

Oliverio, Romina Carla

*Efecto de la temperatura sobre la germinación
de Cynara Cardunculus (L.)*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Oliverio, R. C. 2014. Efecto de la temperatura sobre la germinación de Cynara Cardunculus (L.) [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:

<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-temperatura-sobre-germinacion.pdf> [Fecha de consulta:.....]



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

“Efecto de la temperatura sobre la germinación de *Cynara Cardunculus* (L.)”

Trabajo final de graduación para optar por el título de:

Ingeniero en Producción Agropecuaria

Autor: Romina Carla Oliverio

Profesor Tutor: Ing. Roberto Huarte

Fecha: 28 de Abril 2014

Índice

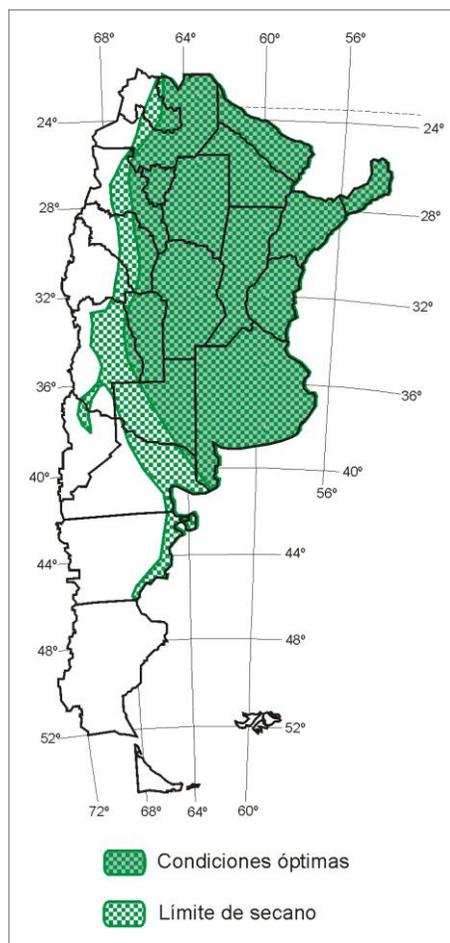
Introducción.....	pág. 4
Objetivo del proyecto.....	pág. 9
Materiales y Métodos	
• Descripción del experimento.....	pág. 9
• Análisis de datos.....	pág. 10
Resultados	
• Experimento	
- <i>Efecto de la Temperatura en germinación</i>	pág. 10
- <i>Determinación del Tiempo de germinación y Tasa</i> <i>de desarrollo</i>	pág. 13
- <i>Determinación de Temperatura base, óptima y</i> <i>Tiempo térmico</i>	pág. 14
Discusión.....	pág. 14
Conclusión.....	pág. 15
Bibliografía.....	pág. 16
Anexos.....	pág. 18

Resumen

Cynara cardunculus es un cultivo perenne herbácea conocida desde la antigüedad, comúnmente denominada en Argentina, “Cardo de Castilla”. Durante las últimas tres décadas este cardo intensamente se ha investigado y recientemente se convirtió en un cultivo comercial para la producción de biocombustibles. En la Argentina, está presente como maleza, por esto, hay una creciente necesidad de más información sobre este cultivo. Esto requiere un predictivo marco, basado en la identificación de los acontecimientos clave de desarrollo del cultivo, y una comprensión de cómo los factores genotípicos y ambientales interactúan para determinar el desarrollo de la planta. Por lo planteado resulta importante determinar cómo los factores del ambiente influyen en el cultivo de esta especie. En este sentido, uno de los puntos identificados como críticos para poder llevar a cabo su producción es la temperatura a la cual comienza la germinación de las plantas. El objetivo de esta tesis fue conocer las temperaturas cardinales de la etapa germinación-emergencia y determinar el tiempo térmico en que se cumple dicha etapa. Se utilizaron semillas de *Cynara cardunculus* y se realizaron ensayos en cámaras de incubación a diferentes temperaturas (10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30°C). Se obtuvo la temperatura base siendo 10,15°C. La temperatura optima fue de 20°C y la temperatura máxima fue de aproximadamente 30°C. El tiempo térmico fue de 1088°h (grados/hora) o 45,37°d (grados/día). Como conclusión este trabajo representa un aporte hacia la obtención de herramientas que puedan ser utilizadas para el control de dicha maleza, orientados hacia zonas consideradas templadas, como es el noroeste de Argentina.

Introducción

Las malezas constituyen una restricción muy importante sobre la producción en la mayor parte de los sistemas cultivados de todo el mundo. Ciertas especies son denominadas malezas cuando son no deseables en una determinada situación, ya sea productiva, paisajística o estética (Scursoni, 2009). Desde los orígenes de la agricultura, el hombre ha visualizado a las malezas como especies que por diferentes razones tales como competencia, contaminación o dificultades operativas, generaban pérdidas económicas para la explotación agropecuaria (Ghersa et al., 2000). Dentro de este grupo de especies, *Cynara cardunculus* (nv cardo de Castilla), es considerada una de las malezas más invasoras en la región pampeana de la República Argentina y está declarada como Plaga Nacional por la Ley de Sanidad Vegetal N° 5.770 (Falasca y Ulberich, 2007). Es conocida como una especie agresiva de pastizales de regiones semiáridas (Vibrans, 2009). Puede crecer en poblaciones densas, desplazando a la vegetación nativa e impedir el paso de animales (Weber, 2003). Como podemos observar en el mapa, las provincias más invadidas son Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y desde allí hacia el Norte, dependiendo las temperaturas máximas a las que llegue el suelo. (Mapa 1).



Mapa 1: Detalle condiciones óptimas de germinación de *Cynara cardunculus*. Falasca, S., y Ulberich, A. (2007).

C cardunculus L., es una especie originaria de la cuenca mediterránea europea perteneciente a la familia de las Asteráceas (Sonnante *et al.*, 2007). El clima Mediterráneo se caracteriza por veranos cálidos, secos y soleados, e inviernos suaves y húmedos. Las temperaturas medias anuales varían entre los 12 °C y los 18 °C, y la oscilación térmica anual está comprendida entre los 10° y los 15° por lo general. El promedio de precipitaciones se sitúa entre los 400 y los 700 mm, concentradas en el invierno. En Argentina su presencia es frecuente en pastizales naturales, banquinas y terraplenes (Marzocca, 1976). A diferencia de lo que sucede en Argentina, en los países mediterráneos de Europa, el interés por esta especie ha crecido en los últimos años, especialmente debido a su potencialidad para producir biocombustibles en ambientes marginales (Archontoulis *et al.*, 2010), pulpa para la obtención de papel (Fernández *et al.*, 2009; Archontoulis *et al.*, 2008; Angelini *et al.*, 2009), compuestos terapéuticos para la industria farmacéutica (Bianco, 1990) y fabricación de queso de oveja en la Península Ibérica (Figueredo *et al.*, 2006).

Es una planta herbácea perenne erecta de 1 a 1,6 m de altura (Imagen 1); tallo estriado; hojas basales sésiles, profundamente pinnatipartidas, con espinas rígidas en las puntas de los lóbulos secundarios (Imagen 2); cabezuelas solitarias o en grupos de 2 a 3, involucro ovoide-globoso, flores azules a moradas, (Imagen 3) estilos apenas bifurcados en el ápice; aquenios de 6 a 8 mm de largo y 3 a 4 mm de ancho, brillantes, con manchas cafés. (Garcia *et al.*, 1995) (Imagen 4).



Imagen 3: Vista general de una planta cultivada. Falasca, S., y Ulberich, A. (2007).



Imagen 1: Vista roseta de hojas *C. cardunculus*. Falasca, S., y Ulberich, A. (2007).



Imagen 2: Vista de una inflorescencia *C. cardunculus*. Plants for a future. (2012).



Imagen 3: Vista semilla *C. cardunculus*. Plants for a future. (2012).

Posee bajo contenido en calorías, contiene hierro, calcio y otros minerales. Las hojas secas contienen un jugo amargo, la cynarina, mucílagos, taninos, ácidos orgánicos y vitamina A. Todas estas sustancias son colagogas y tienen un efecto beneficioso contra las enfermedades de las vías biliares y hepáticas. Se emplean con éxito contra la ictericia, cuyos síntomas desaparecen más rápidamente. (Falasca y Ulberich, 2007). Su difusión como cultivo para consumo humano es muy escasa. *C. cardunculus* está estrechamente relacionado con el alcaucil, *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, y las dos especies se hibridan con frecuencia. (Marzocca 1976).

La infestación del cultivo con malezas proviene mayormente de la emergencia de plántulas desde el banco de semillas del suelo (Murdoch, 1998; Spitters, 1989) y, todas aquellas prácticas agronómicas tendientes a reducir el número de plántulas emergidas, o la muerte de estas luego de la emergencia, derivaran en una menor competencia con la especie cultivada y en una reducción progresiva del número de semillas presentes en el banco, de no mediar nuevos ingresos al mismo. Por lo tanto una mayor comprensión del comportamiento germinativo de las especies malezas puede contribuir al desarrollo de técnicas de manejo de malezas (Chauhan y Johnson, 2008). Sin embargo, hasta el presente, el manejo de las poblaciones de esta especie y otras especies se concentró en el estudio de los principios activos más eficaces. En *C. cardunculus*, el uso de herbicidas fenólicos y los herbicidas a base de Picloram son los que han producido los mejores resultados en plantas adultas. No obstante, *C. cardunculus* es susceptible al glifosato o dicamba y, para el control de plántulas en pastizales se utiliza MCPA. En campos con cultivos anuales, el laboreo convencional es útil en la reducción del número de plantas (Marzocca, 1976). Los objetivos de este

estudio fueron, por tanto, para determinar el efecto de diversos factores ambientales sobre la germinación de semillas de *Cynara cardunculus* (L).

La germinación corresponde a la entrada de la semilla en vida activa y al comienzo del crecimiento del embrión. Cuando las condiciones de humedad, temperatura y aireación son las adecuadas, la semilla germinará, dando origen, tras una serie de acontecimientos metabólicos, a una joven plántula. En tanto no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un periodo variable de tiempo, que puede ser muy largo, hasta que llegado un momento, pierde su capacidad de germinar. (Perez Garcia y Martinez, 1994). Sobre dichos datos analizados, Huarte y Benech en 2009, proponen que la fluctuación de temperatura finaliza la latencia en semillas de *Cynara cardunculus*, principalmente por la promoción de biosíntesis de giberelinas (GA) y una reducción en la sensibilidad al ácido abscísico (ABA), logrando finalizar la dormición.

Por todo esto, la temperatura es un factor decisivo en el proceso de germinación. Su efecto se debe a la capacidad para influir sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en las semillas tras su rehidratación. Así, del mismo modo que la actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperaturas, existiendo un óptimo intermedio, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. La temperatura mínima (T_{min}) sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima ($T_{máx.}$) aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso. La temperatura óptima (T_o), intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible. (Perez Garcia y Martinez, 1994). Sumado a estas, la temperatura base (T_b) de germinación sirve como punto de partida para mejorar la comprensión de su emergencia en el campo. La temperatura base (límite inferior a partir del cual se produce germinación) difiere entre especies y dentro de biotipos de una misma especie (Alcocer-Ruthling et al., 1992)

En el rango subóptimo (entre T_b y T_o) la germinación se puede caracterizar por un tiempo térmico (θT , ° C h) (Ec. 1) [es decir, la T (temperatura) que excede a la T_b , multiplicada por el tiempo (h) hasta llegar a un cierto porcentaje de germinación (TG)]. El modelo supone que este tiempo térmico es diferente para cada g de fracción. Por otro lado, se supone que T_b es la misma para toda la población de semillas. Este modelo predice que la tasa de germinación de semillas de una fracción o porcentaje determinado g (GR_g , o $1/tg$) es una función lineal de

T por encima de T_b , con una pendiente de $1/\theta T$ (g) y un intersección en el eje T de T_b . (Windauer et al., 2012)

$$\begin{aligned}\theta T \text{ (g)} &= (T - T_b) \text{ tg} && \text{Ec. 1} \\ \text{GRg} &= 1/\text{tg} = (T - T_b) / \theta T \text{ (g)}\end{aligned}$$

Objetivos del Proyecto:

- I) Caracterizar el comportamiento germinativo de semillas de *Cynara cardunculus*, “cardo de Castilla” expuestas a diferentes temperaturas de incubación.
- II) Obtener las temperaturas base y óptima usando el modelo térmico.
- III) Obtener el tiempo térmico de la fase de germinación.

Materiales y Métodos

Descripción de los experimentos

El experimento se realizó en el Laboratorio de Producción Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina. Se utilizaron semillas de *Cynara cardunculus* recolectadas en enero de 2011 provenientes del campo de la Universidad, en Verónica, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las cuáles estuvieron almacenadas durante un año a 5 °C.

Las semillas se colocaron en cajas de Petri, sobre dos discos de papel de filtro humedecido con 7 ml de agua destilada. Se utilizaron 20 semillas por caja de Petri y cuatro repeticiones por tratamiento. Las cuales se mantuvieron durante todo el experimento en incubadoras ajustadas a las siguientes temperaturas constantes (10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30°C). El conteo de semillas germinadas se realizó con una frecuencia diaria durante el transcurso de 21 días. Las semillas germinadas fueron retiradas desde las cajas de Petri, considerando como germinación cuando la semilla tenía la radícula visible mayor a 2mm. (Imagen 5). El porcentaje de germinación se calculó como una proporción del total de semillas germinadas sobre el número total incubado en cada tratamiento. A las 24 hs se realizó recambio de material y luego cada 6 días.



Imagen 5: Vista detallada radícula germinada en *C. cardunculus*. Ensayo de germinación en el Laboratorio Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UCA. (2012).

Análisis de los datos

Luego de obtener todos los datos de germinación de cada uno de los tratamientos se utilizó los software Prisma 5 y TableCurve 2D para la realización del análisis estadístico, para obtener las temperaturas cardinales y el tiempo térmico para la germinación de *Cynara cardunculus* (L.)

Resultados:

Efecto de la temperatura de incubación sobre *Cynara cardunculus* (L.)

El aumento progresivo de la temperatura acortó el tiempo de germinación de las semillas incubadas en agua hasta los 20°C (Figura 1), mientras que cuando las semillas fueron incubadas a 25°C hubo un incremento en el tiempo final de germinación. Las semillas sometidas a 20°C y 25 °C, iniciaron la germinación los primeros días de incubación, mientras que en los tratamientos a temperaturas extremas de 15°C y 30°C se observó un retraso de 6 días en el inicio de la misma. Sumado a que a 10°C se retraso la germinación 11 días.

Se puede observar, que la temperatura afectó la tasa de desarrollo y, como consecuencia de este efecto, la duración en el tiempo de germinación fue o resultó alterada. Por esto, frente a 25°C se observa una tasa de desarrollo mayor y se requerirán menos días para que trascorra la etapa de germinación. (Figura 1)

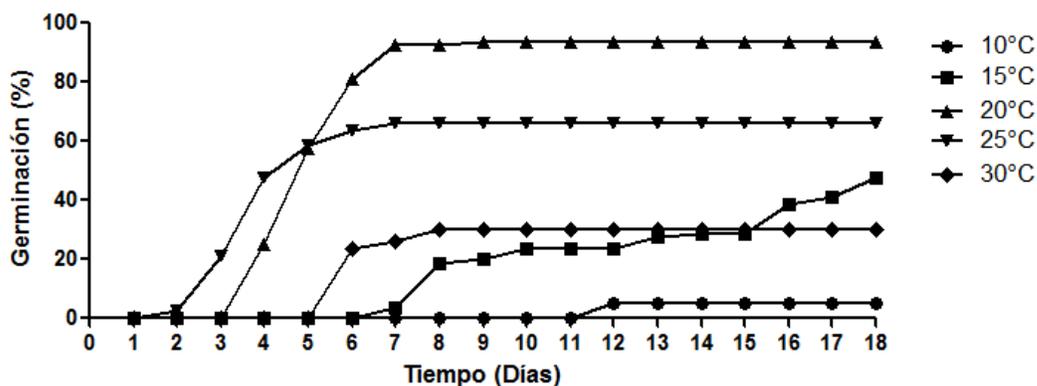


Figura 1: Porcentaje de Germinación en semillas de *Cynara cardunculus*, en función del tiempo a diferentes temperaturas.

El porcentaje máximo de germinación final fue del 95% y se logró cuando las semillas fueron incubadas a 20°C (Figura 2), mientras que a 10°C germinaron menos del 20%. Se puede observar un aumento marcado del porcentaje de germinación hasta los 20 °C y luego una disminución frente a las temperaturas de 25°C y 30°C, donde el porcentaje de germinación final llegó a 58% y 63% respectivamente.

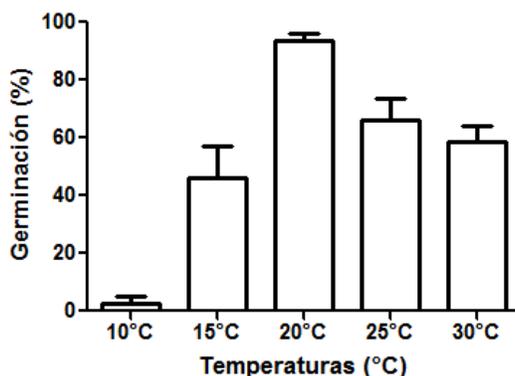


Figura 2: Porcentaje de Germinación de *Cynara cardunculus*, en función de las temperaturas incubadas durante 18 días.

Determinación del Tiempo de germinación

Para establecer el tiempo que tarda en germinar el 50% de las semillas en cada tratamiento térmico, se utilizó el *software TableCurve 2D*. El porcentaje de germinación no alcanzó el 50% frente a las temperaturas extremas como son a 10°C y 30°C, por lo tanto se decidió no tener en cuenta ambos valores para calcular el Tiempo de germinación.

Una vez establecido el tiempo de germinación del 50 % de las semillas, se determinó la tasa de germinación GR (50), que es la inversa de la duración en horas (Tabla 1).

<u>T °C</u>	<u>Tasa de Germinación(1/h)</u>	<u>Porcentaje final de Germinación (%)</u>
15°C	0.0028	43
20°C	0.0088	95
25°C	0.0103	58

Tabla 1: Tasa de germinación del 50% de la población (horas-1) y porcentaje final de germinación a distintas temperaturas de incubación para *Cynara cardunculus*.

Determinación de la Temperatura Base y Óptima

Se determinó la temperatura base de esta población de semillas (T_b) mediante el trazado de la relación lineal entre la tasa de germinación (GR (50), inversa de la duración en días y la temperatura. La intersección de ésta recta con el eje de abscisas es la T_b (Figura 3). La T_b calculada fue de 10,15°C y surge del despeje de la ecuación de la recta $y = -0,007567 \pm 0,0053x$.

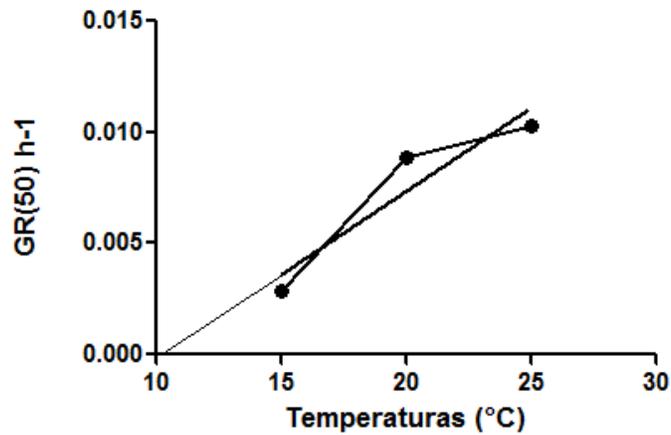


Figura 3: Tasa de germinación para el 50% de la población (horas-1) en función de la temperatura, en semillas de *Cynara cardunculus*.

La temperatura óptima (T_o) se determinó mediante el trazado de la relación lineal entre la tasa de germinación GR (50) y las temperaturas 20°C y 25°C, considerando un valor de 23°C (Figura 4).

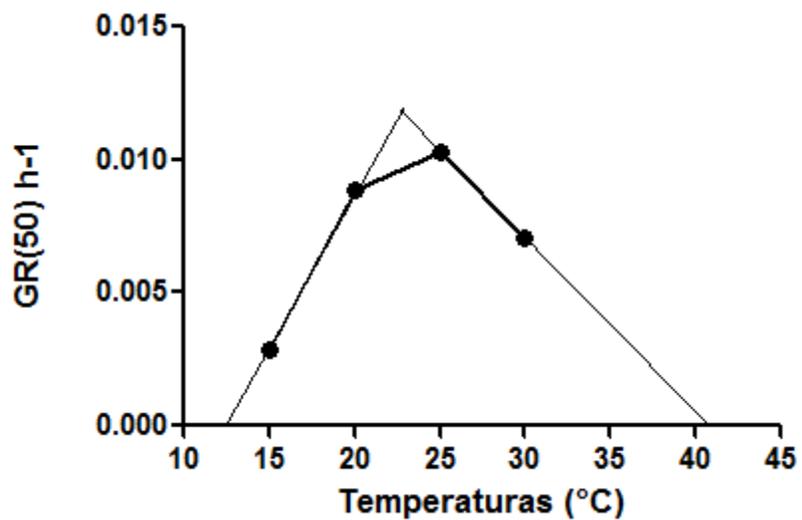


Figura 4: Temperatura óptima calculada para la tasa de germinación del 50% de la población (horas-1) en función de la temperatura en semillas de *Cynara cardunculus*.

Determinación del Tiempo Térmico

El tiempo térmico para la germinación de la especie se obtuvo mediante la inversa de la pendiente entre la tasa de desarrollo y la temperatura. Dando como resultado 1088°h (grados/hora) o 45,37°d (grados/día) para *Cynara cardunculus*.

Discusión:

Los objetivos de este estudio fueron, por tanto, para determinar el efecto de diversos factores ambientales sobre la germinación de semillas de *Cynara cardunculus* (L).

En la medida que la temperatura de incubación se incrementó por encima de 25°C, el porcentaje de semillas germinadas fue inferior. Los resultados obtenidos en esta tesis nos sugieren que *Cynara cardunculus*, se adapta mejor a climas cálidos, como los de su origen en el Mediterráneo. Ya que la temperatura base obtenida para *C. cardunculus* es levemente superior a los 10°C, se debe tener en cuenta que la temperatura base elevada, limita la germinación de semillas para que se desarrolle como maleza solo a aquellos lugares donde durante una parte del año la temperatura del suelo supere este valor.

Además, que la Tasa de desarrollo haya sido máxima a 20°C significa que cuando la temperatura del suelo se encuentre cercana a este valor las semillas presentarán la máxima velocidad de germinación. Así, a esta temperatura se necesitará menor cantidad de tiempo para que la germinación ocurra y en consecuencia la emergencia será más rápida. Cuando a las semillas de *C. cardunculus* se pusieron a germinar a 30°C, se notó una disminución en el porcentaje de semillas germinadas, aproximadamente 20% con respecto al tratamiento de 20°C. El análisis de tiempo térmico permitió obtener los valores de los parámetros de germinación que deben ser tenidos en cuenta cuando se elijan formas de atacar las malezas.

Conclusión:

Podemos concluir, que las óptimas condiciones de germinación de *Cynara cardunculus*, “cardo de Castilla”, se encuentran desde los 20°C a 25°C. Obteniendo como temperatura base 10,15°C, como a su vez, el tiempo térmico resultante fue de 1088°h (grados/hora) o 45,37°d (grados/día). Este trabajo representa un aporte hacia la obtención de herramientas que puedan ser utilizadas para el control efectivo de la maleza *Cynara cardunculus*, permitiendo realizar una amplia caracterización de la respuesta a la temperatura durante el proceso de germinación de las semillas especialmente orientados hacia zonas propicias a su germinación.

Bibliografía:

- Alcocer-Ruthling, M. Thill, D. y Shafll, B. (1992) Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Technology.
- Archontoulis S.V., Danalatos N.G., et al. (2008). Agronomy of *Cynara cardunculus* growing on an aquatic soil in central Greece. International Conference on Agricultural Engineering, Crete, Greece.
- Barceló Coll, J.; Rodrigo, G.; Sabater Garcia, B.; Sanchez Taméz, R.. (1988). Fisiología Vegetal Quinta Edición. Madrid, Editorial Pirámide.
- Bianco VV. (1990). Carciofo (*Cynara scolymus*). Orticoltura. pp. 209–251. Italia.
- Chauhan B.S. y Johnson D.E. (2008) Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence. Weed Sci. USA.
- Falasca, S., y Ulberich, A. (2007). “El agroclima del cardo *Cynara cardunculus* como cultivo energético en áreas semiáridas de Argentina”. En: Congreso ASADES y XV Reunión de la IASEE. San Luis, Revista AVERMA. (Avances en Energías Renovables y Medioambiente).
- Fernandez J., Pereira H., Gominhoa, J., (2009). Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus* capitula and their suitability for paper production. Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Botánica y Protección Vegetal. Madrid, España.
- Figueredo, G., Hulin, S., & Martin, B. (2008). Addition of pasture plant essential oil in milk: Influence on chemical and sensory properties of milk and cheese. Unité de Recherches sur les Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France.
- Garcia, L., E. y S. D. Koch. (1995). Compositae. Tribu Carduae. En: Rzedowski, G. C.. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 32. México. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío.
- Ghera, C. M.; E. H. Satorre; R. L. Benech Arnold and M. A. Martinez Ghera. (2000). Advances in Weed Management Strategies. Field Crops Res. 67: 95-104.

- Huarte R. y Benech-Arnold R. (2009). Hormonal nature of seed responses to fluctuating temperatures in *Cynara cardunculus* (L.) Cambridge University Press.
- Marzocca, A. (1976). Manual de malezas. Buenos Aires, Hemisferio Sur.
- Milthorpe F.L. y Moorby J. (1982). Introducción a la fisiología de los cultivos. Buenos Aires, Hemisferio Sur.
- Perez Garcia F. y Martinez J.B. (1994). Introducción a la fisiología vegetal. Madrid. Editorial Mundiprensa.
- Plants for a future. (2012). <http://www.pfaf.org/user/AboutUs.aspx>.
- Raven, P.; Evert, R.; Eichhorn, E.. (1992). Biología de las plantas, pág. 381. España, Editorial Reverté, S. A.
- Salisbury, F.. (1994). Fisiología Vegetal, pág. 639-661. México, Grupo Editorial Iberoamérica.
- Scursoni J. A. (2009). Malezas. Concepto, identificación y manejo en sistemas cultivados. Buenos Aires, Editorial Facultad Agronomía. UBA.
- Sivori, E. M.; Montaldi, E.R.; Caso, O.H. (1980). Fisiología vegetal, pág. 619. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur.
- Sonnante G, Pignone D, Hammer K. (2007). The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. Institute of Plant Genetics, Italy.
- Vibrans H. (2009) Especies invasoras de alto impacto. México, Editorial March Mifsut y Martínez Jiménez.
- Weber, E. (2003). Invasive plant species of the world: a reference guide to environmental weeds. Wellington, Gran Bretaña. CABI Publishing.
- Windauer L. B., Martinez J., Rapoport D., Wassner D. and Benech-Arnold R. (2012). Germination responses to temperature and water potential in *Jatropha curcas* seeds: a hydrotime model explains the difference between dormancy expression and dormancy induction at different incubation temperatures. *Annals of Botany*.

Anexos

Tablas de germinación diarias acumuladas de *Cynara cardunculus*

Incubadas a 10°C

Días\Repeticiones	1	2	3	4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	1	0	0
8	0	10	4	4
9	1	11	4	4
10	2	12	5	4
11	2	12	5	4
12	2	12	5	4
13	2	12	5	4
14	2	12	5	4
15	2	12	5	4
16	4	12	5	10
17	4	12	6	10
18	5	12	7	13

Incubadas a 15°C

Días\Repeticiones	1	2	3	4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	2	7	6	5
5	11	11	14	10
6	16	15	16	18
7	18	17	20	19
8	18	17	20	19
9	18	18	20	19
10	18	18	20	19
11	18	18	20	19
12	18	18	20	19
13	18	18	20	19
14	18	18	20	19
15	18	18	20	19
16	18	18	20	19
17	18	18	20	19
18	18	18	20	19

Incubadas a 20°C

Días\Repeticiones	1	2	3	4
1	0	0	0	0
2	2	0	0	0
3	5	4	4	4
4	9	11	12	6
5	9	13	12	13
6	9	14	14	14
7	9	14	15	15
8	9	14	15	15
9	9	14	15	15
10	9	14	15	15
11	9	14	15	15
12	9	14	15	15
13	9	14	15	15
14	9	14	15	15
15	9	14	15	15
16	9	14	15	15
17	9	14	15	15
18	9	14	15	15

Incubadas a 25°C

Días\Repeticiones	1	2	3	4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	6	4	0	9
7	6	4	0	11
8	7	4	0	13
9	7	4	0	13
10	7	4	0	13
11	7	4	0	13
12	7	4	0	13
13	7	4	0	13
14	7	4	0	13
15	7	4	0	13
16	7	4	0	13
17	7	4	0	13
18	7	4	0	13

Incubadas a 30°C

Días\Repeticiones	1	2	3	4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	2	4	0	2
4	6	6	0	8
5	6	9	0	8
6	9	11	0	9
7	9	13	0	10
8	9	14	0	10
9	9	14	0	11
10	9	14	0	11
11	9	14	0	11
12	9	14	0	11
13	9	14	0	11
14	9	14	0	11
15	9	14	0	11
16	9	14	0	11
17	9	14	0	11
18	9	14	0	11