

■ Diagnóstico por Tetrázolío en Semillas de Soja Verde Abolladas y Arrugadas

Palabras clave: soja, semillas verdes, abolladas, análisis, tetrázolío

■ Introducción

La problemática ambiental en la producción de soja ha afectado en los últimos años tanto a los granos destinados a la industria como a la semilla. La ocurrencia de síntomas sobre la simiente ha sido claramente relacionada con condiciones de severo estrés provocado por altas temperaturas (superiores a 30° C) en situaciones de déficit hídrico prolongado. La incidencia de ambos factores del ambiente ha sido hasta la fecha ampliamente documentada por investigadores de diferentes países (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Al mismo tiempo, en Argentina se detectó y alertó acerca del problema sobre la base de los diagnósticos realizados a nivel de laboratorios de semillas que trabajan en la técnica topográfica por tetrázolío (8, 9, 10, 11, 12).

Desde el punto de vista de la semilla a emplearse como simiente la problemática adquiere relevancia por dos aspectos que pueden ser considerados hasta cierto punto independientes. Por un lado la permanencia del color verde en la semilla como consecuencia de la falta de descomposición de la clorofila contenida en los tejidos y por otra parte la ocurrencia del daño ambiental. Este último, manifestado a través de lesiones reconocidas como tradicionales del ambiente de producción y otras mucho más severas y del mismo origen, a las que se las definió como "daño ambiental no tradicional" (13). En conjunto hoy nos encontramos con semillas de soja que poseen las características de ser verdes y estar arrugadas o abolladas y que de no ser completamente separadas del resto del lote, ingresarán al comercio de semillas y deberían cumplir con el proceso de germinación y emergencia una vez sembradas en el lote de producción.

El objetivo del estudio fue el de elaborar un diagnóstico de viabilidad acerca del verdadero estado físico y fisiológico de las semillas de soja verdes, arrugadas, abolladas y estimar su comportamiento potencial en términos de germinación en condiciones de la prueba estándar utilizada en el comercio de semillas.

■ Materiales y Métodos

Se emplearon en el estudio semillas del cultivar Don Mario 4200. Las semillas del lote fueron previamente clasificadas con zarandas de orificio circular. Se utilizó la fracción de semillas que atravesaron una zaranda de 6,5mm de diámetro y que quedaron retenidas sobre una zaranda de 6,0mm de diámetro. Dentro de este conjunto se utilizó una fracción de semilla pura de soja que tenía la característica de estar arrugada y otra fracción abollada.

La fracción arrugada presentaba a la vista del analista las arrugas típicas del daño ambiental en tegumentos, con la correspondiente marca sobre los cotiledones de la semilla seca (Foto 1). Estas marcas llegaban a ser severas en el área dorsal de la semilla opuesta al hilo aunque no provocaban deformación ni llegaban a invadir el área central de cotiledones. La

fracción de semillas abolladas también podía presentar arrugas de diferente intensidad pero la diferencia principal con las arrugadas radicaba en la presencia de depresiones en superficie de cotiledones y deformación de la semilla (Foto 2). La deformación física provocaba una pérdida de la esfericidad característica de la semilla de soja en la fracción de semillas abolladas a diferencia de las arrugadas en las que la forma esférica todavía era la predominante.

Para la Prueba Topográfica por Tetrazolio se utilizó una solución al 0,1% de 2, 3, 5 cloruro de trifeníl tetrazolio (pH = 7). Se utilizaron 4 repeticiones de 25 semillas para las fracciones arrugadas y abolladas respectivamente. Cada repetición fue preacondicionada en rollos de 2 hojas de papel toalla Germin-Plus (Unisfera, LTD, Buenos Aires, Argentina) de 15cm x 30cm humedecidas a saturación. Las repeticiones fueron dispuestas en bolsas de polietileno de 100 micrones y conservadas en heladera a 8,5 +/- 1° C durante 16-18hs. Luego de ello se completó la imbibición de cada repetición durante 1 hora para alcanzar un tamaño uniforme de las semillas. El proceso de incubación en tetrazolio se realizó en recipientes individuales de vidrio de 4,5cm x 7,0cm con tapa a los que se sumergió 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 en cuatro Niveles de Viabilidad: Viables Sin Defectos, Viables Defectos Leves, Viables Defectos Severos y No Viables.

Se condujo paralelamente un ensayo topográfico por tetrazolio en semilla de arveja (*Pisum sativum*) bajo las mismas condiciones experimentales que las empleadas para semillas de soja (Foto 3). Ello tuvo por objetivo analizar la evolución de la tinción en una especie que posee un alto contenido de clorofila en la semilla fisiológicamente madura y realizar una evaluación comparativa con las fracciones de semilla verde de soja.

Se realizó además una prueba de germinación de 4 repeticiones de 25 semillas con ambas fracciones. Se empleó sustrato arena a un 70% de su capacidad de retención de agua (capacidad de retención de arena = 25%). Se utilizó una temperatura de germinación constante de 25°C con recuento final de plántulas a 7 días. Se evaluaron Plántulas Normales, Anormales, Semillas Muertas y se realizó descripción de los síntomas sobre las plántulas obtenidas.

■ Resultados y Conclusiones

Luego de 1 hora de iniciada la incubación se observó la aparición de coloración rosado intenso en las repeticiones de las fracciones de semillas arrugadas, abolladas y de arveja. En todas las repeticiones de semillas arrugadas hubo un fuerte predominio del daño ambiental. Si bien esto era de esperar puesto que la intención original de seleccionar semillas arrugadas implicaba obligadamente una presencia masiva de tal daño, no se observó presencia de daño mecánico ni de chinche. Esto nos llevó a postular la independencia de estos 3 factores de deterioro de la semilla y que pueden llegar a combinarse únicamente por causas aleatorias tales como acciones de cosecha inadecuadas y/o deficiente control de chinche en el lote de producción. Se observó un importante porcentaje de semillas cuyas estructuras presentaron grandes áreas de color verde (Foto 4). Las áreas verdes que no lograron alcanzar la tinción característica del tetrazolio se presentaron en un 36%, 28%, 36% y 24% de las semillas de las 4 repeticiones respectivamente. Este hecho demuestra una evidente incapacidad de los sistemas enzimáticos respiratorios encargados de reducir el tetrazolio a **formazan** como producto final del proceso de tinción. Esta imposibilidad de generar tinción bien podría estar directamente relacionada con la inmadurez fisiológica de los tejidos involucrados más que a una posible interferencia en la expresión de color. Esta postulación estaría apoyada por las observaciones experimentales realizadas en el presente estudio en arveja. En este caso se produjo una tinción homogénea de cotiledones y embrión que culminó con la obtención de una coloración rojo o rojo oscuro. Esto nos estaría indicando una falta completa de interferencia de la clorofila en la reducción del tetrazolio y este hecho revelaría una condición de madurez fisiológica de la semilla de arveja aún con un elevado contenido de clorofila en sus tejidos. Al mismo tiempo sería un indicador valioso que nos permite poner en dudas el verdadero estado fisiológico de las estructuras y tejidos de soja que permanecieron verdes al final del ensayo de tetrazolio.

La presencia de áreas muertas de color blanco con tonalidad crema se registró en un 32%, 60%, 52% y 60% de las semillas de las repeticiones evaluadas. Este hecho incidió en el elevado porcentaje de semillas presentes en el nivel de Viables Defectos Severos y con mayor peso en el nivel de No Viables. Los valores de este último nivel llegaron a significar un 48%, 56%, 52% y 56% de las semillas de las repeticiones analizadas. Por otra parte, dentro de esta fracción de semillas arrugadas se registraron porcentajes de semillas sin

ninguna área verde ni blanca indicadora de tejidos muertos. Estos valores fueron de 16%, 8%, 8% y 16% para las repeticiones I a IV respectivamente. La coloración alcanzada por tetrazolio podría ser definida como normal dentro de las variables de concentración de la droga, tiempo y temperatura empleados en el estudio. Se observó además semillas que a pesar de no poseer áreas muertas blancas ni verdes fueron clasificadas como No Viabiles por presentar ejes embrionarios con intensa coloración rojo oscuro.

Las semillas abolladas presentaron al igual que las arrugadas, un fuerte predominio del daño ambiental en todas las repeticiones evaluadas y para los 4 niveles de viabilidad considerados. El valor de daño ambiental más elevado correspondió al nivel de No Viabiles con un 64% en promedio de semillas afectadas. Se registró asimismo la presencia de daño de chinche que alcanzó un valor máximo de 10% en promedio de las repeticiones. La ocurrencia de semillas con grandes áreas que permanecieron verdes luego de la incubación fue de 36% en promedio de las repeticiones. La presencia de áreas que permanecieron muertas de color blanco con diferente extensión y profundidad fue de un 40% en promedio.

La prueba de germinación de la fracción de semillas verdes arrugadas registró un 28% de Plántulas Normales en promedio de las 4 repeticiones. Las Plántulas Anormales representaron un 26% en promedio de las plántulas producidas. Se observó un 46% de Semillas Muertas.

Un 20% de las plántulas presentó recomposición de los cotiledones en términos de tamaño y volumen. Las características más relevantes estuvieron representadas por plántulas con hipocótilos delgados (plántula débil), cotiledones necrosados y con áreas podridas, raíces primarias atrofiadas y las típicas marcas (garras) de daño ambiental sobre los cotiledones. La prueba de germinación de la fracción de semillas verdes abolladas registró igualmente un 28% y 26% de Plántulas Normales y Anormales respectivamente. También en esta fracción se observó una recomposición en volumen y tamaño de los cotiledones de algunas plántulas. A los síntomas observados en la fracción de semillas arrugadas se agregó para el caso de las abolladas la aparición de áreas de mosaico alternando áreas amarillas con verdes, ambas de buena turgencia de tejidos.

La magnitud del daño ambiental observado sobre las semillas puso en evidencia la enorme influencia de este fenómeno sobre la calidad de la simiente de soja y nos lleva a extremar las operaciones de clasificación necesarias y conducentes a descartar ambas fracciones del circuito comercial.



Foto 1: Fracción de semillas arrugadas



Foto 2: Fracción de semillas abolladas



Foto 3: Tinción por tetrazolio en arveja. Color rojo intenso uniforme.



Foto 4: Tinción por tetrazolio en soja. Falta de tinción en grandes áreas

a: semillas de arveja secas
b: con tegumento
c: sin tegumento

con presencia de color verde

■ **Agradecimientos**

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- Egli, D.B. 1990. **Seed Water Relations and the Regulation of the Duration of Seed Growth in Soybean.** Journal of Experimental Botany, Vol. 41, Nº 223, p.243-248.
- 3- Egli, D.B.; TeKrony, D.M.; Heitholt, J.J.; Rupe, J. Mayo, 2005. **Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor.** Seed Physiology, Production & Technology. Crop Sci 45 p. 1329-1335
- 4- França Neto, J de B.; Krzyzanowski, F.C. 1990. **Sementes enrugadas: Novo problema da Soja.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria EMBRAPA. Comunicado Técnico Nº 46 p.1-4. ISSN 0100-6606.
- 5- 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
- 6- Gontijo Mandarino, J. M. 2005. **Coloração esverdeada nos grãos de soja e seus derivados.** Embrapa. Londrina PR. Comunicado Técnico Nº 77, p. 3. ISSN 1517-1752
- 7- 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.
- 8- Craviotto, R.M. 1997. **Alerta por Problemas de Calidad de las Semillas.** Campo y Tecnología. Año VI. Nº 34. ISSN 0327-7011.
- 9- 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.
- 10- Craviotto, R.M. 1996. **Arrugue de Semillas.** Super Campo. Año II, Nº 23.
- 11- Craviotto, R.M.; Arango, M. 2001. **Calidad de semilla 2001 odisea de la soja.** APOSGRAN. Año XV. Nº 73, Vol. 2, p.10-13.
- 12- 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.
- 13- 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.

Autores:

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

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. 0341-4970080/85rcraviotto@arnet.com.ar^{*}, arsalinas@gmail.com.ar , marango@correo.inta.gov.ar , cgallo@correo.inta.gov.ar

EEA INTA Manfredi. Ruta Nac. 9, km. 636. Manfredi, Córdoba. TE: (03572) 493039