

## Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera

Judith Prieto Méndez, Francisco Prieto García, Nohemí Hernández Cervantes,  
Julia M. Domínguez Soto y Alma D. Román Gutiérrez

*Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.*

*jud\_292003@yahoo.com; prietog@uaeh.edu.mx*

### Resumen

---

El objetivo del trabajo fue comparar mediante una investigación aplicada métodos analíticos, para evaluar el poder germinativo de granos de *Hordeum distichon* L., de granos cultivados en tres municipios de Hidalgo, México. Se emplearon técnicas reportadas en las normas, como la escarificación de semillas con ácido sulfúrico o la técnica del peróxido de hidrógeno, que incrementan la germinación por ablandamiento de la testa y aumentan la permeabilidad de agua y oxígeno. Y se comparan con otras técnicas colorimétricas como la del tetrazolio, reportada en la norma, la cual está basada en la actividad de enzimas, donde ocurre una reacción de reducción en las células vivas resultando un compuesto rojo (trifenilformazán), que indica que hay actividad respiratoria y que el tejido es viable. Otra técnica evaluada fue la colorimétrica del índigo carmín, reportada por otros autores, que de forma contraria, produce coloración de las partes no viables de la semilla. Y fueron comparadas con la de germinación natural en agua. Los resultados demostraron que las pruebas colorimétricas resultaron mejores predictoras del poder germinativo y que la prueba del índigo carmín resulta ser factible y más económica que la del tetrazolio.

**Palabras clave:** germinación, tetrazolio, índigo carmín, peróxido de hidrógeno.

# Methods for Comparing Germinative Power in *Hordeum distichon* L. Maltera

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the germinative capacity of *Hordeum distichon* L seeds, using analytical applied research methods to compare grains grown in three municipalities of Hidalgo, Mexico. Techniques reported in the standards, such as scarifying seeds with sulfuric acid or the hydrogen peroxide technique, which increase germination by softening the seed coat and increasing the permeability of water and oxygen, were used. They were compared with other colorimetric technologies such as those reported in the standard with tetrazolium, based on enzyme activity, where a reduction reaction occurs in live cells producing a red compound (triphenylformazan) that indicates the presence of respiratory activity and that the tissue is viable. Another technique tested was the colorimetric indigo carmine, reported by other authors, which, in contrast, produces coloration in the non-viable seed parts. Natural germination in water was also compared. Results demonstrated that the colorimetric tests were better predictors of germinative power and the test with indigo carmine is more feasible and cheaper than the test using tetrazolium.

**Key words:** germination, tetrazolium, indigo carmine, hydrogen peroxide.

## Introducción

La calidad de la cebada es un aspecto sumamente importante para la industria maltera. La producción de cebada calidad maltera tiene como base el conocimiento de los procesos de germinación de las especies objeto de interés. Estos procesos germinativos se pueden ver afectados por el estado general de las semillas y su viabilidad.

En cuanto al almacenamiento y conservación de la cebada maltera, el principal problema reside en lograr mantener el máximo poder germinativo, ya que no se puede convertir en malta una semilla que no germine. Una cebada maltera que presente daños en su poder germinativo ha perdido todo su valor para la industria maltera y podrá ser utilizada solamente como forraje [8]. Se debe prestar mucha atención, pues cuando se llega a la humedad de cosecha del semilla (12,5%), el raquis de la espiga se encuentra débil y si no se cosecha enseguida se tienen pérdidas muy importantes por desgrane y quebrado de plantas [12]. Dado que uno de los requerimientos más importantes de la industria es el buen poder germinativo, es preciso que se tomen todos los recaudos necesarios para no disminuirlo en ninguna de las operaciones, poniendo especial énfasis en la rotura de las semillas.

Se debe destacar que las semillas que no germinan por haber sufrido daños durante la cosecha o su posterior almacenamiento se transformarán en focos de infección de la malta, además de alterar los procesos siguientes de malteo y de cerveza. No habrá dificultades para conservar el poder germinativo en una cebada correctamente cosechada, con no más del 12,5% de humedad y condiciones normales de almacenaje [9]. La limpieza y desinfección previa de los silos, la conservación de las semillas a una temperatura inferior a los 25°C, un riguroso control de insectos e inspecciones periódicas para verificar el poder germinativo son factores decisivos para un correcto almacenaje de la cebada [16].

El primer aspecto de importancia a tener en cuenta para la cosecha de la cebada cervecera es considerarla como una semilla y no como un grano, debido a que durante el proceso industrial de malteado debe germinar en su totalidad para lograr su transformación en malta (la industria exige un 85% mínimo de poder germinativo para cebada grado México) [8]. En consecuencia, todo grano que no germine afecta, en gran medida, la calidad industrial del producto final, la eficiencia del proceso y por su puesto el valor comercial.

La validación de la calidad fisiológica es un parámetro importante que debe ser considerado en un programa de producción de semillas, y las pruebas que dan resultados en un periodo de tiempo relativamente corto son los más demandados para agilizar así las tomas de decisiones en las diferentes etapas del proceso productivo, especialmente en la fase de poscosecha [6, 3].

La prueba del tetrazolio se basa en la actividad de las enzimas hidrolasas, particularmente deshidrogenasas del ácido málico que reduce la sal de tetrazolio en los tejidos viables de las semillas, donde los iones de  $H^+$  son transferidos para la referida sal. Cuando la semilla es inmersa en la solución de tetrazolio, ocurre una reacción de reducción en las células vivas resultando en la formación de un compuesto rojo, no difusible, conocido como trifenilformazán, indicando que hay actividad respiratoria en las mitocondrias y, consecuentemente, que el tejido es viable (vivo). Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución conservando su color natural. Se trata de una prueba que a través de la observación de la coloración obtenida en las diferentes partes de la semilla permite determinar la presencia, la localización y la naturaleza de las alteraciones en los tejidos de la semilla, permitiendo frecuentemente identificar las causas de la pérdida de la viabilidad y del vigor [6, 2]. Según Behring y colaboradores [3] y otros autores [2, 14], existe una alta correlación entre las determinaciones de poder germinativo y vigor por tetrazolio, si bien es posible hallar algunas variaciones entre ambos debidos a factores que afectan la germinación como son: factores agroclimáticos, de dormición, de nutrición o agentes patógenos. Se puede conseguir ajustar la exactitud de la interpretación realizando al mismo tiempo las pruebas de tetrazolio y de germinación estándar y comparando los resultados [10, 13].

En la prueba del índigo carmín de forma contraria a la prueba de tetrazolio, se produce una coloración de las partes no viables del grano. Se ha reportado como una técnica útil para especies de pináceas y no hay constancias de su utilización en otras especies [2].

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) ha demostrado que incrementa la germinación en algunas semillas de pino, porque ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno [1], facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para movilización de componentes celulares involucrados en el crecimiento de la raíz [5]. En este mismo sentido se considera la acción del ácido sulfúrico como agente para el escarificado químico [12]. La escarificación de las semillas es una técnica que tienen por finalidad abrir o de-

bilitar la cutícula o estructura externa de los semillas para que la radícula pueda abrirse paso entre ella y se pueda producir la germinación adecuadamente [15].

El objetivo de este trabajo es desarrollar un estudio comparativo entre métodos de análisis para determinar el poder germinativo en semillas de cebada de calidad maltera, tratando de conseguir un método rápido, confiable, sencillo y de bajo costo para diagnosticar este importante indicador de calidad de la semilla.

## Metodología

Se seleccionaron semillas de cebada calidad maltera de la variedad Esmeralda suministrada por los productores de la región, obtenidas de la cosecha 2010 en los municipios de Apan, Almoloya y Emiliano Zapata, estado de Hidalgo. Esta variedad fue obtenida por el INIFAP [17] e introducida en la región. Se utilizó como muestra patrón (control positivo) una cebada de la misma variedad, cultivada en la región y aceptada por los consumidores; la misma fue suministrada por la cervecería Cuauhtémoc Motezuma de Toluca, estado de México. Como control negativo se utilizó una muestra de la misma variedad Esmeralda, pero cultivada en el estado de Puebla y que fuera rechazada por los consumidores (cervecería).

Para la prueba del tetrazolio se utilizaron 4 repeticiones de 100 semillas tomadas al azar. Se preparó la muestra de tetrazolio (cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio) diluyendo la sal de tetrazolio al 1% en una solución tampón de fosfato (2 partes de difosfato de potasio y 3 partes de monofosfato sódico) [8, 7]. Para la preparación de la solución tampón de fosfato se pesaron 2,76 g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y se disolvieron en agua destilada, completando a 100 mL (solución A) y pesar 5,365 g de  $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  que se disolvieron en agua destilada, llevando el volumen final a 100 mL (solución B); mezclar 19 mL de solución A y 81 mL de solución B (100 mL de solución tampón).

Se utilizó el método de tinción en tubos de ensayo de 25 mL. Para esta determinación se contaron al azar 100 granos sanos y se cortaron longitudinalmente y se pasaron 50 medios granos a tubos de ensayo. Se cubrieron con la solución de tetrazolio al 1%. Se trata de una reacción indicadora que se realizó en un baño de agua a temperatura de 45°C para ahorrar tiempo y acelerar la reacción de aparición de un color un rojo rosa a rojo intenso. El tiempo de reacción bajo estas condiciones fueron de 8 minutos mínimo a 15 minutos como máximo. Si se realizaron a temperatura ambiente (25°C) se esperaron 30 minutos como mínimo. Cuando el tiempo de reacción ha terminado, se separaron los granos empleando un pequeño colador; se la-

varon en el mismo colador inmediatamente con agua limpia. Si el embrión presenta una coloración rojo intensa en las estructuras de crecimiento es indicativo de que el embrión está vivo y presenta una gran viabilidad; la falta de coloración y/o colores rosa pálidos, indican la muerte del embrión o poca viabilidad, respectivamente. Para cuantificar el porcentaje de germinación, se determinaron los granos viables (por conteo) y la cifra resulta de la multiplicación por dos y porcentaje de viabilidad para la germinación [16].

Se utilizó de igual manera un método de tinción en tubos de ensayo. Para el ensayo con el reactivo índigo carmín, para esta determinación se contaron al azar 100 granos sanos y se cortaron longitudinalmente procurando no dañar el embrión y se pasaron a tubos de ensayo, conteniendo el reactivo; la prueba del índigo carmín es igualmente una reacción indicadora, es un sistema bastante utilizado desde 1925 [11]. También se tomaron cuatro repeticiones de 100 semillas, y el índigo carmín se preparó añadiendo 0,15 g de índigo carmín en 100 mL de agua. Se sumergieron las semillas 18 horas en agua destilada para reblandecer el endospermo. Posteriormente se sumergieron en la preparación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron y se clasificaron en viables (blancos o con pocas manchas azules nunca localizadas en la radícula), de vitalidad limitada (embriones con dudas), y no viables (zona de la radícula totalmente teñida y embrión teñido).

Se utilizó el método de germinación forzada (pregerminativo) método del peróxido de hidrógeno [16] se contaron 100 semillas de la muestra representativa y se pasaron a un matraz de 125 mL, se adicionó peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Se tapó y se dejó en reposo durante 48 horas. Al término de este tiempo se cuantificaron los granos germinados en la solución, lo cual reportó directamente el porcentaje de germinación.

Otro método de germinación natural forzada utilizado fue el método del ácido sulfúrico [16], se midió en una probeta 50 mL de agua destilada y se vertió en un vaso de precipitado al que se le adicionaron lentamente 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se dejó caer por la pared del vaso. Se contaron 100 granos de la muestra representativa y se pasaron a un matraz de 125 mL donde se le adicionó la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% hasta cubrir perfectamente todas las semillas. Se calentó a temperatura de 45°C hasta que la cascarilla cambió a un color negro. Posteriormente se enjuagó con agua destilada y se mantuvo a 20°C en estufa sobre algodón húmedo en placas petri durante dos días; al término de este tiempo se contaron las semillas germinadas, esto da directamente el porcentaje de germinación.

Como testigo se realizó un proceso de germinación normal por remojo con agua. Para ello se tomaron 100 semillas al azar y se lavaron con agua destilada por 15 minutos. Posteriormente se colocaron en algodones mojados en placas Petri y mantenidos húmedos por 48 horas a 20°C. Al final se contaron los granos germinados [4].

Para las determinaciones de germinación (natural, con peróxido de hidrógeno y con ácido sulfúrico) se realizaron igualmente cuatro réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existen diferencias significativas entre los cuatro métodos.

## Resultados y discusión

Para analizar los resultados se ha considerado más sensato relacionar por una parte las pruebas cuya base es una tinción o prueba colorimétrica (tetrazolio e índigo carmín) y por otra, los que consideran una evaluación de germinación propiamente forzada o pregerminativos (peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico) y compararlos con una germinación natural (en agua). En la Tabla 1 se observan los resultados de las pruebas colorimétricas comparados con la germinación natural.

Se pudo apreciar que el método de germinación natural al término de 48 horas ofrecieron los mejores resultados, corroborando que las semillas de Apan alcanzaron un índice en este indicador que permitieron evaluarlas como alta calidad (96,7% de poder germinativo); por su parte las semillas de Almoloya (86,1%) clasificaron dentro de norma (mínimo 85%) y las de Emiliano Zapata (78,1%), no llegaron a cumplir con las especificaciones establecidas [16], lo cual demuestra que estas últimas no podrían ser comercializadas para fines malteros a por su bajo poder germinativo.

En cuanto a los resultados de las pruebas colorimétricas se pudieron inferir que ambos se comportaron como buenos predictores, sin embargo el método del índigo carmín, a pesar de no estar reconocido en las normas internacionales [2, 16] ofrece ciertas ventajas con relación al método del tetrazolio por cuanto ofrece resultados más elevados de la facultad germinativa y con menores desviaciones estándar lo que indica cierto grado de mayor precisión además de ser mucho más económico por el costo del reactivo y su estabilidad y durabilidad en solución acuosa.

Esto también puede corroborarse en la Tabla 2 donde se muestran los valores de correlación ( $r^2$ ), notándose que en las pruebas del índigo carmín resultan superiores al del tetrazolio y al de germinación natural. Esto se corresponde con lo reportado por Moreno y colaboradores [7].

Tabla 1. Comparación de pruebas (germinación natural y colorimétricas), por municipio de procedencia.

Muestra de	Método	Réplicas (%)				Media (%)	Desv. Est	%CV
		1	2	3	4			
Control (+)	Germinación Natural	98	100	99	98	98,8	0,83	0,84
	Tetrazolio	85	88	72	87	83,0	6,44	7,76
	Índigo carmín	92	94	93	89	92,0	1,87	2,03
Apan	Germinación Natural	97	96	96	97	96,7	0,59	0,61
	Tetrazolio	81	86	87	86	85,1	2,38	2,80
	Índigo carmín	91	92	87	92	90,4	2,08	2,30
Almoloya	Germinación Natural	84	94	86	80	86,1	5,01	5,82
	Tetrazolio	81	80	81	71	78,1	4,08	5,23
	Índigo carmín	82	76	83	80	80,2	2,62	3,27
E. Zapata	Germinación Natural	84	74	77	77	78,1	3,61	4,63
	Tetrazolio	65	40	63	60	57,0	9,97	17,50
	Índigo carmín	77	71	70	72	72,5	2,69	3,71
Control (-)	Germinación Natural	35	24	28	24	27,8	4,49	16,19
	Tetrazolio	4	7	3	9	5,8	2,38	41,48
	Índigo carmín	26	36	29	30	30,3	3,63	12,00

Tabla 2. Regresión lineal (pruebas colorimétricas y germinación natural). Porcentaje de embriones viables. ( $p < 0.05$ ).

Índice	Apan			Almoloya			Emiliano Zapata		
	Germin. Natural	Índigo	Tetraz	Germin	Índigo	Tetraz	Germin	Índigo	Tetraz
$r^2$	0,8909	0,7529	0,7364	0,9308	0,9200	0,6792	0,833	0,8345	0,7643
p	0,014	0,032	0,038	0,008	0,005	0,072	0,016	0,016	0,032

Índice	Control (+)			Control (-)		
	Germin. Natural	Índigo	Tetraz	Germin	Índigo	Tetraz
$r^2$	0,8974	0,9143	0,7530	0,8477	0,9109	0,8936
p	0,011	0,006	0,033	0,015	0,004	0,062

También Bhering y colaboradores [3], trabajando con semillas de melón de agua (*Citrullus lanatus*) encontraron valores de  $r^2$  similares a los encontrados en el presente trabajo y evaluando igualmente la germinación natural y comparando con la prueba del tetrazolio.

Estos resultados permiten proponer la prueba del índigo carmín como predictor de la facultad germinativa en semillas de cebada maltera, lo cual no está reportado en la bibliografía consultada.

La diferencia entre ambos análisis colorimétricos puede estar referenciada por las partes de la semilla que tiñen cada uno. La mejor respuesta que se obtiene del índigo carmín puede deberse a la facilidad relativa para considerar los daños. En estas pruebas puede influir la subjetividad en la interpretación de los resultados, basada principalmente en la experiencia del evaluador, donde se puede suponer que es más difícil interpretar zonas de las semillas pobremente teñidas por el tetrazolio que las más intensa-

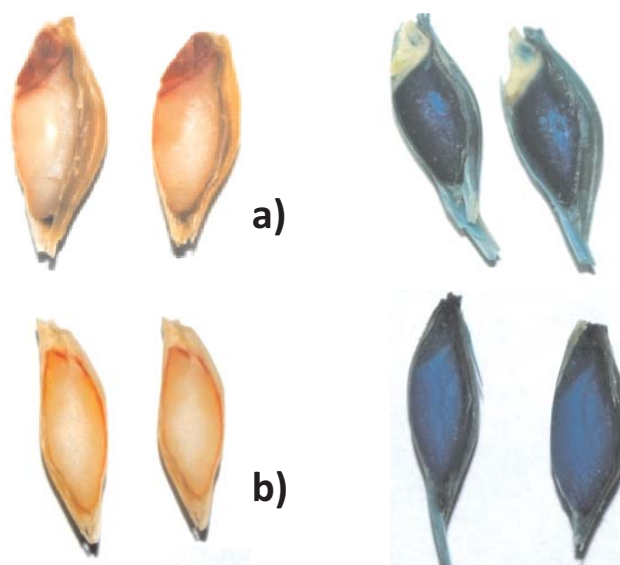
mente teñidas por el índigo carmín. También puede estar presente cierta falta de tonalidad y errores en la manipulación, siendo complicado interpretar la importancia de zonas que pueden ser básicas para el desarrollo del embrión y posterior germinación de la semillas. Esto ha sido discutido igualmente por Benito y colaboradores [6].

Esta duda es menos frecuente en el caso del índigo carmín. La tinción de las zonas muertas define claramente cómo se encuentra la semilla, y a pesar de que también pueden aparecer indefiniciones en el proceso de tinción, éstos ofrecen menos dudas en la interpretación ya que se considera que las zonas teñidas están claramente muertas.

En la Figura 1 se hacen notar los embriones viables (con poder germinativo) teñidos por tetrazolio y a diferencia de la coloración observable en la prueba del índigo carmín donde se tiñen las partes muertas. En la Figura 1 a) se aprecian los resultados en el control positivo y en la b) los del control negativo.

Los resultados de las pruebas germinativas se muestran en las Tablas 3 y 4. La Tabla 3 muestra los resultados de germinación según las pruebas del peróxido de hidrógeno y del ácido sulfúrico por municipio de procedencia y su comparación con la germinación natural.

De nuevo se observa que el método de germinación natural al término de 48 horas ofrece los mejores resultados, resultando que las semillas de Apan alcanzan un índice de alta calidad (94,4% de poder germinativo); las semillas de Almoloya (85,6%) clasifican dentro de norma y las de



**Figura 1.** Fotografías pruebas colorimétricas (índigo y tetrazolio). a) Control positivo; b) Control negativo.

Emiliano Zapata (64,5%), no llegan a cumplir con las especificaciones establecidas por Tomaso (2004) por lo cual se corrobora lo anteriormente señalado que estas últimas no podrían ser comercializadas para fines malteros.

Se puede resaltar que en efecto el control negativo resultó una semilla no viable en todas las pruebas mostrando como poder germinativo valores entre 5-30%, independiente de ser evaluados por métodos colorimétricos o germinativos.

Tabla 3. Comparación de pruebas (germinación natural y natural forzada), por municipio de procedencia.

Muestra de	Método	Réplicas (%)				Media (%)	Desv. Est	%CV
		1	2	3	4			
Control (+)	Germinación Natural	100	98	99	100	99,3	0,83	0,84
	Peróx. de hidrógeno	80	74	82	69	76,3	5,12	6,71
	Ácido sulfúrico	64	60	50	60	58,5	5,17	8,84
Apan	Germinación Natural	94	90	96	97	94,4	2,78	2,95
	Peróx. de hidrógeno	75	78	75	60	72,0	7,04	9,77
	Ácido sulfúrico	58	50	51	40	49,8	6,42	12,90
Almoloya	Germinación Natural	80	88	94	80	85,6	5,83	6,81
	Peróx. de hidrógeno	68	70	82	70	72,5	5,55	7,65
	Ácido sulfúrico	65	48	60	62	58,8	6,46	10,99
E. Zapata	Germinación Natural	79	57	62	60	64,5	8,56	13,27
	Peróx. de hidrógeno	76	69	68	70	70,8	3,11	4,40
	Ácido sulfúrico	62	45	57	60	56,0	6,60	11,78
Control (-)	Germinación Natural	30	40	36	28	33,5	4,77	14,24
	Peróx. de hidrógeno	28	10	25	20	20,8	6,83	32,93
	Ácido sulfúrico	4	3	7	7	5,3	1,79	34,01

Tabla 4. Regresión lineal en pruebas germinativas. Porcentaje de embriones viables ( $p < 0,05$ ).

Índice	Apan			Almoloya			Emiliano Zapata		
	Germin. Natural	Peróx	A. Sulf	Germin	Peróx	A. Sulf	Germin	Peróx	A. Sulf
$r^2$	0,9200	0,7364	0,8672	0,8333	0,7171	0,8423	0,7891	0,8065	0,8379
P	0,005	0,038	0,024	0,016	0,052	0,016	0,044	0,025	0,015

Índice	Control (+)			Control (-)		
	Germin. Natural	Peróx	A. Sulf	Germin	Peróx	A. Sulf
$r^2$	0,8909	0,8024	0,8243	0,7934	0,7627	0,8043
p	0,014	0,025	0,020	0,040	0,048	0,040

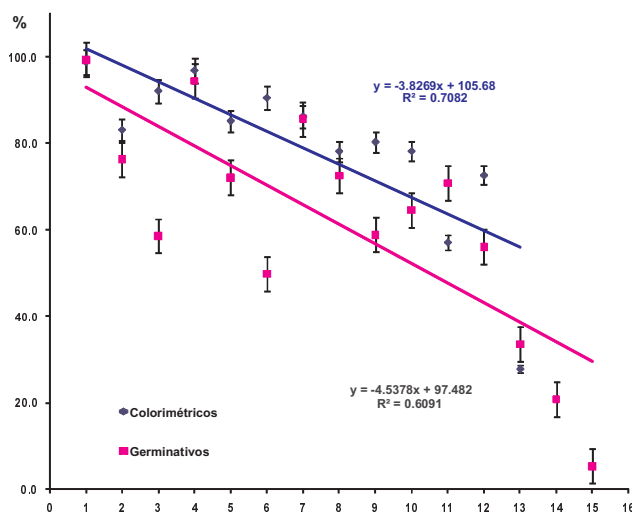
Los métodos germinativos por su lado también se comportaron como buenos predictores de la facultad germinativa de las semillas de cebada lo cual se corrobora en la Tabla 4 donde se aprecian los niveles de regresiones ( $r^2$ ), todos superiores a 0,70. No obstante se puede inferir que en este estudio se han encontrado mejores resultados con los métodos colorimétricos. Esto se puede analizar a partir de la Figura 2. Los métodos colorimétricos asociados al de germinación natural, ofrecen una mejor regresión ( $r^2 = 0,7082$ ) que los métodos germinativos ( $r^2 = 0,6091$ ) y menores dispersiones.

## Consideraciones finales

Se ha podido comparar que tanto los métodos de tinción colorimétricos como los propiamente germinativos, se comportan como buenos predictores de la facultad germinativa en semillas de cebada. Los métodos colorimétricos mostraron una mejor precisión y valores con mejores regresiones ( $r^2$ ); por su parte el método del índigo carmín, a pesar de no estar reportado en la normatividad, ofrece muy buenos resultados comparados con el método del tetrazolio que es el que se indica en la NMX-FF-043-SCFI-2003 lo cual lo hace una técnica sustituta mucho más económica y factible.

## Referencias

- [1] BARNETT, J.P. (1998). Desinfecting seeds with hydrogen peroxide. <http://www.sfnmc.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 3 pp.
- [2] BENITO, L.F.; HERRERO, N.; JIMÉNEZ, I.; PEÑUELAS, J.R. (2004). Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: test Del tetrazolio y el índigo carmín. **Cuad. Soc. Esp. Cien. For.** 17:23-28.



Leyenda del eje X: 1, 2, 3: Control (+); 4, 5, 6: Apan; 7, 8, 9: Almoloya; 10, 11, 12: E. Zapata; 13, 14, 15: Control (-)

Figura 2. Comparación entre las pruebas colorimétricas y germinativas.

- [3] BHERING, M.C.; FERNANDES DO SANTO, D.; BARROS, D.I. (2005). Adequação da metodologia do teste de tetrazolio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de sementes**, 27 (1):176-182.
- [4] CÁMARA INDUSTRIAL DE CERVECERIA ARGENTINA (2007). Norma de calidad para la comercialización de cebada cervecera. Disponible en [www.camaracervecera.com.ar](http://www.camaracervecera.com.ar). Accedido en abril del 2009.
- [5] FLORES, A.; ÁLVAREZ, J.G.; RODRÍGUEZ, J.L.; CORONA, A. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. **Foresta Veracruzana** 10(2):27-33.
- [6] ISTA. INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (2003). *Internacional Rules for Seed Testing*. Rules. Zurich, Switzerland.

- [7] MORENO ÁLVAREZ, M.T.; BENITO MATÍAS, L.F.; HERRERO SIERRA N.; DOMÍNGUEZ LERENA, S.; PEÑUELAS RUBIRA, J.L. (2001). **Actas del III Congreso Forestal Español**. Granada., Mesa 3: 653-658.
- [8] Norma Mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003. (2003). Productos alimenticios no industrializados para consumo humano -cereal- cebada maltera (*Hordeum vulgare* L. y *Hordeum distichum* L.). Especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el diario oficial el 18 de octubre del 2003.
- [9] OCHANDIO, D.; RODRÍGUEZ, J.; RADA, E.; CARDOSO, L.; BARTOSIK, R. (2010). Almacenamiento de cebada cervecera en bolsas plásticas herméticas. Pregón Agropecuario. Disponible en: <http://www.pregonagropecuario.com.ar/html.php>. 12(1): 6-14.
- [10] PERETTI, A. (1964). **Manual para análisis de semillas**. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur. 281 p.
- [11] PRATS ZAPIRAIN, M. (1944). **Orientaciones modernas en el ensayo de semillas forestales**. Ed: Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid, pp. 1-135.
- [12] PRYSTUPA, P.Y., LAVADO, R.S. (2001). Fertilización fosforada de cebada cervecera en la región pampeana. Disponible en [www.ipni.net](http://www.ipni.net). Accedido en abril del 2009.
- [13] ROBLEDO, A.; VILLALOBOS, V.M.; SANTACRUZ, A. (2009). Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. **Acta Botánica Mexicana**, 89:47-62.
- [14] SALINAS, A.R.; YOLDJIAN, A.M.; ROQUE, M.C.; BISSARO, V. (2001). Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 36, n. 2, p. 371-379.
- [15] SANABRIA, D.; SILVA, R.; OLIVEROS, M.A.; BARRIOS, R. (2001). Escarificación química y térmica de semillas subterráneas de *Centrosema rotundifolium*. **Bioagro** 13(3):117-124.
- [16] TOMASO, J.C. (2004). Cebada cervecera en la Argentina. **IDIA XXI**, v. 4(6) p. 210-216.
- [17] ZAMORA, D.M.; MÁRQUEZ, C.L.A.; RAMÍREZ, P.F.; IBÁÑEZ, C.A.M. (1997). Esmeralda, variedad de cebada maltera para los Valles Altos. SAGARPA-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigaciones de la Región Centro (CIRCE), Campo Experimental Valle de México (CEVA-MEX). Chapingo, Estado de México, México. p. 20 (Folleto Técnico Núm. 5).