

■ Diagnóstico por Tetrazolio en Semillas Severamente Afectadas por Daño Ambiental en Soja (*Glycine Max L. Merr*)

Palabras clave: soja, semilla, tetrazolio, daño ambiental

■ Introducción

Un alto grado de semillas de soja afectadas por el ambiente viene siendo reportado por investigaciones realizadas en Brasil y Estados Unidos desde los años 90 (1, 2, 3, 4). En Argentina, el fenómeno comenzó a ser percibido por Laboratorios de Análisis de Semillas que prestan servicios a productores y por investigaciones realizadas en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Facultades de Agronomía. De tal manera tuvo lugar una amplia tarea de divulgación de la problemática hasta nuestros días a fin de uniformar la descripción de los síntomas y elaborar diagnósticos que permitieran asegurar la toma de decisiones comerciales sobre los lotes de semilla producidos (5, 6, 7). La Prueba Topográfica por Tetrazolio fue la herramienta básica y necesaria para elaborar una serie de patrones que fuesen objetivamente descriptivos del problema ambiental y sus consecuencias sobre la calidad. Una parte importante del verdadero efecto del ambiente sobre la calidad de la semilla de soja se vio enmascarada por la confusión involuntaria derivada de la interpretación errónea de patrones de daños. Básicamente, la asignación por parte de los analistas de daños mecánicos que no se correspondían con el agente causal real, sirvió para demorar el reconocimiento del fenómeno. Esto hizo que se dilataran a su vez los estudios relativos al posible diferente grado de susceptibilidad varietal frente al factor ambiental. Hoy podemos reconocer, evaluar y poner en evidencia la naturaleza del problema (8). El objetivo del estudio fue el de describir algunos síntomas frecuentes provocados por el ambiente en simiente de soja y que es analizada en laboratorios mediante la técnica de tetrazolio, como la herramienta de diagnóstico más difundida para la cuantificación de daños específicos.

■ Materiales y Métodos

Se utilizó semilla del cultivar Tijereta 2049. Las semillas fueron previamente clasificadas por medio de zarandas de orificio circular y se empleó la fracción de semilla pura comprendida entre los 6,0mm y 6,5mm de diámetro. A su vez se separaron simultáneamente 3 fracciones de semillas diferentes en cuanto al aspecto físico de las mismas: arrugadas, abolladas y redondas (Foto 1). Todas las fracciones estaban compuestas por semillas de coloración normal, esto es semillas de color amarillo crema con exclusión de color verde y sus posibles tonalidades. Se emplearon 4 repeticiones de 25 semillas cada una. Las repeticiones fueron preacondicionadas en rollos de papel toalla (Germin - Plus, Unisfera, LTD, Bs. As. Argentina) conteniendo humedad a saturación, durante 16-18hs en cámara fría a 8° C +/- 0,5° C. Luego del preacondicionamiento se completó la imbibición de las semillas a fin de posibilitar que todas alcanzaran un grado semejante en tamaño. La incubación se realizó colocando cada repetición individual en recipientes de vidrio con tapa de 4,0cm x 7,0cm a los que se les agregó la solución de 2,3,5 cloruro de trifenil tetrazolio al 0,1% (pH = 7). Los recipientes fueron luego sumergidos en baño termostático (Modelo Masson, Vicking, Bs. As., Argentina) a una temperatura de 35° C durante 2,5 horas. Luego de ello se enjuagaron las repeticiones y se procedió a la evaluación de las semillas categorizándolas en cuatro niveles de viabilidad: Viables Sin Defectos, Viables Defectos Leves, Viables Defectos Severos y No Viables.

■ Resultados y Conclusiones

Tanto las semillas arrugadas como las abolladas presentaron una adecuada recomposición de la forma y tamaño de los cotiledones y eje embrionario luego del preacondicionamiento y/o con posterioridad al período adicional de imbibición (Foto 2 y 3). Ello determinó que durante las evaluaciones no se observaran las áreas deprimidas que estaban marcadamente presentes en las semillas antes de la incubación.

Las semillas redondas presentaron en promedio un 78% de viabilidad, correspondiendo a la sumatoria de los tres niveles de semillas viables (Tabla 1). El nivel más representativo correspondió al de las semillas Viables Sin Defectos con un 38% de semillas perfectamente saludables en cuanto a la ausencia completa de daños de diferente naturaleza. A la vez estas semillas poseían una adecuada uniformidad en la tinción de color rosado pálido, perfecta turgencia de los tejidos y completa anatomía morfológica. Un 27% en promedio de estas semillas presentaron defectos leves entre los que predominó mayormente el daño del ambiente en un 63% de las semillas incluidas en este nivel de viabilidad. Los defectos severos indicativos de un límite crítico de la condición de viabilidad se presentaron en un 13% de las semillas redondas y dentro de este nivel de Viables Defectos Severos el daño ambiental se presentó en un 65% de las semillas. Un 22% en promedio de las semillas redondas resultaron no viables y dentro de ellas un 89% presentaron daños debidos al ambiente. Como síntoma llamativo se observó un 37% de semillas redondas con presencia de áreas más o menos extensas y de color rojo intenso en el interior de los cotiledones. Normalmente el síntoma se halló presente en ambos cotiledones y podía adquirir la forma de una mancha única o bien de dos manchas separadas. Los bordes de esa área roja podían ser irregulares con características redondeadas o bien poseer forma de bandas alargadas y curvas. Las fracciones de semillas arrugadas y abolladas presentaron como era esperable valores bajos de semillas sin defectos, siendo estos de 9% y 13% respectivamente. Para estas dos clases de semillas los mayores porcentajes se presentaron en los niveles de Viables Defectos Leves y No Viables con valores de 43% y 28% para la fracción arrugadas y 41% y 32% para la fracción abolladas. Por otra parte el deterioro ambiental para los niveles representativos de daños alcanzó valores comprendidos entre 86% y 100% de las semillas clasificadas dentro de cada nivel. Tanto la fracción de semillas arrugadas como las abolladas manifestaron la presencia de áreas rojas de diferente tamaño y forma en la parte interna de los cotiledones (Foto 4). Este síntoma se registró en un 39% y 63% de las semillas arrugadas y abolladas respectivamente.

Estas áreas indican un deterioro que podría tener dos orígenes diferentes. Uno de ellos estaría relacionado y estrechamente ligado a una manifestación externa del daño ambiental sobre la semilla y que experimentaría un progreso hacia el interior del cotiledón. Esto podría estar avalado por el hecho que mayoritariamente ambos cotiledones manifestaron el síntoma. En este sentido nuestra hipótesis se orienta a indicar que solamente el daño de naturaleza ambiental es el único capaz de provocar un patrón generalizado sobre el lote de semillas. El otro posible origen sigue siendo el mismo daño del ambiente pero con la variante de no poseer una manifestación externa sobre los cotiledones sino que el deterioro de los tejidos internos de los cotiledones podría producirse en una etapa más temprana del crecimiento de los mismos. Esto causaría la coexistencia en una misma semilla de tejidos más saludables con otros que expresarían un deterioro cronológico a través de una mayor actividad respiratoria.

Al mismo tiempo se observaron semillas con manifestación de un "mosaico" de colores más o menos asociado a la mayor adherencia de los tegumentos sobre los cotiledones que experimentarían las semillas arrugadas y abolladas y que retrasarían el ingreso y reducción del tetrazolio en el período de incubación utilizado en el estudio. Las semillas redondas no experimentaron el fenómeno de mosaico.

Las 3 fracciones de semillas estudiadas, redondas, arrugadas y abolladas sufrieron el deterioro ambiental y ello determinó un importante impacto en la viabilidad. Las deferentes respuestas y/o expresiones de las semillas ante la ocurrencia de los fenómenos ambientales durante su activo crecimiento estaría influenciada por características varietales (9, 10, 11). Ello nos lleva a intensificar los esfuerzos relativos al diagnóstico preventivo de aquellas líneas con comportamientos muy disímiles ante un ambiente de producción con fluctuaciones severas en los factores de crecimiento que definen calidad de semillas.

Tabla 1: Porcentaje de semillas de las diferentes fracciones para cada nivel de viabilidad

	Redondas		Arrugadas		Abolladas	
	Promedio %	Daño ambiental	Promedio %	Daño ambiental	Promedio %	Daño ambiental
V. SD	* 38 A	-	9 B	-	13 B	-
V. DL	27 A	63a	43 A	94a	41 A	86a
V.DS	13 A	65a	20 A	100a	14 A	100a
N.V.	22 A	89a	28 A	94a	32 A	88a

* Valores en la línea seguidos de una misma letra mayúscula o minúscula no difieren entre sí, Duncan ($\alpha = 0,05$)



Foto 1: Semillas arrugadas (a) y abolladas (b)



Foto 2: Grado de imbibición alcanzado por semillas arrugadas



Foto 3: Grado de imbibición alcanzado por semillas abolladas



Foto 4: Daño ambiental con síntomas en área interna de coletidones

■ Agradecimientos

A la Asociación de Agricultores Federados Argentinos, Cooperativa AFA Maciel, por la provisión de las muestras para el estudio. A los auxiliares y analistas del Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros que contribuyeron a la realización del ensayo.

■ Bibliografía

1- Dornbos, Jr. D.L.; Mullen, R.E.; Shibles, R.M. 1989. **Drought Stress Effects During Seed Fill on Soybean Seed Germination and Vigor.** Crop Sci. 29, p. 476-480.

2- França Neto, J de B.; Krzyzanowski, F.C. 1990. **Sementes enrugadas: Novo problema da Soja.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA. Comunicado Técnico Nº 46 p.1-4. ISSN 0100-6606.

3- França Neto, J:B.; Krzyzanowski, F.C.; Henning, A.A.; West, S.H.; Miranda, L.C. 1993. **Soybean seed quality as affected by shrivelling due to heat and drought stresses during seed filling.** Seed Sci. & Technol. 21 P. 107-116

4- Gibson, L.R.; Mullen, R.E. 1996. **Soybean Seed Quality Reductions by High Day and Night Temperature.** Seed Physiology, Production & Technology. Crop Sci. 36 p. 1615-1619.

5- Craviotto, R.M. 1997. **Alerta por Problemas de Calidad de las Semillas.** Campo y Tecnología. Año VI. Nº 34. ISSN 0327-7011.

6- Craviotto, R.M. 2002. **El ambiente y su manifestación en la producción de semilla de soja.** Seed news. Año VI – Nº3, p.22-23. ISSN 1415-0387.

7- Craviotto, R.M.; Arango, M.R.; Montero, M.S. 2002. **Calidad de soja. Guía visual de problemas de calidad en semillas y granos de soja.** World Grain. Suplemento Latinoamericano. P. 6-8.

8- Arango, M.R.; Salinas, A.R.; Craviotto, R.M.; Ferrari, S.A.; Bisaro, V.; Montero, M.S. (2004) Description of the environmental damage on soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.). Seed Science and Technology, Vol. 33, Nº3.

9- Honeycutt, R.J.; Burton, J.W.; Palmer, R.G.; Shoemaker, R.C. 1989. **Association of Major Seed Components With a Shriveled-Seed Trait in Soybean.** Crop Sci. 29, p. 804-809.

10- Honeycutt, R.J.; Burton, J.W.; Shoemaker, R.C.; Palmer, R.G. 1989. **Expression and Inheritance of a Shriveled - Seed Mutant in Soybean.** Crop Sci. 29, P. 704-707.

11- Hanson, W.D.; Burton, J.W. 1994. **Control for Rate of Seed Development and Seed Yield Potential in Soybean.** Crop Sci. 34 p.131-134.

Autores:

R. M. Craviotto^{1*}; M. R. Arango Perearnau¹; C. Gallo¹; A.R. Salinas²

¹ INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros. Ruta Nacional 11 KM 353. Oliveros. Te. (03476)498010.

² Facultad de Ciencias Agrarias. UNR, Zavalla, Santa Fe Te. 0341-4970080/85.

rcraviotto@arnet.com.ar*, marango@correo.inta.gov.ar, cgallo@correo.inta.gov.ar, arsalinas@gmail.com.ar