente 50 semillas llenas por ensayo, o, incluso mejor, 2 o 3 réplicas de 50 semillas. En el caso que la muestra colectada sea pequeña, se puede utilizar hasta 10 semillas solamente. El Cuadro 3 muestra una idea de cómo se puede elegir el número de semillas por ensayo y cuantos ensayos

realizar en función del tamaño de la muestra colectada. En todos casos no usar más del 10% de la accesión para el ensayo de germinación.

Es muy importante que la submuestra de semillas para el ensayo de germinación sea obtenida al azar, homogeneizando previamente la muestra y tomando la submuestra con una cucharita, evitando así, seleccionar las semillas (ver sección 6e).

Tamaño de la colecta*	Número de semillas llenas por ensayo	Máximo número de ensayos
≥ 1,000	25 - 50	4 – 10
≥ 500	25	2 – 4
≥ 250	10	2 – 4
< 250	0	0

Cuadro 3. Número de semillas a usar por ensayo de germinación y número máximo de ensayos dependiendo del tamaño de la colecta (* Excluyendo las semillas vacías / infestadas)

Por cada accesión es necesario anotar en una ficha toda la información generada de los ensayos de germinación (ver el modelo de ficha en el Anexo 5). Por cada ensayo registrar las condiciones de germinación (temperatura, luz, etc.), eventuales tratamientos pre-germinativos, fecha de inicio del ensayo, cantidad de semillas sembradas, cantidad de semillas germinadas por cada día de conteo, resultados de la prueba de corte final y porcentaje de germinación.

El ensayo de germinación más exitoso, rápido y simple será aceptado como protocolo de propagación de la accesión, y podrá ser repetido en el tiempo para monitorear la longevidad de la colecta. En bancos de semillas tradicionales que almacenan a -20°C y 15% HRe, el intervalo de tiempo típico es de 10 años para monitorear la viabilidad de las accesiones.

7b. Prueba de tetrazolio

Cuando se dispone de un laboratorio, es posible realizar esta prueba bioquímica de viabilidad. Una solución al 1% del compuesto químico de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio es capaz de reaccionar con los iones hidrógenos resultantes de los procesos de respiración celular, tiñendo de color rojo aquellos tejidos metabólicamente activos.

Esta prueba resulta también destructiva, pero entrega resultados más certeros que una prueba de corte que sólo se basa en el aspecto de las semillas. La ventaja de la prueba de germinación, si es exitosa, es que además de verificar con certeza la viabilidad de las semillas, también determina el protocolo de propagación. Sin embargo, la prueba de tetrazolio proporciona en forma confiable y en un corto tiempo información sobre la viabilidad de las semillas. Por eso resulta muy útil en los casos en que las pruebas de germinación no resulten y queramos confirmar la viabilidad estimada en la prueba de corte final, o cuando no se dispone de tiempo y equipo para realizar la prueba de germinación.

Se aconseja usar muestras de 50 a 100 semillas llenas (ver sección 6d), si las muestras son lo suficientemente grandes.

Protocolo

- Pre-embeber las semillas sometiéndolas a una atmósfera de máxima humedad durante 24 horas, poniéndola en suspensión sobre agua pero no en contacto directo con esa (figura 16).



Figura 16. Pre-imbibición de las semillas sobre agua.

- Embeber las semillas sobre agar o papel filtro por 24 a 48 horas.
- Cortar las semillas parcialmente, eliminando cubiertas duras, restos de fruto o mucílagos que puedan impedir el ingreso de la solución de tetrazolio a los tejidos o al embrión. En muchos casos es necesario cortar parcialmente las semillas exponiendo también el endosperma y ocasionalmente el embrión. Consultar los manuales ISTA (2003), AOSA (2010) and Moore (1985) para indicaciones sobre el tipo de corte.
- Remojar las semillas cortadas en la solución de tetrazolio e incubar a 30°C en oscuridad, por otras 12 a 24 horas. Especies con metabolismos excesivamente lentos pueden remojar por más tiempo en la solución con el fin de obtener una respuesta más evidente. Consultar los manuales ISTA (2003), AOSA (2010) and Moore (1985) para más detalles. Es importante recalcar que la incubación y el almacenamiento de la solución deben hacerse en oscuridad, dado que el tetrazolio es degradado por la luz, perdiendo su efectividad. Para ello se recomienda cubrir con papel aluminio el recipiente de las semillas embebidas con tetrazolio, al igual que el frasco conteniendo la solución.
- Sacar las semillas de la solución y diseccionarlas bajo el microscopio, evaluando la coloración en varios grados de rojo. Se necesita hacer notar que en algunas especies, p.ej. las de Papaveraceae y Primulaceae, el endosperma es un tejido vivo, por lo que el grado de coloración después del tetrazolio tendrá que también ser evaluada. En otras especies, p.ej. las de Poaceae y Cyperaceae, el endosperma es un tejido muerto, que no se colorará. Consultar los manuales ISTA (2003), AOSA (2010) and Moore (1985) para información sobre la naturaleza del endosperma y la evaluación de la coloración.
- Registrar los datos en una ficha como la indicada en el Anexo 6.

8. Almacenamiento de semillas

Las semillas constituyen la estructura donde naturalmente las plantas "almacenan" su descendencia, por lo tanto, morfológicamente poseen estructuras destinadas a su protección. Particularmente, las semillas ortodoxas poseen una condición fisiológica (tolerancia al secado) que les da la capacidad de esperar condiciones adecuadas para que la germinación de las semillas se produzca, permitiendo el establecimiento de plántulas aumente sus probabilidades de perpetuarse en su hábitat natural (ver Anexo 8). Mientras estas condiciones no se produzcan, las semillas se encontrarán en latencia, prolongar esta latencia es lo que simplemente pretende hacer el almacenamiento.

Las condiciones más importantes para aumentar la longevidad de las semillas ortodoxas son sin duda alguna la humedad y la temperatura. Con ambas variables controladas a condición estandar se minimiza la actividad metabólica de las semillas y por ende su envejecimiento. En lo posible, ambas variables deben mantenerse bajas, por lo que se habla de que las condiciones estándares de -20°C y 15% de humedad relativa de equilibrio (HRe), es decir 4-7% de contenido de humedad (Gold, 2014) [Technical Information Sheet 04](#), para conservación a largo plazo (sobre 15 años). Las semillas almacenadas alrededor de 5°C y 15% de HRe se podrán conservar a mediano plazo (3 – 15 años). Una humedad más baja que la propuesta, puede causar daños a las semillas, ya que elimina el agua estructural de las moléculas. Es importante que las semillas sean secadas antes del congelamiento, porque si son expuestas a bajas temperaturas sin secarse, los cristales de hielo formados al interior pueden dañar los tejidos y por lo tanto pueden matar las semillas.

En general las semillas pueden sobrevivir sin problemas uno o dos años en condiciones ambientales, incluso algunas mucho más. Algunos estudios han determinado que por cada 5 grados Celsius de temperatura que se reducen en el almacenamiento, la longevidad de las semillas se duplica. Lo mismo ocurre por cada disminución de HR de 10%.

8a. Secado de las semillas

Mientras más pronto se realiza el proceso de secado, siempre que las semillas sean maduras, más larga es la esperanza de vida (tiempo de sobrevivencia) de la muestra colectada (Gold, 2014) [Technical Information Sheet 04](#). Esto evidentemente vale solo por las semillas ortodoxas (ver el Anexo 8).

El secado se puede realizar al aire libre, en condiciones frescas y bien ventiladas. Sin embargo, se debe tener el cuidado de almacenar las semillas por la noche para evitar que estas absorban humedad del aire. Esto se debe a que las semillas son materiales altamente higroscópicos y que por lo tanto intercambian muy fácilmente humedad con el ambiente. La velocidad de intercambio de humedad de las semillas variará un poco entre el proceso de entrada y salida. Es decir, será más fácil que una semilla absorba humedad que la pierda, por lo tanto, durante una noche húmeda podrá absorber más agua de la que perdió durante el día.

Para optimizar y acelerar el secado de semillas se pueden utilizar algunos desecantes (figura 17). Esto es especialmente importante si se pretende conservar las semillas a largo plazo. El gel de sílice es ampliamente usado para secar semillas, pero se debe tener en cuenta que el secado debe ser un proceso lento para que sea completamente eficiente, no cause daño y sea capaz de prolongar la vida de las semillas. Para ello se recomienda empezar colocando en un recipiente de vidrio igual proporción de gel de sílice, previamente secado, que semillas. Serrar el frasco y monitorear la pérdida de humedad, pesando las semillas o utilizando un higrómetro (ver abajo). Mover las semillas en contenedores conteniendo una proporción mayor de gel de sílice para alcanzar el 4-7% de contenido de humedad aconsejado. El secado puede demorar hasta un mes, según el tamaño y volumen de las semillas y su humedad inicial.

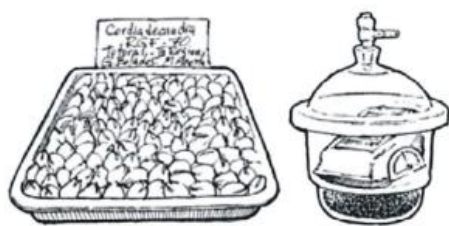


Figura 17. Métodos de secado de semillas. A la izquierda, secado al aire. A la derecha, secado en desecadores herméticos y utilizando sustancias desecantes

En figura 18 se muestra un ejemplo de equipo para secar con gel de sílice en barriles azules provisto por el Kew. El desecante (gel de sílice) se coloca en la base del barril, y las colectas de semillas se colocan en una malla central que permite la circulación del aire seco dentro del barril azul.

Figura 18. Secando colectas de semillas en bolsas de tela en un barril azul con gel de sílice.



El carbón o semillas de arroz, previamente secados dentro de un horno o estufa, funcionan también como buenos desecantes. En este caso se aconseja una proporción entre semillas y desecantes de 1:3 (Sutcliffe & Adams, 2014a y b) [Technical Information Sheet 07](#), [Technical Information Sheet 08](#). Para regenerar los desecantes (arroz, carbón o gel de sílice), se necesita secarlos regularmente poniéndolos en una bandeja de metal poco profunda en el horno por algunas horas. En el caso del gel de sílice la temperatura ideal es 100°C por 1-2 horas, o hasta que las perlas verdes se vuelvan anaranjadas (Sutcliffe & Adams 2014a) [Technical Information Sheet 07](#). En el caso del arroz o carbón, es mejor utilizar una temperatura más baja para que no se queme y pierda su propiedad higroscópica.

Sin embargo, el método más efectivo para secar semillas es el uso de una incubadora de desecación o una sala de desecación (Linnington & Manger, 2014a) [Technical Information Sheet 11](#).

Tenga en cuenta que las semillas pequeñas y de vida corta (p.ej. Orchidaceae) solo deben secarse durante 1 semana y prontamente se deben almacenar en baja temperatura para preservar sus longevidad.

Medición del contenido de humedad de las semillas

La forma tradicional para medir el contenido de humedad de las semillas es el método gravimétrico. Este consiste en registrar el peso de una muestra de semillas antes y después de 17 horas puestas en el horno a $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, seguido de 1 hora en un contenedor cerrado conteniente gel de sílice a temperatura ambiente. La diferencia de peso dividido por el peso inicial (fresco) de la muestra determina el contenido de humedad, o sea la proporción de agua contenida en las semillas. Para más detalles se consulte Bacchetta *et al.* (2008) http://www.ahim.org/docs/Conservacion_ex-situ_0.pdf y el video descargable en https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/videos/measurement_of_seed_moisture_content.flv.

Medición de la humedad relativa de equilibrio (HRe) de las muestras de semillas utilizando un higrómetro

La medición de la humedad relativa (HR) puede usarse en lugar del método gravimétrico para determinar el estado de humedad de las semillas en manera más rápida y no destructiva. En principio, el higrómetro mide la humedad relativa de equilibrio (HRe) del aire alrededor de las semillas contenidas dentro de un contenedor sellado. Este aire generalmente alcanza el equilibrio con las semillas en aproximadamente 30 minutos (Gold & Manger, 2014a) [Technical Information Sheet 05](#).

Los higrómetros se usan principalmente como métodos precisos, no destructivos y rápidos para estimar el estado de humedad de la muestra de semillas. También se pueden usar para monitorear HR y temperatura ambiental o HR del desecante utilizado.

Procedimiento

Coloque una muestra de semillas en el contenedor del higrómetro (figura 19). Esta muestra debe ocupar no menos del 50% del volumen del contenedor. Para evitar lecturas imprecisas, no toque las semillas o el interior de las cámaras de medición y no respire cerca de los sensores.

Permita por lo menos 30 minutos para que las semillas alcancen el equilibrio. Lo ideal es tomar medidas periódicas (o utilizar un registrador de datos) para trazar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

Registre la HRe y la temperatura final.

- Siempre use un instrumento calibrado.
- Cuando sea posible utilice el mismo instrumento en futuras mediciones.
- Todas las superficies internas de los contenedores deben estar completamente limpias y secas (use solamente agua desionizada y/o alcohol).
- Los instrumentos generalmente se calibran a 20°C cada seis meses.



Figura 19. Medición de la humedad relativa de las semillas con el uso de un higrómetro.

8b. Almacenamiento

Luego que las semillas estén secas, estas pueden ser guardadas en recipientes herméticos para ser almacenadas en frío. Este proceso tiene que ser muy rápido si se trabaja en condiciones de humedad ambiental, porque las semillas absorben humedad muy rápidamente, especialmente si se trata de semillas de tamaño pequeño.

Recordar que las semillas son un material altamente higroscópico, es decir, que absorben humedad hasta equilibrarse con el ambiente, por esta razón una vez secas, deben ser almacenadas utilizando envases herméticos, antes de ser introducidas a bajas temperaturas, para evitar que absorban la humedad del refrigerador o cámara fría.

Se recomienda utilizar envases de vidrio o plástico herméticos o bolsas de aluminio tri-laminadas selladas (Gold & Manger, 2014b) [Technical Information Sheet 06](#).

Coloque un indicador de gel de sílice en el envase o bolsa utilizada. La función de este indicador no es absorber la humedad de las semillas, sino que sirve como indicador de que si el sello u otra parte del contenedor esta roto, por lo tanto, del ingreso de humedad. El cambio de color para la sílice de violeta de metilo es de naranja (seco) a verde (húmedo). Si se descubre que un indicador se puso verde, vuelva a secar las semillas e inserte un nuevo indicador.

Se vuelve a recalcar que es muy importante en esta etapa mantener la identificación de las muestras (número de accesión y especie). Por esto se aconseja colocar una etiqueta en el interior del recipiente con semillas, además de la rotulación que llevará el envase por el exterior. Registrar la fecha de envasado. Esta información será importante para determinar la edad de las muestras. También se puede asignar a la accesión un número de ubicación único dentro de la cámara de almacenamiento. Esto hará más fácil su localización posterior.

La temperatura de almacenamiento de los bancos de semillas internacionales es de -20°C (Linington & Manger, 2014b) [Technical Information Sheet 12](#) (figura 20). Sin embargo, también es posible conservar en Nitrogeno Liquido (criopreservación) las semillas ortodoxas. En la mayoría de los casos esto tipo de conservación prolonga significativamente la longevidad de las semillas, y se aconseja en particular para especies con semillas de vida corta o para especies raras y amenazadas (ENSCONET, 2009).



Figura 20. Almacenamiento de semillas en bancos de semillas, las colectas equilibradas a 15% de HRe y almacenadas en condiciones estándares de -20°C , utilizando envases herméticos.

Extracción y devolución de objetos desde y hasta un cuarto frío a -20°C

1. Las semillas se ingresan a la cámara base para su conservación en el largo plazo. Por ello restringir al máximo posible el sacar los envases con semillas desde la cámara base.

2. El personal autorizado deben ingresar a la cámara base, vistiendo ropa adecuada (buzo y guantes térmicos) para protección a las bajas temperaturas.
3. En todo momento mantener cerradas las puertas herméticas de las cámaras, además, por seguridad encender el monitor de video e informar a otro personal que se está adentro de la cámara base.
4. Retirar los frascos desde la cámara base conteniendo las muestras requeridas y dejarlas por un día en la antecámara para acondicionamiento de temperatura de las semillas. Por ningún motivo abrir los frascos inmediatamente después de ser sacados de la cámara base. Después de mínimo 24 horas abrirlos para sacar la cantidad de semillas requeridas.
5. Una vez que se saquen las semillas, regresar inmediatamente el envase nuevamente sellado a la antecámara. Por ningún motivo, dejar el(los) frasco(s) en el laboratorio (fuera de la antecámara) mas allá del tiempo máximo necesario para contar y separar las semillas requeridas.
6. Al día siguiente poner nuevamente los frascos a la misma ubicación que estaban dentro de la cámara base. Asegurarse que las semillas tengan 15% de HRe antes de ponerla nuevamente en el cámara frío.

9. Manejo de los datos

Es de vital importancia mantener una base de datos de todas las muestras colectadas, que contenga como mínimo información sobre el número de colecta, el número de accesión, la especie, las fechas de las varias etapas desde la recolección hasta el almacenamiento y la ubicación en el lugar de almacenamiento. También es útil incluir el número de semillas ajustada.

En el Anexo 3b se entrega un ejemplo de hoja de resumen para sistematizar información para la base de datos. Cada línea corresponde a una colecta. Las celdas se van llenando cada vez que se alcanzan las etapas. En esta manera es posible hacer el seguimiento del estado en que se encuentra cada muestra durante su procesamiento y siempre ubicarlas. Esta información está relacionada con las registradas en la hoja de seguimiento (ver Anexo 3a). Una base de datos completa idealmente incluirá todas esta información, además de los datos de campo registrados en la ficha de recolección (ver Anexo 2b).

Es importante mantener la base de datos actualizada. Especialmente, ajustar periódicamente la cantidad de semillas disponibles descontado cada vez que salgan semillas del bancos para monitoreo y distribución. Por ejemplo, semillas para pruebas de viabilidad, proyectos de investigación, restauración, reforestación, etc. En el Anexo 3c se entrega como ejemplo una planilla donde se puede registrar estos datos.

Bibliografía

NB Las Hojas de Información Técnica MSBP y otros materiales están disponibles en

<http://brahmsonline.kew.org/msbp/Training/Resources>

AOSA (2010) Tetrazolium Testing Handbook. Ed: A.L. Miller. Association of Official Seed Analysts and The Society of Commercial Seed Technologists.

Bacchetta G., Bueno Sanchez A., Fenu G., Jimenez-Alfaro B., Mattana E., Piotto B. & Virevaire M. (2008) Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp.

http://www.ahim.org/docs/Conservacion_ex-situ_0.pdf

Baskin C.C. & Baskin J.M. (2014) Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination (2nd Ed.)

Bernal R., Robbert Gradstein S., Celis M. (2016) Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia, Volumen 1. Universidad Nacional de Colombia

Davies R., Di Sacco A., Newton R. (2015a) Technical Information Sheet_13a “Germination testing: procedure and evaluation” Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/13a-Germination-testing-procedures.pdf>

Davies R., Di Sacco A., Newton R. (2015b) Technical Information Sheet_13b “Germination testing: environmental factors and dormancy-breaking treatments” Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/13b-Germination-testing-dormancy.pdf>

ENSCONET (2009) ENSCONET: Protocolos de conservación y Recomendaciones. Royal Botanic Gardens, Kew. http://ensconet.maich.gr/PDF/Curation_protocol_Spanish.pdf

Gold K. & Hay F. (2014) Technical Information Sheet_10 “Identifying desiccation-sensitive seeds” Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/10-Desiccation-tolerance.pdf>

Gold K. & Manger K. (2014a) Technical Information Sheet_05. “Measuring seed moisture status using a hygrometer” Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/05-eRH-moisture-measurement.pdf>

Gold K. & Manger K. (2014b) Technical Information Sheet_06. “Selecting containers for long-term seed storage” Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/06-Containers.pdf>

Gold K. (2014) Technical Information Sheet_04. "Post-harvest handling of seed collections" Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/04-Post-harvest-handling.pdf>

Gold K., León-Lobos P., Way M. (2004) Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Boletín INIA 110, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile. http://www.inia.cl/recursosgeneticos/descargas/manual_de_semillas.pdf

Gonzalez M. A., Arenas-Castro H. (Eds). 2017. Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. 33 pp. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/33659>

Hong T.D. & Ellis R.H. (1996) A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI.

Hong T.D., Linington S., Ellis R.H. (1998) Compendium of information on seed storage behaviour. Vol.1: A-H; Vol.2: I-Z

ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing, Vol I & II (2003) International Seed Testing Association. With supplements 2011.

León-Lobos P., Sandoval A., Bolados G., Rosas M., Stark D., Gold K. (2014) Manual de recolección y procesamiento de semillas de especies forestales. Boletín INIA 280, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile. <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/Boletines/NR39373.pdf>

Linington S. & Manger K. (2014a) Technical Information Sheet_11. "Seed bank design: seed drying rooms" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/11-Seed%20drying-room-design.pdf>

Linington S. & Manger K. (2014b) Technical Information Sheet_12. "Seed bank design: cold rooms for seed storage" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/12-Cold-room-design.pdf>

Luteyn J.L. (1999) Paramos: A Checklist of Plant Diversity, Geographical Distribution, and Botanical Literature (Memoirs of The New York Botanical Garden Volume 84)

Maclean, I.M.D. & Wilson, R.J. (2011) Recent ecological responses to climate change support predictions of high extinction risk. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 12337–12342.

Martin A.C. (1946) The comparative internal morphology of seeds. The American Midland Naturalist 36(3): 513-661 https://www.jstor.org/stable/2421457?seq=1#page_scan_tab_contents

Maunder M., Guerrant E.O., Havens K., Dixon K.W. (2004) Realizing the full potential of *ex situ* contributions to global plant conservation. En: Guerrant Jr, Havens K, Maunder M, editors. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Society for Ecological Restoration International. Center for Plant Conservation. Washington: Island Press: 389–418.

Monasterio, M. (1980) Los Páramos Andinos como región natural. Características biogeográficas generales y afinidad con otras regiones andinas. En: Monasterio, M. (Ed): Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos. Editorial de la Universidad de Los Andes. Mérida, pp. 15-27

Moore R.P. (1985) Handbook on Tetrazolium Testing. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.

Pence, V (2013) In Vitro Methods and the Challenge of Exceptional Species for Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation Annals of the Missouri Botanical Garden 99(2):214-220. 2013 <https://doi.org/10.3417/2011112>

Royal Botanic Gardens Kew (2016). The State of the World's Plants Report – 2016. Royal Botanic Gardens, Kew

Schmidt L. (2000) Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed' by Danida Forest Seed Centre. [http://research.ku.dk/search/?pure=en/publications/guide-to-handling-of-tropical-and-subtropical-forest-seed\(04448600-8813-11df-928f-000ea68e967b\).html](http://research.ku.dk/search/?pure=en/publications/guide-to-handling-of-tropical-and-subtropical-forest-seed(04448600-8813-11df-928f-000ea68e967b).html)

Smith R.D. *et al* (2003) Royal Botanic Gardens, Kew. Seed Conservation. Turning science into plants. S. Dickerson Ed.

Sutcliffe V. & Adams J. (2014a) Technical Information Sheet_07. "Low-cost monitors of seed moisture status" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/07-Low-cost-moisture-monitors.pdf>

Sutcliffe V. & Adams J. (2014b) Technical Information Sheet_08. "Small-scale seed drying methods" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/08-Small-scale-drying-methods.pdf>

Technical Bulletin Nº1. International Plant Genetic Resources Institute, Roma. 64 p.

Terry J. & Sutcliffe V. (2014) Technical Information Sheet_14. "Cleaning seed collections for long-term conservation" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/14-Seed-cleaning.pdf>

Urban M.C. (2015) Accelerating extinction risk from climate change. Science 348 (6234): 571-573. DOI: 10.1126/science.aaa4984

Way M. & Gold K. (2014a) Technical Information Sheet_02. "Assessing a population for seed collection" Millennium Seed Bank Partnership, Kew. <http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/02-Assessing-population.pdf>

Way M. & Gold K. (2014b) Technical Information Sheet_03. "Seed collecting techniques" Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

<http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/03-Collecting-techniques.pdf>

Williams R.L. (1987) A guide to forest seed handling with special reference to the tropics. FAO FORESTRY PAPER 20/2. DANINDA, FAO. <http://www.fao.org/docrep/006/ad232e/ad232e00.htm>

Wyse S. & Dickie D. (2017) Predicting the global incidence of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 105, pp.1082–1093

Anexo 1. Materiales y equipamiento

1a. Para la recolección de semillas y herbarios

- Documentos

Permisos y autorización, manual de recolección de semillas, fichas de evaluación previo a la recolección, fichas de recolección, evaluaciones de riesgos (con detalles de las instalaciones médicas más cercanas), cobertura de seguro.

- Ropa

Incluya calzado y ropa adecuada para el terreno y el clima.

- Equipos para localización geográfica

Mapas, brújula, altímetro, GPS, mapas ruterios.

- Identificación de plantas y evaluación de semillas

Lista de especies prioritarias, guías de flora, manuales de identificación, monografías, fichas de reconocimiento, lupa de mano (10x, 20x), binoculares, navaja (cortaplumas), tijera y/o bisturí, pinzas.

- Recolección de semillas y etiquetado

Varas telescópicas, tijeras podadoras, tijeras extensoras, escaleras, guantes de cuero, malla rachell, lona o manga de plástico, cabuya para sacudir ramas desde el suelo, baldes más cinturón o cuerda para amarrarlo a la cintura, bolsas de tela, bolsas de papel y plásticas (grandes y medianas), recipientes, pinzas, etiquetas, lápices grafito, plumón permanente, línea de tiro y pesos, equipo para trepar árboles (x2)*.

- Preparación de ejemplares de herbario

Prensa(s) y correas para amarrar, papel periodico y cartón, etiquetas y plumones permanentes, bolsas de plástico grandes, alcohol.

- Recolección de muestras para análisis de ADN

Gel de sílice extra fino del 22A° (28-200 de malla) con indicadores de humedad, bolsas Ziploc de 3,5 x 4,5 pulgadas, papeles de filtro (p.ej. para café o té), bolsas de plástico sellables.

- Recolección de datos

Ficha de evaluación previa a la recolección y ficha de recolección, etiquetas, cámara fotográfica (baterías suficientes y cargadores), portapapeles, cuaderno de campo, plumones indelebles y lápiz grafito.

- Transporte/manejo postcosecha

Sobres de cartón, cajas, sacos de tela, cinta adhesiva, recipiente hermético y gel de sílice para secado de semillas, corcheteras y corchetes, cordón, tamices metálicos, bandejas (por si se recoge frutos carnosos).

- Primeros auxilios y seguridad personal

Botiquín completo, botellas de agua, gorros, protección solar, lentes protección solar, repelente de insectos, herramienta de eliminación de garrapatas, traje de agua (en zonas lluviosas), alzado adecuado a las condiciones de terreno, teléfono móvil y cargador, radiocomunicadores, cascos, guantes de cuero.

- Otros materiales

Cuerdas para amarrar o remolcar, juego de cables roba corriente, bidón con agua, estanque adicional de combustible (para áreas remotas), pala y picota pequeña, cadenas.

* Sólo aquellos con calificaciones apropiadas pueden subir árboles

1b. Para el procesamiento y almacenamiento de semillas

- Limpieza y maduración

Bandejas, tamices de varias medidas, tapón, alfombra de goma, red a malla fina, papel periódico o parecido, agua, guantes, arena o ceniza, bolsas de algodón, ventilador, soplador de semillas, hoja de seguimiento.

- Contado

Balanza de 2 y de 4-5 decimales, contenedores para pesar las muestras, cucharitas, cartas para contar las semillas, estereoscopios o lupas, hoja de seguimiento.

- Pruebas de corte y de viabilidad

Pinzas, bisturís, tijeras, tabla de cortar, estereoscopios o lupas, cajas de Petri / bandejas, papel filtro / agar / arena / medio de cultivo, agua, incubadoras, tetrazolio, papel de aluminio, guantes, frascos, colador, ácido giberélico, hoja de seguimiento, ficha de germinación, ficha de análisis de tetrazolio.

- Secado y almacenamiento

Higrómetros, gel de sílice y contenedores herméticos como barriles azules o incubadora secadora, bolsas de algodón o papel, envases herméticos o bolsas de aluminio tri-laminadas con selladores, indicadores de gel de sílice, etiquetas, hoja de seguimiento, hoja de resumen.

Anexo 2. Fichas de campo

2a. Ficha de evaluación previa a la recolección

FICHA DE EVALUACIÓN PREVIA A LA RECOLECCIÓN									
Fecha de evaluación		dd / mm / aaaa				Latitud			
Lugar de recolección (descripción)						Longitud			
						o Malla de Ref			
IDENTIFICACIÓN									
Taxon identificado y taxa similares distinguidos				Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>			
Familia									
Género									
Especie									
EVALUACIÓN DE POBLACIÓN									
Aprox. área de población y unidades (p.ej. m ² ; km ² ; hectáreas)						unidades			
Aprox. número de plantas accesibles (círculo):				1-10	11-50	51-100	101-1000	>1000	
Evidencia de daño/disturbio				Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>			
Detalles p.ej. fuego; herbicidas									
MADUREZ DE LAS SEMILLAS									
Etapas que ocurren con mas frecuencia (marque o dé el porcentaje)									
Vegetativa				%	Con botones florales			%	
Floración				%	Semillas inmaduras			%	
Cerca de la dispersión natural				%	Después de la dispersión			%	
Número estimado de plantas en dispersión natural									
CALIDAD FÍSICA DE LAS SEMILLAS									
Prueba de corte de 10-20 semillas. Estados mas frecuentes: (marque o dé el porcentaje)									
Semillas llenas				%	Semillas vacías			%	
Semillas infestadas				%	Semillas inmaduras			%	
DISPONIBILIDAD DE SEMILLAS									
Número medio de semillas por fruto/unidad de dispersión									
Número medio de frutos/unidades de dispersión por planta									
¿Es posible recolectar 5000-10000 semillas saludables alrededor de la dispersión natural sin tomar más del 20% de las semillas disponibles?				Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>			
Para las poblaciones que aún no están en dispersión natural, estime una fecha adecuada para regresar y recolectar semillas				dd / mm / aaaa					
Otras Notas									

2b. Ficha de recolección

FICHA DE RECOLECCIÓN		Proyecto		Número de accesión:	
Por favor complete todos los campos marcados con un asterisco (*). Utilice LETRAS MAYÚSCULAS.					
DATOS DE COLECTA					
Recolectada de población*	Silvestre <input type="checkbox"/> Cultivada <input type="checkbox"/>	Institución recolectora			
Fecha de recolección*	dd / mm / aaaa		Número de colecta*		
Recolector principal*	nombre		institución afiliada		
Otros recolectores					
Nombres & Instituciones					
IDENTIFICACIÓN					
Familia*			Identificador		
Género*			Institución identificador		
Especie*			Fecha Identificación (ID)		dd / mm / aaaa
Subespecie	rango	especie			
Estado de ID* (circulo):	Recolector	Provisional	Especialista en campo	Otra institución	
ID desde (circulo):	Material vegetal vivo	Espécimen de herbario	Foto	Semillas	
Descripción de la planta* (color de la flor, olor, etc.)			Altura planta (m):		
Forma de vida* (circulo):	Epífita	Hierba	Pasto	Liana	Arbusto
	Hierba Erecta	Cojín	Crepadora	Otra:	
Usos (circulos):	Forrajero	Planta de Abeja	Comestible	Combustible	Materiales
	Aditivo Alimentario	Veneno	Uso Ambiental	Uso Social	Otro:
DATOS DE LOCALIZACIÓN					
País*					
Región/Provincia			Distrito/Municipio		
Lugar de recolección (descripción)					
Latitud*		unidad	o Malla de Ref		
Longitud*		unidad	GPS Datum* (p.ej. WGS 84)		
Método (circulo):	Compilador	Google Map/Earth	GPS	Mapa	Website
Altura (m)		Método Altura (circulo):	Altímetro	GPS	Mapa
				Website	
INFORMACIÓN DEL HABITAT					
Habitat*					
Especies Asociadas					
Factores que afectan al habitat (p.ej. inundaciones)					
Topografía (p.ej. colina)			Textura del Suelo (circulo):	Arcilloso	Marga
Uso del Suelo (p. ej. granja)				Limoso	Arenoso
Geología (p.ej. basalto)			Otro:		
Pendiente (circulo): 0° 1-5° 5-15° 15-30° 30-45° >45°			Exposición (circulo): N NE E SE S SW W NW		
DATOS DE MUESTREO					
Número de Plantas Muestreadas*		Area Muestreada (m²)*			
Número de Plantas Encontradas*		% Plantas que producen semillas*			
Especímen de herbario*	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Especímen enviado a Kew		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Número herbario					
Otras Notas					

Anexo 3. Hojas de seguimiento, de resumen y de uso de las accesiones

3a. Hoja de seguimiento

Número de accesión:		
Número de colecta		
Genero y especie		
Notas (p.ej. irritante, cuarentena, etc.)		
Especímenes de herbario? Si / No	Número / Ubicación	

Notas de limpieza y maduración

Procesos (agregue más filas según lo necesario)	Duración	Fecha	Encargado

Prueba de corte para la calidad

Encargado		Los valores calculados están en celdas grises
Fecha		
Número de semillas cortadas		
Número de semillas llenas		
Número de semillas vacías		
Número de semillas infestadas		
Proporción de semillas llenas (0-1)		como calcular: llenar/cortadas

Cantidad de semillas

Encargado		como calcular: peso muestra/ n
Fecha		
Número de semillas en la muestra (n)		
Peso muestra de n semillas		
Peso medio de 1 semilla		
Peso del resto		
Cantidad actual de semillas		(peso del resto/peso medio de 1 semilla) + n

Cantidad ajustada de semillas

Número de semillas llenas		cantidad actual * proporción de semillas llenas
---------------------------	--	---

Secado de las semillas (agregue más filas según lo necesario)

Etapas comprobación HRe	Fecha	% HRe	Temp (°C)	Encargado
Antes de puesta en el barril de sílica				
Antes del almacenamiento				



Debe ser 15% HRe \pm 2%

3b. Hoja de resumen

[illegible]

3c. Hoja de uso

[illegible]

Anexo 4. Familias que contienen especies con semillas con dormancia física

ANACARDIACEAE (incluyendo PODACEAE)

BIEBERSTEINIACEAE (Previamente GERANIACEAE)

BIXACEAE (incluyendo COCHLOSPERMACEAE & DIEGODENDRACEAE)

CANNACEAE

CISTACEAE

CONVOLVULACEAE (incluyendo CUSCUTACEAE)

CUCURBITACEAE

DIPTEROCARPACEAE (subfamilias: MONTOIDEAE & PAKARAIMOIDEAE)

FABACEAE / LEGUMINOSAE (subfamilias CAESALPINIOIDEAE, MIMOSOIDEAE & PAPILIONOIDEAE)

GERANIACEAE

MALVACEAE (incluyendo BOMBACACEAE, STERCULIACEAE & TILIACEAE)

MUNTINGIACEAE

NELUMBONACEAE

RHAMNACEAE

SAPINDACEAE (incluyendo HIPPOCASTANACEAE & ACERACEAE)

SARCOLAENACEAE

SIMAROUBACEAE (Previamente ANACARDIACEAE)

VIVIANIACEAE (Previamente GERANIACEAE)

Modificado de Baskin C.C. (2003) *Breaking physical dormancy in seeds: focussing on the lens*. New Phytologist 158(2): 229-232, y actualizado según la última clasificación taxonómica APG / SBD.

Anexo 5. Ejemplo de ficha de germinación

FICHA DE GERMINACIÓN (1 Rep)

DATOS DE COLECTA

N° DE ACESIÓN		FAMILIA		N° CORTADAS		CANTIDAD ACTUAL DE SEM.	
FECHA DE RECOLECCIÓN		GENERO		N° LLENAS		CANTIDAD AJUSTADA DE SEM.	
FECHA DE ALMACENAMIENTO		ESPECIE		N° VACIAS		N° DE SEM. / FRUTO	
LUGAR DE RECOLECCIÓN				N° INFESTADAS			

DATOS DE GERMINACIÓN

DÍA										FRESCAS	MUERTAS	VACIAS	INFEST.	FECHA INICIO:
REP 1														
TOTAL														GERM % <input type="text"/>

CONDICIONES:

NOTAS:

FICHA DE GERMINACIÓN (2 Rep)

DATOS DE COLECTA

N° DE ACESIÓN		FAMILIA		N° CORTADAS		CANTIDAD ACTUAL DE SEM.	
FECHA DE RECOLECCIÓN		GENERO		N° LLENAS		CANTIDAD AJUSTADA DE SEM.	
FECHA DE ALMACENAMIENTO		ESPECIE		N° VACIAS		N° DE SEM. / FRUTO	
LUGAR DE RECOLECCIÓN				N° INFESTADAS			

DATOS DE GERMINACIÓN

DÍA										FRESCAS	MUERTAS	VACIAS	INFEST.	FECHA INICIO:
REP 1														
REP 2														
TOTAL														GERM % <input type="text"/>

CONDICIONES:

NOTAS:

Anexo 6. Ejemplo de ficha de análisis de tetrazolio

Ficha de análisis de Tetrazolio

Nº de accesión _____ Especie _____

Fecha _____ Encargado _____

Estructura de diaspota & corte por TZ	Ilustración/descripción de tinción	Resultado	Interpretación de viabilidad

Resultado TZ ____ %

Notas

--

Número de semillas utilizadas:

Días sobre el agua:	Temperatura:
Días sobre agar/papel filtro:	Temperatura:
Días en solución TZ:	Temperatura:

Pautas generales para el procedimiento

1. Coloque las semillas secas en suspensión sobre agua por 1 día a 20°C.
2. Coloque las semillas sobre agar/papel filtro por 1-3 días a 20°C.
3. Realice la prueba de corte después de la imbibición para determinar la estructura de la diaspota. Ilustrar en la hoja.
4. Realice la técnica de escisión final.
5. Coloque las semillas seccionadas en una solución de TZ al 1% durante 48 horas en la oscuridad a 30°C.
6. Registre los resultados de la tinción de color y el estado del tejido.

Anexo 7. Salud y seguridad

Campo:

- Se recomienda que al menos un miembro del grupo de recolección tenga conocimientos básicos de primeros auxilios.
- Como parte de la planificación previa debe informarse y prepararse sobre las posibles enfermedades endémicas en las regiones de recolección, por ejemplo el virus Hanta, el mal de Chagas, la Malaria, Dengue, etc.
- Considere cuáles son las condiciones locales (pronóstico del tiempo, p.ej. inundaciones, tormentas eléctricas). ¿Es posible que el terreno cause problemas (p.ej. caminar sobre pendientes empinadas o a lo largo de los bordes de los acantilados)? ¿La altura del sitio puede causar mal de montaña (soroche)?
- Si va en grupo, es recomendable verificar si alguno de los miembros del grupo tiene problemas de salud subyacentes (p.ej. antecedentes de angina de pecho, alergias graves, diabetes, etc.).
- Muchas especies de plantas contienen savia que puede ser irritante para la piel o incluso tóxica. Si alguien es particularmente propenso a problemas en la piel, o si no está seguro de los efectos de una especie en particular, es recomendable usar guantes durante la recolección y procesamiento.
- Entre los insumos de la recolección, debe incluirse un botiquín de primeros auxilios, incluyendo una lista de las medicinas, su uso y dosis. Si el grupo es de sólo dos personas no deben distanciarse mucho uno del otro durante la recolección. Como norma, es útil que, además del chofer, otro integrante del grupo lleve una copia de las llaves del vehículo, el cual debe ser estacionado en un lugar apropiado y seguro.

Laboratorio

- Para lo que concierne al trabajo de laboratorio, siempre tener cuidado con los bisturís y tijeras, llevar calzados serrados y quitar las hojas de los bisturís cuando no se usan. Utilizar guantes y delantales adecuados cuando se trabaja con químicos como tetrazolio o ácido giberélico, o cuando se manejan plantas irritantes. Usar máscaras contra el polvo cuando se limpian colectas que producen cantidad de material fino que se podría inhalar.

Anexo 8. Categorías de almacenamiento de semillas

La respuesta al almacenamiento es una característica de las semillas que debe ser considerada a lo largo de todo el proceso de recolección. Ésta resulta fundamental debido a que determina la calidad final de la muestra y determina también el tipo de manejo que recibirán las semillas, tanto en terreno como en laboratorio, como en las etapas de transporte, procesamiento y almacenamiento. Ésta es una respuesta fisiológica de las especies a la pérdida de humedad, y permite distinguir, en general, tres grupos de semillas. El primer grupo corresponde a las **semillas ortodoxas**, las cuales son capaces de resistir condiciones de muy baja humedad sin alterar la viabilidad de sus tejidos, siendo capaces de germinar una vez rehidratadas. Estas semillas pueden ser desecadas a contenidos de humedad de 4-7% (equivalente a 15% HRe) para luego ser almacenadas a bajas temperaturas por largos períodos sin perder viabilidad (ver capítulo 8). Se estima que cerca del 92% del total de la flora mundial posee este tipo de semillas. Esta proporción depende del hábitat donde las especies viven. Este manual se entiende como guía para el almacenamiento de semillas ortodoxas.

El segundo grupo corresponde a las **semillas recalcitrantes**, éstas son incapaces de tolerar la pérdida de agua, por esta razón, su viabilidad disminuye drásticamente si son desecadas a menos del 75% de humedad relativa. Este tipo de semillas presenta altos contenidos de humedad al momento de la dispersión, y sólo se conservan vivas mientras ésta sea mantenida. Sin embargo, mantener una condición de alta humedad sube la probabilidad de contaminación de hongos, que inevitablemente daña las semillas. Tampoco estas semillas soportan bajas temperaturas, y ciertamente no se pueden congelar porque se formarían cristales de hielo. Con esto, la posibilidad de germinar y formar una nueva planta se reducen sólo a un corto período de tiempo. Sin embargo, es posible efectuar la criopreservación de estas semillas, normalmente previo extracción de los embriones (Pence 2013). Dependiendo de las distintas especies, podrán soportar desde unas pocas semanas a sólo unas pocas horas si son sometidas a condiciones ambientales secas. Debido a que estas semillas son extremadamente sensibles a la pérdida de humedad, se debe considerar un manejo más delicado, que permitirá mantener su calidad durante la recolección, transporte, procesamiento y almacenamiento. Se estima que el 0,3% de las especies de los desiertos posee semillas intolerantes a la deshidratación (recalcitrantes), mientras en los bosques tropicales húmedos este porcentaje sube al 18,5% (Wyse & Dickie, 2017).

Un tercer grupo corresponde a las **semillas de respuesta intermedia**, que toleran un secado medio, típicamente hasta el 40-50% de humedad relativa. Estas semillas no sobreviven mucho tiempo en almacenamiento, y la viabilidad disminuye a temperaturas más bajas de 15°C.

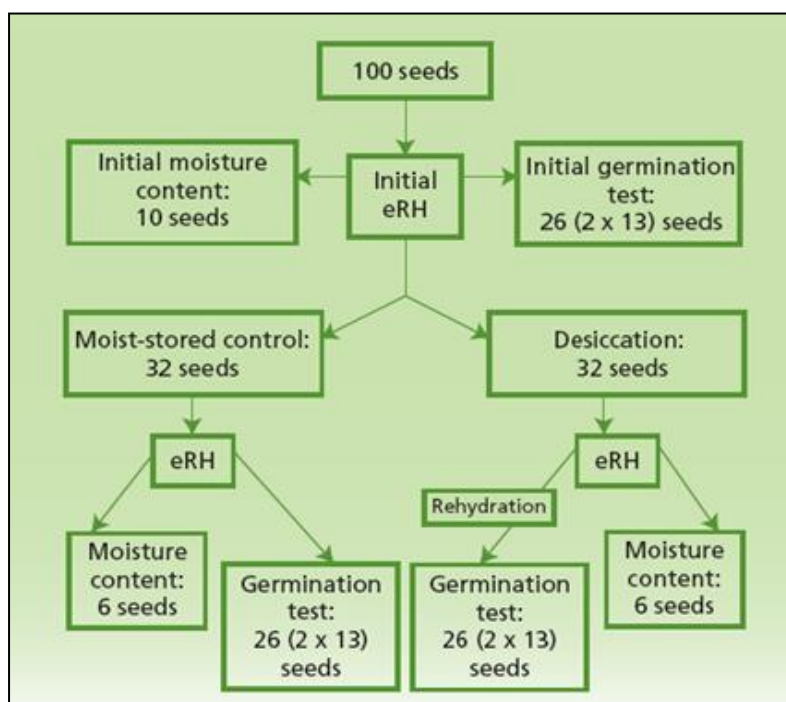
¿Cómo se puede reconocer las semillas potencialmente recalcitrantes?

Lamentablemente, no es posible establecer una regla general para clasificar el tipo de semillas en función de su respuesta al secado. La única forma es evaluar experimentalmente la respuesta al secado. Sin embargo, existe una serie de características que permitirían inferir el tipo de semilla. En general, las semillas recalcitrantes son típicamente grandes (diámetro más de 1cm), con testas delgadas, membranosas y de aspecto húmedo, y un embrión de gran tamaño en relación a la semilla, muchas veces de color verde. También su dispersión puede estar acoplada a la temporada de lluvias.

De acuerdo a Wyse & Dickie (2017), especies de un mismo género tienen muy alta probabilidad de tener al misma respuesta al secado y almacenamiento.

Es posible consultar online la base de dato “Seed Information Database” del Royal Botanic Gardens, Kew (<http://data.kew.org/sid>) donde están registradas informaciones sobre muchos taxa.

En el caso que se quiera evaluar directamente la tolerancia a la deshidratación, existe una prueba de laboratorio llamada “100 seed test”, sintetizada en el cuadro 4 extraído de Gold & Hay (2014) [Technical Information Sheet 10](#).



Cuadro 4. Diagrama de flujo del “100 seed test” (Gold & Hay, 2014)

Por más información consulte Hong & Ellis (1996) y Hong *et al.* (1998).

Anexo 9. Recolección de tejidos biológicos

De Gonzalez y Quintero (2017)

RECOLECCIÓN DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

AUTORES
Mailyn A. Gonzalez · Lorena Quintero

PLANTAS

RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN


















TEJIDOS FOLIARES

1. Antes de alcoholizar, cortar un par de hojas o folíolos jóvenes que no presenten daños mecánicos o causados por insectos, hongos o exposición al sol. En epífitas o especímenes con hojas muy suculentas o sin hojas, tomar muestras de flores.
2. Rasgar 10 cm² de lámina foliar en trozos pequeños sin incluir nervaduras. Raspar previamente las hojas que tengan muchos tricomas. Rasgar en trozos muy pequeños las hojas suculentas.

TRONCO LENOSO

3. Retirar una porción de la corteza e introducir en el tronco un sacabocado de 1 cm con un martillo hasta alcanzar el corazón de la madera.
4. Retirar la lámina de cambium –tejido húmedo y usualmente colorado– con una navaja.

5. Introducir el tejido en un sobre poroso o bolsas de papel libre de ácido y depositarlo dentro de una bolsa plástica resellable o un tubo con tapa de rosca que contenga 10 veces más gel de sílice que muestra.
6. Verificar constantemente que el gel de sílice permanezca seco y sin hongos.
7. Almacenar las muestras en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente o refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.

ESPÉCIMEN DE HERBARIO

8. Tomar el material foliar desprendido de los sobres que contienen algunas fichas de herbario. Si no lo hay, cortar 1 cm² de material foliar evitando dañar el ápice y la base de la hoja.

6-24 horas

11

Anexo 10. Preparación de agar

De TIS 13a

Cómo preparar 1 litro de agar al 1%:

- Pese 10 g de polvo de agar en una jarra grande y mezcle hasta formar una pasta suave agregando 100 ml de agua destilada fría.
- Agregue 900 ml de agua en ebullición a la pasta de agar y mezcle bien.
- Caliente la solución lentamente, mezclando continuamente hasta que hierva.
- Deje que se enfríe a aproximadamente 50°C antes de verter. 1 litro de agar produce aproximadamente 33 placas de Petri de 9 cm (30 ml por placa)

Para agregar ácido giberélico (GA3):

- Agregue 5 ml de solución madre (ver abajo) a 445 ml de agar hervido (enfriado a 50°C) y vierta las placas como antes.

Para preparar la solución madre de GA3 (250 mg/l):

- Agregue 4.5 g de GA3 a 200 ml* de agua desionizada fresca.
- Ajuste el pH a 6,5 usando hidróxido de sodio / ácido clorhídrico.
- Filtre la solución usando un filtro estéril Nalgene y una jeringa en un cabina de flujo laminar. La solución madre se puede almacenar durante 3 meses a 5°C en la oscuridad.

* Para garantizar que el volumen final no sea > 200 ml, comience con 180 ml y ajústelo después de ajustar el pH.