

CAPÍTULO I

1. Introducción.

El uso de la semilla de arveja de alta calidad, asociado a buenas prácticas de siembra asegura el establecimiento de una población de plantas vigorosas con un potencial de alto desempeño agronómico y en cantidades adecuadas, constituyendo la base para el éxito del cultivo y contribuyendo a alcanzar las máximas productividades.

En nuestro departamento de Tarija el uso de semillas de baja calidad origina plantas débiles, de bajo desempeño agronómico, lo que compromete la obtención de una población adecuada de plantas influyendo directamente en la productividad del cultivo.

Es por esto que en Tarija es necesario obtener semillas de buena calidad para mejorar la producción y obtener un análisis rápido de semillas, por esta razón que hoy en día se puede optar por la prueba de tetrazolio.

La prueba de tetrazolio fue desarrollada para proporcionar un correcto análisis de calidad de las semillas, permitiendo identificar las causas de descarte de sus lotes debido a la baja germinación en la prueba de laboratorio y planteando posibles soluciones para los problemas encontrados.

La Prueba Topográfica por Tetrazolio es una prueba bioquímica que permite estimar de forma rápida y eficiente la viabilidad de las semillas y, además, facilita la identificación de factores que afectan la calidad de las semillas, como daños mecánicos, daños por chinches y daños causados por el ambiente de producción, brindando datos útiles para diagnosticar las posibles causas de pérdida de calidad de las semillas.

Las pruebas de evaluación de calidad fisiológica de semillas que demandan un período de tiempo relativamente corto son aquellos relacionados con las actividades enzimáticas y respiratorias de las semillas (Bhéring, 2006).

En la Prueba Topográfica por Tetrazolio se pone especial atención en todas las partes de cada semilla, particularmente en las características internas del embrión (Hampton y Tekrony, 2005).

La evaluación de la calidad de las semillas a través de la Prueba Topográfica por Tetrazolio se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifenil Tetrazolio. En presencia de la solución de la sal de tetrazolio, se expresa la actividad de las enzimas respiratorias deshidrogenadas en los tejidos vivos de las semillas.

Estas enzimas catalizan la reacción de los iones H^+ liberados por la respiración de los tejidos vivos con la sal de tetrazolio, formando una sustancia estable, no difusible, de coloración rosada – rojiza, denominada trifeníl formazan que permite distinguir en las semillas a las áreas vivas (áreas de color rojo) de las áreas muertas que no poseen coloración.

Las evaluaciones de vigor pueden hacerse en base a la identificación, localización, y observación de los tejidos de la semilla (Hampton y Tekrony, 2005).

1.1. Justificación.

El presente trabajo va dirigido especialmente a la industria de semillas ya que requiere métodos de análisis rápidos; para determinar la viabilidad de las semillas lo cual indica la capacidad potencial de germinación, es en este aspecto el método ideal.

La prueba de tetrazolio posiblemente haya sido uno de los más grandes descubrimientos en análisis de semillas en la última centuria, y aún es poco aprovechado (SEED news, 2015).

La prueba de tetrazolio puede ser utilizado sin importar el grado de dormición de las semillas, tornándose muy importante para especies con este problema.

La prueba de tetrazolio constituye una herramienta de gran utilidad para productores de semilla, clasificadores y comerciantes ya que puede ayudar en decisiones que deben ser tomadas rápidamente.

Durante los meses de verano, inmediatamente a la cosecha, muchas semillas de gramíneas forrajeras y leguminosas poseen un alto nivel de dormición; y para completar un ensayo de poder germinativo se necesitan alrededor de cuatro semanas para romper dicha dormición y que se logre la germinación.

En contraste, La prueba de tetrazolio puede ser completada en uno o dos días, creando así la posibilidad de tomar decisiones sobre la base de este ensayo (SEED news, 2015).

El presente trabajo se lo realiza con la finalidad de conocer una prueba rápida como es la prueba de tetrazolio para determinar las concentraciones adecuadas para realizar o determinar la viabilidad en semillas de arveja.

Este trabajo se lo realizara en laboratorio de semillas y así determinar el porcentaje de viabilidad en lotes de semillas de arveja.

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

- Evaluar el efecto de tres concentraciones de sal de tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) en el laboratorio de semillas de INIAF-Tarija.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Establecer el protocolo y procedimiento a seguir para realizar la prueba de tetrazolio en la determinación de la viabilidad de las semillas de arveja.
- Determinar la concentración de la solución de sal de tetrazolio más adecuada para realizar la prueba.
- Establecer o determinar la tinción que adopta el tejido vivo y muerto de la semilla de arveja.
- Determinar si existe asociación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación directa.

1.3. Hipótesis.

La viabilidad por medio de la prueba de tetrazolio para las semillas de arveja tiene la misma confiabilidad, reduciendo el tiempo con relación a la obtenida en germinación directa.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.

2.1. Origen de la Arveja.

La arveja es una de las plantas cultivadas más antiguas, encontrándose referencias escritas de haber sido ya utilizada por pueblos neolíticos del Cercano Oriente, 7.000 a 6.000 años a.C.

Su cultivo se expandió a regiones templadas y zonas altas de los trópicos de todo el mundo, siendo hoy ampliamente cultivada y consumida, ya sea como hortaliza fresca o como semilla seca, en casi todos los países, siendo Estados Unidos, India, Rusia, Francia y Gran Bretaña, los mayores productores de arveja verde del mundo (Joice, 2009)

La arveja como planta cultivada se origina probablemente en Etiopía de donde se difundió a la región mediterránea y de ahí al Asia a las zonas templadas de todo el mundo. A América fue traída por los españoles (Joice, 2009).

La arveja es una planta leguminosa ampliamente cultivada en el mundo, tanto por su valor nutricional como por sus distintas formas de consumo y por utilizarse como un cultivo de rotación. Siendo un cultivo de clima frío posee una amplia adaptación a diversos climas y es importante en los hábitos de consumo en América del Sur.

Está considerada como una de las principales hortalizas y está ampliamente distribuida, desde el nivel del mar hasta los 3500 m.s.n.m.

Uno de los factores limitantes para la siembra de arveja en la costa es la alta temperatura, mientras que en la sierra es la disponibilidad de agua en época seca y las heladas (Riojas, 2006).

2.1.1. Clasificación taxonómica.

Según Peña M (2009) la clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Fabaceae

Género: Pisum

Especie: *P. sativum*

Nombre binominal: *Pisum sativum* L.

2.1.2. Descripción morfológica.

Pertenece a la familia de las Leguminosas; su nombre botánico es *Pisum sativum*. Es planta anual herbácea (Agro, 2011).

Los tallos son trepadores y angulosos; respecto al desarrollo vegetativo existen unas variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado, dando lugar a tres tipos de variedades: enanas, de medio enrame y de enrame. Las hojas tienen pares de folíolos y terminan en zarcillos, que tienen la propiedad de asirse a los tutores que encuentran en su crecimiento (Agro, 2011).

2.2. La semilla de la arveja.

La semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después

de la fertilización. Se encuentra en las plantas con flores (angiospermas) y en las gimnospermas. En las angiospermas los óvulos se desarrollan dentro de un ovario; en tanto que en las gimnospermas la estructura que los contiene es muy diferente, pues no constituye una verdadera flor; sin embargo, la estructura de las semillas de estas plantas es básicamente similar a la de las plantas con flores (España, 2007).

Para entender la ontogenia de la semilla, es decir, su formación y desarrollo, se requiere cierto conocimiento de la estructura de las flores y de los órganos reproductivos masculinos y femeninos. En términos generales, las flores consisten de varias capas de hojas modificadas que constituyen, de afuera hacia adentro, los sépalos, los pétalos, los estambres y el ovario.

Hay grandes variaciones entre especies en la forma, tamaño y disposición de estas estructuras. Hay también plantas que producen flores con sexos separados, ya sea masculinas con estambres o femeninas con ovarios.

Los estambres producen granos de polen que contienen los gametos masculinos, y el ovario contiene los óvulos que producirán a las semillas. Los óvulos de las plantas superiores son estructuras pluricelulares, relativamente complejas. En su interior, el óvulo contiene al saco embrionario y éste a su vez contiene varias células haploides, no claramente delimitadas, cuyo número varía entre los diferentes grupos taxonómicos (España, 2007).

2.3. Las semillas.

El término semilla se usa generalmente con un sentido funcional y significa unidad de reproducción. La semilla consiste en un pequeño embrión viviente que es alimentado y almacenado en el endospermo con sus respectivas cubiertas protectoras. Al germinar la semilla, el embrión utiliza reservas almacenadas para obtener energía hasta el momento en que sus hojas comiencen a producir carbohidratos mediante la

fotosíntesis. El embrión tiene uno o dos cotiledones que serán las primeras hojas de una nueva planta (Moreno, 2004).

Las semillas maduras están generalmente formadas por una cubierta protectora con dos capas: la cubierta externa que tiene diferentes formas (testa) y la interna como de papel (el tegumento). Dentro de la semilla estará la planta potencial (embrión), formada por el ovulo fertilizado (Moreno, 2004).

En algunas especies de angiospermas el embrión puede ser pequeño y estar rodeado por un tejido nutritivo (endosperma), o puede que haya endosperma y en tal caso el embrión llena toda la semilla.

En la semilla de las gimnospermas, el tejido nutritivo no se llama endosperma, sino que recibe el nombre de gametofito femenino, ya que el origen del tejido es diferente al endosperma de las angiospermas (Moreno, 2004).

2.4. Anatomía y fisiología de la semilla.

2.4.1. La testa.

Los rudimentos de las angiospermas presentan uno a dos tegumentos; sin embargo, en la mayoría de las semillas, gran parte del tejido tegumentario se destruye y es absorbido por otros tejidos seminales. La cubierta o testa protege al embrión contra muchos factores como desecación, daños mecánicos y pudriciones causadas por hongos (Martínez, 2008).

2.4.2. El endosperma.

El tejido endospermático de una semilla en desarrollo puede ser constituido por células de paredes finas con grandes vacuolas que no contienen sustancias de

reservas; un endosperma así será parcial o totalmente absorbida por el embrión que crece, ya que este contiene carbohidratos, lípidos y proteínas, que al ser metabolizados proveen energía para diferentes procesos en la semilla (Martínez, 2008).

2.4.3. Embrión y plántula.

El embrión es la parte funcional de la semilla que origina una nueva planta y para que este fenómeno ocurra, el embrión debe estar completo. Con la germinación de la semilla, la testa se rompe junto al extremo micropilar de la radícula emerge, el embrión comienza a crecer en forma acelerada, dando origen a lo que se denomina una plántula (Martínez, 2008).

El embrión como tal consiste de los cotiledones (hojas), que pueden ser uno, dos o más dependiendo de la división o clase de planta, los cotiledones están unidos a un tallo corto que tiene dos partes: por arriba de los cotiledones se encuentra el epicotilo que termina en la plúmula o punto de crecimiento de las futuras hojas, y por debajo de los cotiledones, el hipocotilo que termina en la radícula (raíz potencial).

En las semillas sin endosperma, los cotiledones son grandes y carnosos. Todas las partes son por lo general de color blanco o crema, aunque algunos cotiledones son verduzcos (Martínez, 2008).

2.5. Tamaño de las semillas.

El tamaño de las semillas entre diferentes especies de plantas varía en una forma impresionante, a pesar de que se trata de un órgano vegetal cuyo origen ontogenético es constante y que tiene una función bien definida. Hay aproximadamente 11 órdenes de magnitud de diferencia en tamaño entre las semillas más pequeñas y las más grandes que existen en la naturaleza (Trujillo, 2005).

Las semillas de una orquídea pueden pesar 0.1 mg, en tanto que la palma de coco doble del Pacífico produce semillas de 10 kg de peso. En una comunidad natural el rango de variación es menor pero es aún muy amplio; por ejemplo, en la selva tropical, éste es de aproximadamente seis órdenes de magnitud (Trujillo, 2005).

Las semillas grandes se producen en menor número y frecuentemente se diseminan a distancias más cortas, pero cuentan con mayor cantidad de recursos para iniciar su crecimiento y establecimiento en lugares con escasez de recursos, por ejemplo en la sombra de los bosques, ya que producen plántulas más grandes y resistentes, con mayor superficie de raíces y de hojas.

2.6. Producción de las semillas.

2.6.1. Fenología.

Las plantas presentan frecuencias de floración y de subsecuente fructificación que van desde la producción continua de frutos a lo largo del año, como ocurre en algunos pioneros, a la producción sincrónica de frutos dentro de una generación de plantas a intervalos de más de un siglo, como ocurre en algunas especies de bambú.

Entre estos extremos existen varios patrones de producción de semillas. Uno muy frecuente es la fructificación anual de duración relativamente fija; sin embargo, el tamaño de la cosecha de semillas de la población de una especie, o de ésta, entre plantas individuales, puede variar (Vázquez, 2007).

Las especies de plantas compiten entre ellas para atraer polinizadores de flores y dispersores de semillas, por lo cual han desarrollado comportamientos que minimizan la sobre posición fenológica con otras plantas que dependen del mismo vector animal en cada comunidad vegetal.

El periodo de fructificación cambia entre diferentes localidades, incluso dentro de una misma región. Esta variabilidad se debe a variaciones en la disponibilidad de recursos para la reproducción o a los ciclos endógenos que diferencian distintos niveles de esfuerzo reproductivo entre años (Vázquez, 2007).

2.6.2. Cosecha de semillas.

La fotosíntesis genera compuestos orgánicos que son invertidos en gasto respiratorio, crecimiento, reposición de partes, tejidos y órganos, y finalmente en la reproducción, por lo que la cantidad de semillas producidas por cada planta individual, en proporción a su biomasa total y al rendimiento fotosintético anual, es muy variable entre especies y poblaciones.

Las plantas anuales colocan gran parte de su productividad fotosintética anual en biomasa reproductiva porque tienen una sola oportunidad en la vida de dejar descendientes, pero la mayoría de las plantas leñosas producen propágulos muchas veces durante su vida, por lo que esta producción se logra normalmente utilizando una menor proporción de la productividad fotosintética anual (Ortega, 2006).

2.7. Germinación de las semillas.

2.7.1. Características generales de la germinación de semillas.

La germinación en términos generales constituye los eventos que inician con la toma de agua por parte de la semilla y termina con la elongación de la radícula. Durante estas etapas ocurren varios eventos como hidratación de proteínas, cambios estructurales, cambios celulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Angelovici y colaboradores, 2010).

Durante el proceso de germinación se presentan las siguientes fases: La primera fase hace referencia a la imbibición, proceso esencial para el ingreso de agua a las

semillas. El agua es absorbida a través de las aberturas naturales de la cubierta y difundida hacia el tejido interno. Es el primer paso para el inicio del crecimiento del embrión y es un proceso que rompe períodos de dormancia y quiescencia (Bewley, 2007).

En la segunda fase, el potencial hídrico de la semilla se equilibra con el del medio. Después de un tiempo el ingreso de agua se hace más lento hasta que se vuelve nulo. Durante este momento se mantienen activos los sistemas enzimáticos y los procesos metabólicos como la respiración y la síntesis de proteínas. Durante la tercera fase ocurre la elongación de la radícula, turgencia celular y debilitamiento de tejidos externos (Bewley, 2007).

2.7.2. Factores que influyen en la germinación de las semillas.

La germinación es afectada tanto por factores internos como externos:

En el caso de los factores internos se conoce que la viabilidad del embrión es uno de los factores indispensables para la germinación, ya que si el embrión no es viable es claro que la semilla nunca germinará. Este factor indica si una semilla está metabólicamente activa o no.

La viabilidad se determina mediante la prueba topográfica por Tetrazolio (sal cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio); que utiliza la actividad de las enzimas deshidrogenasas como un índice de la tasa respiratoria y la viabilidad de las semillas (Ortega, 2006).

Otro factor que define la calidad fisiológica e incide en la germinación de las semillas, es el contenido de humedad, a medida que las semillas estén más maduras el contenido de humedad será inferior, la semillas tendrán un máximo de peso seco y su potencial osmótico será muy negativo, garantizando el ingreso de agua por osmosis para la reactivación del metabolismo (Hodson, 2008).

El último factor a mencionar es el vigor de la semilla, este parámetro se define como la sumatoria total de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de germinación. Es un factor clave para establecer las semillas en un ambiente determinado, dependiendo del alto o bajo vigor germinativo. Para la medición de este factor se emplea un conductímetro, el cual permite estimar la cantidad de osmolitos que se encuentran en el medio causados por la lixiviación de las membranas de la semilla, por lo tanto los valores altos de conductividad eléctrica señalarán semillas de baja calidad. En el caso de los factores externos, la humedad del medio es uno de los factores indispensables para la germinación, si la humedad no es la apropiada para la especie, la semilla no germina ya que no se inicia el proceso de reactivación del metabolismo (Hodson, 2008).

2.8. Viabilidad de las semillas.

Es la fracción de semillas que están vivas en las que se dan los procesos metabólicos, aunque en forma lenta. Algunas veces la viabilidad se emplea como sinónimo de vigor para indicar la habilidad del embrión para germinar y continuar el desarrollo.

2.8.1. Germinación.

La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente:

a) La absorción de agua por imbibición, causando su hinchamiento y la ruptura final de la testa.

b) el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del embrión.

c) el crecimiento y la división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula. En la mayoría de las semillas el agua penetra inicialmente por el micrópilo y la primera manifestación de la germinación exitosa es la emergencia de la radícula.

2.8.2. Latencia.

Una vez que la semilla ha completado su desarrollo se inician los cambios que darán lugar al establecimiento del reposo en las semillas. Este reposo o reducción del metabolismo se denomina quiescencia cuando la causa de que no ocurra la germinación es fundamentalmente la falta de agua, como es el caso de las semillas almacenadas en condiciones artificiales, por ejemplo un frasco con frijoles en la alacena o las semillas que permanecen en los frutos unidos a la planta madre por largo tiempo (Trujillo, 2005).

En cambio, el reposo de las semillas se denomina latencia cuando la semilla no germina a pesar de encontrarse en un lugar óptimo en cuanto a la temperatura y la humedad. Las causas por las que no germinan pueden deberse a la existencia de un periodo cronológicamente regulado de interrupción del crecimiento y de disminución del metabolismo durante el ciclo vital.

En las plantas superiores puede existir latencia o interrupción del crecimiento en el tejido meristemático, por ejemplo en las yemas de crecimiento de las ramas, así como en las semillas (Trujillo, 2005).

2.8.3. Dormancia.

Estado fisiológico en el que una semilla dispuesta para germinar no lo hace, aun en la presencia de condiciones ambientales favorable.

En ocasiones los factores que intervienen en la germinación no son los adecuados para la reactivación del metabolismo de las semillas causando el estado de dormancia, un estado en el cual el desarrollo de la semilla se encuentra detenido por factores estructurales y fisiológicos. Esta fase se reconoce por fallas temporales en la capacidad germinativa de semillas sembradas en condiciones adecuadas (en cuanto a luz, temperatura, agua, oxígeno y humedad) para su germinación (Trujillo, 2005).

2.9. La Prueba Topográfica por Tetrazolio.

2.9.1 Historia de la prueba de tetrazolio.

“El éxito del desarrollo del test de tetrazolio es resultado de la conquista de varias etapas en la historia de la investigación en tecnología de semillas y de la obtención de nuevos conocimientos sobre la vida de la semilla.” (Moore, 2005). Revisiones más detalladas sobre la historia del test de tetrazolio han sido publicadas por Lakon (2003) y colaboradores.

Una síntesis de los principales hechos que contribuyeron para su desarrollo se detalla a continuación.

El desarrollo de métodos de análisis rápidos, con el propósito de determinar la calidad fisiológica de las semillas, ha sido uno de los principales objetivos de los tecnólogos de semillas durante varios años, principalmente a partir del final del siglo pasado, cuando el sistema de producción de semilla comenzó a ser organizado en diversos países de Europa.

Con el objetivo de realizar una evaluación rápida de la viabilidad de las semillas diversos métodos de análisis, basados en la observación de la coloración, en el aspecto, en el peso volumétrico y en la velocidad de imbibición de la semilla fueron utilizados inicialmente, no obstante, sin ninguna precisión.

A inicios de la década de 1920, la determinación de la actividad de ciertas enzimas, como peroxidases, catalasas, oxidasas, reductasas y fenolasas, recibieron especial atención, sin embargo, la falta de éxito de tales métodos se debió al hecho de que la actividad enzimática no se determinaba en forma individualizada. En esa misma época, diversos colorantes, tales como o carmín índigo, azul de metileno, rojo neutro y verde de malaquita, fueron ensayados.

La falta de precisión resultó en el fracaso de la adopción de tales métodos. Como fue mencionado por Moore (2009), las primeras tentativas con éxito en la evaluación de la viabilidad de las semillas con bio-colorantes fueron realizadas por Turina, en Yugoslavia, en 1922, y por Neljubow, en Rusia, en 1925. Turina trabajó con la reducción de sales de telurio y de selenio en las células de las semillas y Neljubow mencionó algunos casos exitosos con la utilización del carmín índigo.

A inicio de los años 30, Hasegawa, en Japón, trabajando con semillas arbóreas, perfeccionó la aplicación de las sales de telurio y de selenio para la coloración de embriones de semillas. Gran parte de sus trabajos fueron publicados en japonés, tornando sus avances inaccesibles para la comunidad científica. Algunos de sus estudios fueron ampliamente divulgados después de la publicación de algunos de sus resultados en inglés (Hasegawa, 1935) y alemán, después de una reunión de la ISTA (Asociación Internacional de Análisis de Semillas) en Europa.

El griego, Georg Lakon, trabajando en Hohenheim, Alemania, desde inicio de la década del 20 se dedicaba, con gran interés, a realizar trabajos en el área de fisiología de semillas. Él perfeccionó el método del selenio, desarrollado por Hasegawa y Eidmann, culminando con el desarrollo del método topográfico del selenio para la determinación de la viabilidad de semillas (Lakon, 2000).

Cuando tomó conocimientos de los efectos tóxicos del selenio para los analistas de semillas, Lakon buscó una sal similar, pero no tóxica, que podría ser utilizada con la

misma finalidad. Con esta orientación Lakon ensayó varias formas de estas sales y concluyó que el 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio era el más apropiado para el ensayo topográfico. Lakon desarrolló métodos para semillas de varias especies de cereales y también para maíz.

Moore (1976), mencionó la existencia y los méritos del test de tetrazolio, que se realizó por primera vez en los Estados Unidos en 1945, mediante investigaciones realizadas por el ejército norteamericano, después de la II Guerra Mundial, sobre actividades que habían permanecido veladas por el régimen, en Alemania, hasta entonces.

El primer trabajo realizado con el test en los Estados Unidos fue publicado por Porter (1947), de la Universidad Estatal de Iowa. Otros estudios pioneros, realizados en ese mismo país, según Moore (2006), fueron publicados por Flemion y Poole, del Instituto Boyce Thompson de Nueva York; por Goodsell, de la compañía de semillas de maíz Pioneer, de Johnston, Iowa; y por Bennett, de la Universidad Estatal de Iowa. Avances significativos sobre el test ocurrieron en los años 50.

Varios investigadores alcanzaron resultados básicos importantes. Entre éstos, se destacan Isely, Bass, Smith y Throneberry, de la Universidad Estatal de Iowa, y Parker, de la Universidad de Idaho.

En la década del 60, progresos significativos relativos a la aplicación práctica del test, fueron obtenidas por Delouche, Still, Raspet y Leinhard, de la Universidad Estatal de Misisipi, los que publicaron el primer manual sobre el método. Este manual abordaba la metodología para un gran número de especies.

Jensen, Pierpoint, Hayes y Grabe, del Laboratorio de Semillas de la Universidad Estatal de Oregon y Copeland, Bruce y Midyette, de Virginia, también contribuyeron para mejorar el test.

En 1970, debe ser destacado otro marco importante. La utilización del test fue aceptada por la AOSA (Asociación Oficial de los Analistas de Semillas), a través de la publicación del Manual del Test de Tetrazolio (Grabe, 1970). En 1983, la AOSA publicó el Manual de Ensayos de Vigor (AOSA, 2001), que abordaba la metodología del ensayo para soja, algodón, maíz y trigo.

Un reconocimiento especial debe ser dado al Dr. Robert P. Moore del Laboratorio de Semillas de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Entre 1943 y 1987, Moore publicó 230 trabajos sobre el método y editó el Manual del Test de Tetrazolio (Moore, 2005), publicado por la ISTA. Tal publicación contiene detalles sobre los métodos utilizados en el test para más de 650 especies.

El test de tetrazolio fue también adoptado con éxito en diversos países. En Brasil, el método fue introducido por diversos profesionales, que recibieron entrenamientos en la Universidad Estatal de Misisipi. El método fue mejorado para la soja por los investigadores del Centro Nacional de Investigaciones en Soja de la Embrapa, que publicaron tres manuales específicos para soja.

Hoy, el ensayo es rutinario en todos los laboratorios de análisis de semillas que trabajan con soja, en Brasil.

2.9.2. La prueba de tetrazolio.

Es una prueba bioquímica que permite estimar de forma rápida y eficiente la viabilidad de las semillas y, además, facilita la identificación de factores que afectan la calidad de las semillas, como daños mecánicos, daños por chinches y daños causados por el ambiente de producción, brindando datos útiles para diagnosticar las posibles causas de pérdida de calidad de las semillas (Bhéring, 2006).

Las pruebas de evaluación de calidad fisiológica de semillas que demandan un período de tiempo relativamente corto son aquellos relacionados con las actividades enzimáticas y respiratorias de las semillas.

El uso del Tetrazolio para la prueba de vigor es una extensión de los estudios de los patrones de tinción desarrollados originalmente por (Lakon 1950), quién describió a esta prueba como un test de vigor para cereales en general y posteriormente fue presentada para semillas de trigo por Perry (1987).

Dichos patrones de tinción fueron luego desarrollados en Europa por Steiner y Werth, (1974) y en Estados Unidos por Moore, (1976) y posteriormente, esta prueba fue usada para un amplio rango de especies incluyendo soja, maíz, algodón, pino y tréboles (AOSA, 2007).

En la Prueba Topográfica por Tetrazolio se pone especial atención en todas las partes de cada semilla, particularmente en las características internas del embrión (Hampton y Tekrony, 2005).

La evaluación de la calidad de las semillas a través de la Prueba Topográfica por Tetrazolio se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifenil Tetrazolio. En presencia de la solución de la sal de tetrazolio, se expresa la actividad de las enzimas respiratorias deshidrogenadas en los tejidos vivos de las semillas.

Estas enzimas catalizan la reacción de los iones H^+ liberados por la respiración de los tejidos vivos con la sal de tetrazolio, formando una sustancia estable, no difusible, de coloración rosada – rojiza, denominada trifeníl formazan que permite distinguir en las semillas a las áreas vivas (áreas de color rojo) de las áreas muertas que no poseen coloración.

Las evaluaciones de vigor pueden hacerse en base a la identificación, localización, y observación de los tejidos de la semilla (Hampton y Tekrony, 2005).

Entre los métodos empleados durante el proceso de control de calidad contamos con las siguientes pruebas:

- **Primer conteo** (conocida como **Energía Germinativa**).
- **Conteo Final** (conocida como **Poder Germinativo**).
- **Prueba Topográfica por Tetrazolio (TZ)**, utilizada fundamentalmente para determinar la **Viabilidad**.

La prueba de viabilidad nos revela una serie de aspectos esenciales para conocer no solamente la calidad del lote, sino que también puede servir de guía para identificar otros factores que pueden estar afectando a las semillas; entre ellos la *dormición*, que suele ser la causa de una menor germinación, pero que no debe confundirse con mala calidad.

2.9.3. Principios del test de tetrazolio.

El test de tetrazolio se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (AOSA, 2001), las cuales catalizan las reacciones respiratorias en las mitocondrias, durante la glicólisis y el ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente las deshidrogenasas del ácido málico, reducen la sal de tetrazolio (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio o TCT) en los tejidos vivos.

Cuando la semilla de la soja es inmersa en la solución incolora de tetrazolio, esta se difunde a través de los tejidos, produciéndose en las células vivas la reacción de

reducción que da como resultado la formación de un compuesto rojo, estable y que no se difunde, conocido por trifenilformazán.

Cuando el TCT se reduce, formando el trifenilformazán, indica que existe actividad respiratoria en las mitocondrias, esto significa que hay viabilidad celular y del tejido. El color resultante de la reacción es un indicador positivo de la viabilidad a través de la detección de la respiración a nivel celular. Tejidos no viables no reaccionan y consecuentemente no se tiñen.

Cuando el tejido es vigoroso, se formará el color rojo carmín claro; si el tejido está en proceso de deterioro, un rojo más intenso será formado, en virtud de la mayor intensidad de difusión de la solución de tetrazolio por las membranas celulares comprometidas de tales tejidos.

Si el mismo no es viable, la reducción de la sal no ocurrirá, y el tejido muerto contrastará, blanco (no teñido) con el tejido teñido, viable.

La observación de tales diferencias de color, juntamente con el conocimiento de diversas características de las semillas, permiten la determinación de la presencia, localización y naturaleza de los disturbios que pueden ocurrir en los tejidos embrionarios (Moore, 2003).

2.9.4. Ventajas del método.

- Rápida determinación de la viabilidad del lote de semillas, importante para la toma de decisiones rápidas en la industria de semillas.
- Adecuada evaluación de la capacidad germinativa potencial, especialmente para lotes con elevada cantidad de semillas dormidas.

- Útil para estudiar la biología de las semillas y procesos de deterioro (Vankus, 2007).

2.9.5. Desventajas del método.

- La interpretación visual de la tinción es subjetiva y requiere experiencia, especialmente en semillas pequeñas (Howarth y Stanwood, 2003). Esta necesidad de entrenamiento y experiencia, posiblemente haya sido la razón por la cual se lo ha utilizado poco en el pasado.
- Labor intensiva que implica al tener que cortar y evaluar las semillas.
- Puede no detectar daños menores, presencia de infección fúngica o daños por insecticidas (Vankus, 2007).

2.9.6. El tetrazolio es una prueba bioquímica.

En los embriones de las semillas, diferencia los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración).

Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio -2,3,5- trifenil tetrazolio en incoloro- a formazán - color rojo.

El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear.

La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración.

Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente (ISTA, 2007).

2.9.7. Procedimiento de análisis.

2.9.7.1. Hidratación.

Las semillas deben embeberse para iniciar la actividad de las enzimas deshidrogenasas; además así se ablandan los tejidos, y es más fácil cortarlos.

2.9.7.2. Corte o pinchazo.

Permite el contacto del TZ con los tejidos del embrión. En algunas especies, por ejemplo alfalfa, el corte no es necesario, y el TZ es adicionado a la semilla intacta.

2.9.7.3. Tinción.

Las semillas se sumergen en la solución de TZ al 0,5 o 1% (a veces es necesario un buffer para balancear el pH) por un cierto período de tiempo, que puede oscilar de 2 a 18 h depende las especies. Durante este tiempo, los tejidos vivos se tiñen, mientras que los muertos no.

2.9.7.4. Evaluación.

En base al patrón de tinción e intensidad. El analista debe estar familiarizado con la anatomía de la semilla de la especie que está evaluando (ISTA, 2007).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Localización y Ubicación.

El presente estudio se realizó en el laboratorio de las semillas del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF) localizada en Cercado-Tarija.

3.2. Materiales.

3.2.1. Material Vegetal.

- Semillas de Arveja.

3.2.2. Material de Laboratorio.

- Sal de Tetrazolio (cloruro de 2,3,5 trifenil)
- Vasos de precipitado pequeños
- Toallas de Papel
- Bolsa de polietileno
- Estufa
- Agua destilada
- Cajas de Petri
- Bisturí
- Lupa
- Pinzas
- Agua
- balanza de precisión.
- probetas.

3.2.3. Material de Escritorio y de Apoyo.

- Libreta de Apuntes
- Cámara Fotográfica
- Computadora
- Impresora

3.3. Metodología.

El presente trabajo se desarrolló en diferentes etapas, las cuales nos permitieron ir paso a paso para obtener los mejores resultados.

Se tomaron 3 lotes de semillas de arveja de 2016 de la misma variedad, Las semillas utilizadas fueron previamente germinadas entre papel, obteniendo porcentajes de germinación y a cada una se realizó la prueba de tetrazolio con 3 diferentes concentraciones de la sal de tetrazolio:

- Al 0.075 %
- Al 0.1 %
- Al 0.5 %

Estas concentraciones fueron basadas en concentraciones utilizadas en semillas de soja, se realizó 2 repeticiones de cada concentración en los 3 lotes de semillas de arveja, haciendo un total de 6 repeticiones por concentración y en total se obtuvo 18 muestras con 3 concentraciones de solución de sal de tetrazolio.

3.3.1. Preparación de la solución de tetrazolio.

Para la preparación de la solución al 0,075% se utilizó primeramente 1gr de sal de tetrazolio diluida en 100 ml de agua destilada, de cual se sacó 75 ml de la solución

preparada, diluyendo esta en 925 ml de agua destilada obteniendo así la solución necesaria al 0,075 %.

Para la preparación de la solución al 0,1% se utilizó 1gr de sal de tetrazolio diluida en 1000 ml de agua destilada.

Para la preparación de la solución al 0,5 % se utilizó 1 gr de sal diluida en 200 ml de agua destilada.

El agua utilizada en la preparación de la solución de trabajo puede ser destilada o de la red de abastecimiento, mientras tenga su pH entre 6 y 7, o no sea salobre.

3.3.2. Preparación de las semillas.

Muestreo / Número de Semillas

Para el desarrollo del trabajo se utilizó 2 repeticiones de 50 semillas en 3 lotes diferentes.

3.3.3. Acondicionamiento.

Las semillas fueron embaladas en papel de germinación humedecido y mantenidas en estas condiciones por un período de 16 horas, a 25°C.

Para evitar la pérdida de humedad, los embalajes permanecieron en cámaras húmedas, también se puede utilizar bolsas plásticas, en germinador.

El tegumento oscuro de las semillas, generalmente, no permite la difusión de la solución de tetrazolio. Por lo tanto, debe ser retirado de las semillas antes del proceso de tinción.

3.3.4. Coloración.

Después del acondicionamiento previo, las semillas fueron colocadas, totalmente inmersas en la solución de tetrazolio al (0,075% - 0,5 % – 0,1%), en cajas Petri.

Las semillas permanecieron entre 35°C por aproximadamente entre 3 a 1 hora de acuerdo a la solución utilizada. Esta temperatura puede ser obtenida ya que se utilizó una estufa.

Para evitar el deterioro del tetrazolio se guardó las muestras en completa oscuridad ya que este reactivo es sensible a la luz.

3.3.5. Tiempos de Tinción.

Una vez sumergidas las semillas en las soluciones de sal de tetrazolio se las llevó a la estufa a una temperatura de 35°C.

Los tiempos de tinción fueron:

- Solución al 0,075% por un tiempo de 3 horas a 35°C.
- Solución al 0,1% por un tiempo de 2 horas a 35°C.
- Solución al 0,5% por un tiempo de 1 hora a 35°C.

3.3.6. Lavado de la muestra.

Una vez que se alcanzó la coloración ideal, las semillas fueron retiradas de la estufa a 35°C y a continuación son lavadas con agua común, se mantuvieron sumergidas en agua hasta el momento de la evaluación.

Se tomó la decisión de guardar las semillas en refrigerador para que pudieran ser analizadas inclusive después de 12 horas.

3.3.7. Interpretación.

Para una correcta interpretación de los resultados se han tomado en cuenta, los conocimientos técnicos según las coloraciones de las semillas.

La precisión del test dependió del conocimiento de todas las técnicas y procedimientos involucrados en el test.

Se ha clasificado en la evaluación de las semillas según los objetivos, que son:

- a) Se determinó el potencial de germinación de un lote de semillas en las condiciones más ideales posibles.
- b) Se Clasifico las semillas en viables y no viables.

Los dos objetivos pueden ser alcanzados por la interpretación de cuatro características básicas después de la coloración: condición, color de los tejidos, localización y el tamaño de las lesiones.

Para dicho diagnostico se ha reconocido los síntomas típicos de los diferentes tipos de daños que han ocurrido en las semillas.

3.3.8. Interpretación de los 3 lotes de semillas de arveja.

Las semillas fueron analizadas una a una, seccionándolas longitudinalmente a través del centro del eje embrionario con ayuda de un bisturí.

En los casos en que el corte no fue bien centralizado, la evaluación de la condición del eje embrionario se realizó en la mitad que contenía la mayor parte del eje, exponiéndose su cilindro central, después de los cortes adicionales.

Después de seccionadas las semillas, las dos mitades fueron separadas, habiendo removido el tegumento para que la superficie externa de los cotiledones sea expuesta.

De ese modo se pudo observar la superficie externa e interna de los cotiledones, determinando todas las formas de daños.

Cuando se observó que ocurrió algún daño en el eje, pero no fue lo suficientemente profundo para dañar el cilindro central, la semilla fue, entonces, considerada viable.

Los casos en que el daño alcanzó el cilindro central, la semilla fue considerada no viable. Se analizó que de las observaciones antes mencionadas, el cilindro central es una región importante en la semilla de arveja, habiendo observado con mucha atención dicha región.

Puesto que a través de esta región pasan los vasos que conectan el eje embrionario a los cotiledones, siendo, por lo tanto, de suma importancia para el transporte de materiales de reserva de los cotiledones a la plántula en desarrollo, en las fases iniciales de germinación y emergencia.

De esta observación se determinó los siguientes grados de deterioro en la viabilidad de las semillas:

- rosado oscuro: tejido vivo y vigoroso
- rojo vivo fuerte: tejido deteriorándose
- blanco lechoso: tejido muerto

La presencia de rojo intenso es característica de tejidos en deterioro, que permiten mayor difusión de la solución de tetrazolio a través de sus membranas celulares ya comprometidas.

El blanco identifico tejidos muertos, que no presentan actividad enzimática necesaria para la producción de formazan.

Tejidos muertos normalmente fueron flácidos y presentaron coloración blanco-opaca, pero en algunas ocasiones pueden ser amarillentos, cenizas o verdosos, principalmente cuando han sufrido daños causados por chinches.

Puesto que en raras oportunidades, los tejidos muertos pueden presentar manchas rojizas, causadas por la actividad de ciertos hongos o bacterias. Entretanto, tales tejidos son fácilmente diferenciados de los tejidos viables.

Observando que después del seccionamiento de las semillas, las superficies internas de los cotiledones son normalmente decoloradas (blancas), se lo analizó como semilla viable.

Se caracterizó que los tejidos viables, que no adquirieron color, como normalmente turgentes, brillantes, presentando tonalidades blanco-rosadas o blanco-amarillentas.

La posición y la extensión de los daños que ocurrieron en las semillas fueron características de importancia crucial para la correcta evaluación de las mismas.

Una vez terminando de identificar los 3 lotes de semillas de arveja se clasificó en 2 grupos semillas viables y semillas no viables.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Protocolo establecido.

De acuerdo al trabajo realizado con la prueba de tetrazolio se estableció el siguiente protocolo para determinar la viabilidad de semillas de arveja.

4.1.1. Protocolo a seguir en la prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad en semillas de arveja.

La siguiente prueba debe ser realizada en laboratorio de semillas con las condiciones adecuadas para dicho trabajo.

Material necesario.

- Semillas de Arveja.
- Sal de Tetrazolio (cloruro de 2,3,5 trifenil)
- Vasos de precipitado pequeños
- Toallas de Papel
- Bolsa de polietileno
- Estufa
- Agua destilada
- Cajas de Petri
- Bisturí
- Lupa
- Pinzas
- balanza de precisión.
- probeta.

Descripción del trabajo.

El presente trabajo se desarrollara en diferentes etapas:

Preparación de la solución.

Para la preparación de la solución al 0,075% se utilizara primeramente 1gr de sal de tetrazolio diluida en 100 ml de agua destilada, de cual se sacara 75 ml de la solución preparada, diluyendo esta en 925 ml de agua destilada obteniendo así la solución necesaria al 0,075 %.

El agua utilizada en la preparación de la solución de trabajo puede ser destilada o de la red de abastecimiento, mientras tenga su pH entre 6 y 7, o no sea salobre.

Preparación de las semillas.

Para el desarrollo del trabajo se utilizara 2 o 3 repeticiones de 50 semillas de arveja.

Acondicionamiento.

Las semillas deberán ser embaladas en papel de germinación humedecido y mantenidas en estas condiciones por un período de 16 horas, a 25°C.

Para evitar la pérdida de humedad, los embalajes permanecerán en cámaras húmedas, también se puede utilizar bolsas plásticas, en germinador.

Coloración.

Después del acondicionamiento previo, las semillas deben ser colocadas, totalmente inmersas en la solución de tetrazolio al 0,075% en cajas Petri.

Las semillas permanecerán entre 35°C por aproximadamente entre 3 horas en estufa.

Para evitar el deterioro del tetrazolio se debe guardar las muestras en completa oscuridad ya que este reactivo es sensible a la luz.

Lavado de las semillas.

Una vez que se alcance la coloración ideal por 3 horas, las semillas serán retiradas de la estufa a 35°C y a continuación se lavara con agua común, y mantenerse sumergidas en agua hasta el momento de la evaluación.

Lectura de las semillas.

Para una correcta interpretación de los resultados se tomara en cuenta, los conocimientos técnicos según las coloraciones de las semillas.

Se Clasificara las semillas en viables y no viables.

Para dicha clasificación se tomara en cuenta cuatro características básicas después de la coloración: condición, color de los tejidos, localización y el tamaño de las lesiones.

- rosado oscuro: tejido vivo y vigoroso
- rojo vivo fuerte: tejido deteriorándose
- blanco lechoso: tejido muerto

La presencia de rojo intenso es característica de tejidos en deterioro, que permiten mayor difusión de la solución de tetrazolio a través de sus membranas celulares ya comprometidas.

El blanco identifica tejidos muertos, que no presentan actividad enzimática necesaria para la producción de formazan.

Tejidos muertos normalmente serán flácidos y presentaron coloración blanco-opaca, pero en algunas ocasiones pueden ser amarillentos, cenizas o verdosos, principalmente cuando han sufrido daños causados por chinches.

Puesto que en raras oportunidades, los tejidos muertos pueden presentar manchas rojizas, causadas por la actividad de ciertos hongos o bacterias. Entretanto, tales tejidos son fácilmente diferenciados de los tejidos viables.

Las semillas deberán ser analizadas una a una, seccionándolas longitudinalmente a través del centro del eje embrionario con ayuda de un bisturí.

Después de seccionadas las semillas, las dos mitades serán separadas, habiendo removido el tegumento para que la superficie externa de los cotiledones sea expuesta.

Se clasificara las semillas en viables y no viables de acuerdo a la lectura y conocimiento del encargado de dicha prueba.

4.2. Porcentaje de germinación directa de semillas de arveja.

TABLA N° 1 Porcentaje de germinación de semillas de arveja

| LOTE | REPLICAS | N° DE SEMILLAS VIABLES | N° DE SEMILLAS NO VIABLES | PORCENTAJE DE GERMINACIÓN |
|------|----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | I | 89 | 11 | 89% |
| | II | 88 | 12 | |
| | III | 90 | 10 | |
| 2 | I | 86 | 14 | 87% |
| | II | 89 | 11 | |
| | III | 86 | 14 | |
| 3 | I | 80 | 20 | 82% |
| | II | 81 | 19 | |
| | III | 84 | 16 | |

Porcentaje de germinación basado en el resultado obtenido de germinación directa entre papel, de los 3 lotes de semillas de arveja certificados por el Laboratorio de INIAF Tarija.

En este cuadro se muestra el porcentaje de germinación de los tres lotes de semillas de arveja, obteniendo el lote 1 un mayor porcentaje de germinación que equivale al 89% de viabilidad.

Según (ISTA, 2004); La germinación de una semilla es la emergencia y desarrollo de las plántulas, hasta un estado en el cual el aspecto de sus estructuras esenciales indica si será posible que se desarrollen como plantas normales, bajo condiciones favorables de suelo.

4.2.1. Demostración del porcentaje de germinación.

GRÁFICO N° 1 Demostración de la germinación Entre Papel

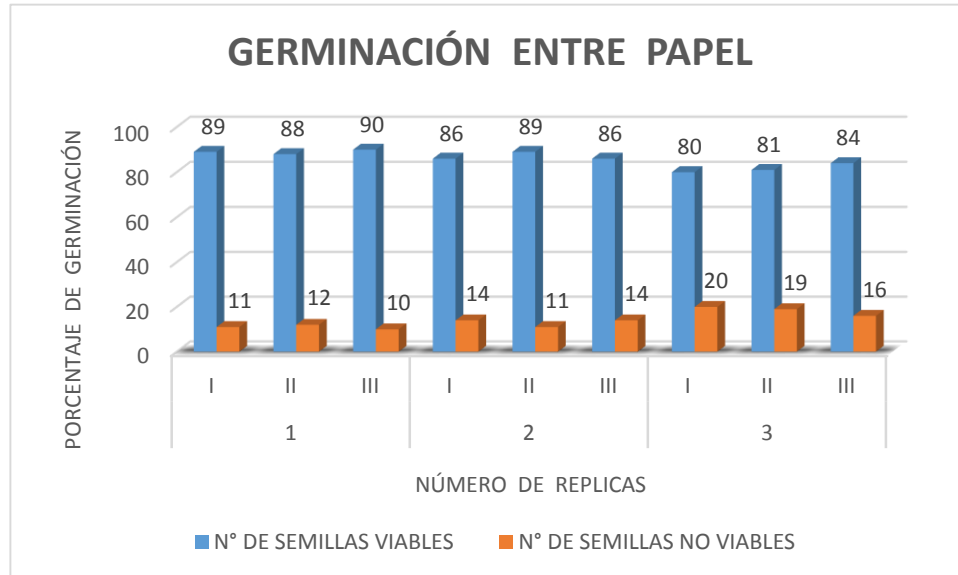
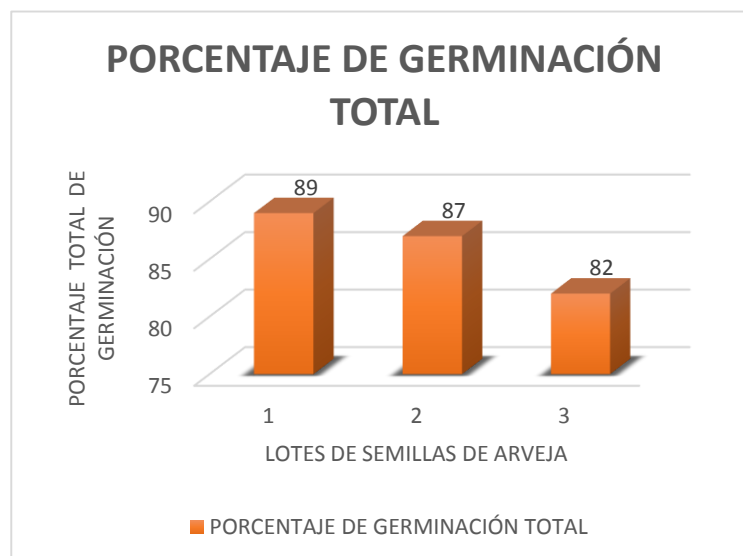


GRÁFICO N° 2



4.2.2. Tiempo de tinción de acuerdo a la concentración de tetrazolio.

TABLA N° 2 Tiempo de tinción

| CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO | TEMPO DE TINCION | TEMPERATURA |
|-----------------------------|------------------|-------------|
| 0,075% | 3 horas | 35°C |
| 0,1% | 2 horas | 35°C |
| 0,5% | 1 hora | 35°C |

En la tabla N° 2 se muestra los tiempos de tinción que fueron necesarios para cada concentración de sal de tetrazolio.

Con la concentración al 0,075% se necesitó 3 horas de reposo en la solución de tetrazolio a una temperatura de 35°C.

Con la concentración al 0,1% se necesitó 2 horas de reposo en la solución de tetrazolio a una temperatura de 35°C.

Con la concentración al 0,5% se necesitó 1 horas de reposo en la solución de tetrazolio a una temperatura de 35°C.

Llegando a la conclusión que a mayor concentración de tetrazolio menor es el tiempo de tinción de la semilla.

En las semillas de arveja se pudo observar que con la concentración al 0,075 % se pudo observar mejor los tejidos de la semilla y por lo tanto necesariamente se debe esperar 3 horas para la tinción y para obtener mejores resultados en la lectura de viabilidad.

4.3. Identificación del color de la reacción a la sal de tetrazolio con 3 diferentes concentraciones.

CUADRO N° 1 Identificación de la coloración de sal de tetrazolio

| CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO | SEMILLA | EMBRIÓN Y COTILEDONES |
|-----------------------------|--|---------------------------------|
| 0,075% | Se muestra teñido de color rosado intenso (se puede observar con mayor claridad) | Teñidos de color rosado intenso |
| 0,1% | Se muestra teñido de color rojo vivo | Teñidos de color rojo vivo |
| 0,5% | Se muestra teñido de color guindo (con mayor dificultad de observación) | Teñidos de color guindo |

En cuadro N° 2 se muestra las diferencias de coloración de las semillas de arveja con la reacción a la sal de tetrazolio.

Concentración al 0.075%

Utilizando una concentración de 0,075 se pudo observar claramente los tejidos de la semilla tanto como el embrión como los cotiledones, que son los órganos principales para determinar la viabilidad de la semilla.

Con esta concentración se observó mucho más fácil la embrión ya que presento una tinción de color rosado intenso que facilito la lectura.

De acuerdo con Moore (1985), tejidos vigorosos tienden a adquirir la coloración gradual e uniformemente cuando son embebidos en tetrazolio, y se presentan turgentes.

Concentración al 0,1 %

Con esta concentración de igual manera se observó los tejidos de la semilla tanto embrión como cotiledones.

La semilla obtuvo una tinción de color rojo y con ayuda de una lupa se pudo lecturar los lotes de semilla de arveja.

Concentración al 0,5 %

Claramente se observó una tinción de color guindo, lo cual dificultó al momento de realizar la lectura de las semillas, ya que con esa coloración fue un poco difícil poder diferenciar con claridad tanto a las semillas viables como a las no viables.

La concentración de tetrazolio para leguminosas deberá ser en un porcentaje menor al 1% de acuerdo al tipo de semilla a examinar (Vásquez, 2008).

4.4. Identificación de las semillas viables.

CUADRO N° 2 Identificación de las semillas viables

| CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO | SEMILLA | EMBRIÓN |
|-----------------------------|---|---|
| 0,075% | Teñido de color rosado intenso, en el cual se puede observar claramente los tejidos vivos | Completamente sin teñir, el cual muestra ser viable |
| 0,1% | Teñido de color rojo vivo, en el cual se puede observar que esta vivo | Sin teñir, por lo que se observa que es viable |
| 0,5% | Teñido de color guindo, en el cual se puede observar con mayor dificultad que esta vivo | Teñidos de color rojo claro, de igual manera se observa pero con mayor dificultad que es viable |

En el cuadro N° 3 se muestra la coloración que obtuvieron las semillas viables:

Con la concentración de 0,075 % con una tinción de color rosado intenso le embrión quedo completamente sin teñir el cual nos indica que la semilla es viable.

Con la concentración de 0,1 % la semilla se tiño de color rojo y mostro el embrión completamente sin teñir el cual nos indicó que la semilla es viable.

Con la concentración de 0,5 % la semilla se tiño de color guindo y con ayuda de una lupa se observó que el embrión se tiño de color rojo claro el cual también indico que la semilla es viable.

La diferencia de coloración se debe a la concentración utilizada, en estos ensayos se observó claramente como diferenciar las semillas viables, teniendo en cuenta que el embrión quede completamente libre de daño, solo así se lo clasificó como semilla viable.

Según (Moore, 2003); La observación de tales diferencias de color, juntamente con el conocimiento de diversas características de las semillas, permiten la determinación de la presencia, localización y naturaleza de los disturbios que pueden ocurrir en los tejidos embrionarios.

La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración.

Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente (ISTA, 2007).

4.5. Identificación de las semillas no viables.

CUADRO N° 3 Identificación de las semillas no viables

| CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO | SEMILLA | EMBRIÓN |
|-----------------------------|---|---|
| 0,075% | Teñido de color rojo, en el cual se puede observar claramente los tejidos muertos | Completamente teñido de color rojo, el cual muestra ser no viable |
| 0,1% | Teñido de color rojo vivo, en el cual se puede observar los tejidos muertos | Completamente teñido de color rojo vivo, el cual muestra ser no viable |
| 0,5% | Teñido de color guindo, en el cual se puede observar con mayor dificultad los tejidos muertos | Teñidos de color guindo, de igual manera se observa pero con mayor dificultad que son tejidos muertos |

En el cuadro N° 4 se muestra la coloración que obtuvieron las semillas no viables:

Con la concentración al 0,075 % se observó que las semillas se tiñeron de color rosado intenso, quedando el embrión teñido de color rojo el cual muestra que es una semilla no viable.

De igual manera con la concentración de 0,1 % el embrión quedo teñido de color rojo el cual se lo identifico como no viable.

Con la concentración de 0,5 % tanto la semilla como el embrión quedaron teñidos de color guindo, y con ayuda de una lupa se pudo observar que el embrión tomo un color guindo oscuro, el cual determino ser no viable.

También se encontró semillas que no tuvieron coloración quedando blancas pero con el embrión totalmente teñido de color rojo intenso identificadas como semillas muertas o no viables.

Cuando el embrión presento un poco de daño en su eje central de igual manera fue considerado no viable.

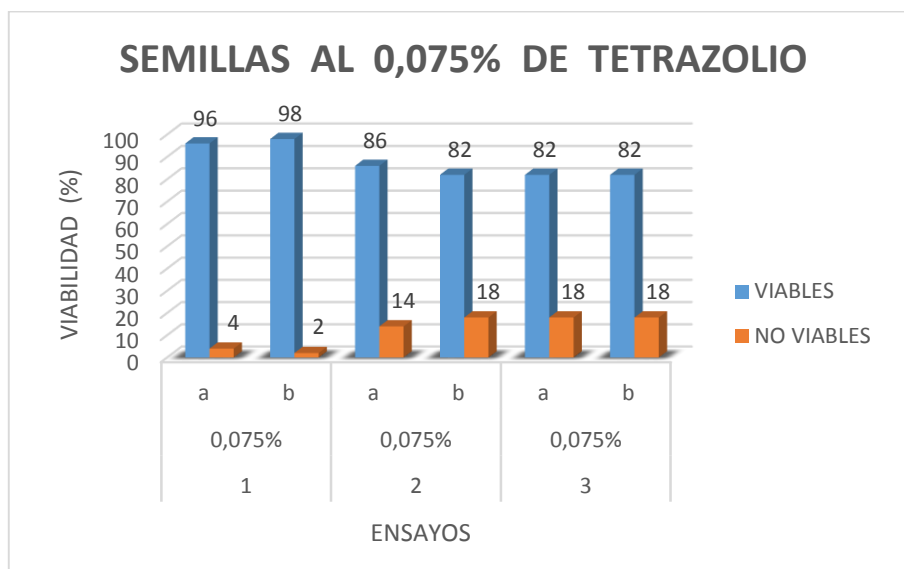
Según (Hampton y Tekrony, 2005); En la Prueba Topográfica por Tetrazolio se pone especial atención en todas las partes de cada semilla, particularmente en las características internas del embrión.

4.6. Primer ensayo: concentración al 0,075 % de tetrazolio.

TABLA N° 3 Concentración al 0,075 % de tetrazolio

| N° | CONCENTRACION DE TETRAZOLIO | ENSAYO | VIABLES | NO VIABLES |
|----|-----------------------------|--------|---------|------------|
| 1 | 0,075% | a | 96 | 4 |
| | | b | 98 | 2 |
| 2 | 0,075% | a | 86 | 14 |
| | | b | 82 | 18 |
| 3 | 0,075% | a | 82 | 18 |
| | | b | 82 | 18 |

GRÁFICO N° 3



En la tabla N°3 se muestra la comparación de las semillas viables y no viables con la concentración al 0,075 % de sal de tetrazolio.

Obteniendo mejor resultado al momento de realizar la lectura de las semillas ya que con esta concentración se observa con mayor claridad tanto los tejidos vivos como los muertos.

El tiempo de tinción que se necesitó para el remojo en la concentración de 0,075% de tetrazolio fue de 3 horas a temperatura de 35°C.

De los 3 lotes analizados se observó que el lote 1 presento mayor viabilidad que se observó 97% de semillas viables y un 3% de semillas no viables.

En el lote 2 se observa un 84 % de semillas viables y un 16 % de semillas no viables.

En el lote 3 se observa un 82 % de semillas viables y 18 % de semillas no viables.

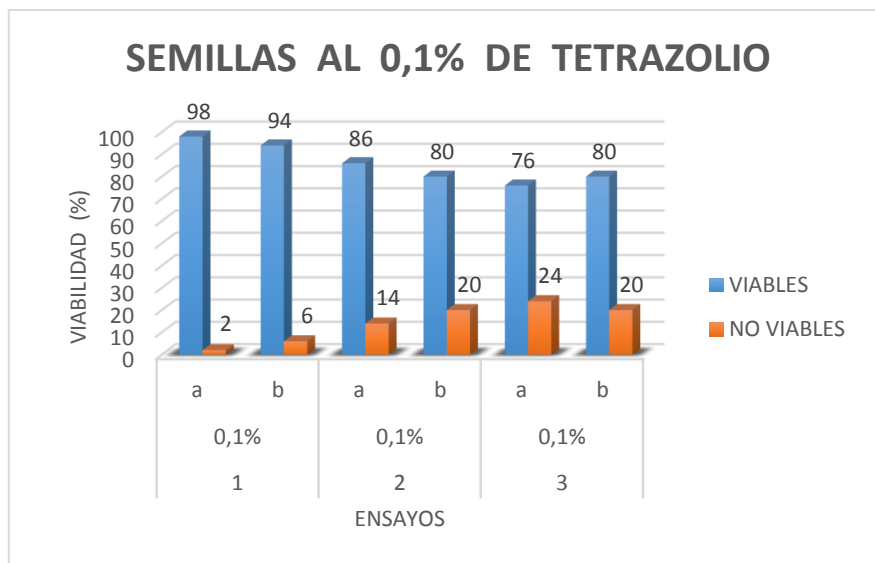
Teniendo en cuenta que se utilizaron 3 lotes de semillas de arveja con porcentajes de germinación diferentes de acuerdo a al lote 1 la prueba de germinación nos dio un porcentaje de 89% de viabilidad, con la prueba de tetrazolio el porcentaje de viabilidad es un 97% con la concentración de 0,075% se puede decir que se obtuvo un buen resultado en la lectura de semillas viables y no viables.

4.7. Segundo ensayo: concentración al 0.1 % de sal de tetrazolio.

TABLA N° 4 Concentración al 0.1 % de sal de tetrazolio

| N° | CONCENTRACION DE TETRAZOLIO | ENSAYO | VIABLES | NO VIABLES |
|----|-----------------------------|--------|---------|------------|
| 1 | 0,1% | a | 98 | 2 |
| | | b | 94 | 6 |
| 2 | 0,1% | a | 86 | 14 |
| | | b | 80 | 20 |
| 3 | 0,1% | a | 76 | 24 |
| | | b | 80 | 20 |

GRÁFICO N° 4



En la tabla N° 4 y en el gráfico N° 4 se observa de igual manera la comparación de las semillas viables y no viables en los 3 lotes de semillas de arveja utilizando la concentración de sal de tetrazolio al 0,1 %.

Aquí se pudo observa una coloracion rojo vivo en las semillas con el cual se distinguió las semillas vivas de las muertas.

El tiempo de tincion para esta concentracion al 0,1 % de sal de tetrazolio fueron 2 horas a temperatura de 35°C.

De los 3 lotes analizados se observó que el lote 1 presento mayor viabilidad que se observó un 96 % de semillas viables y un 4 % de semillas no viables.

En el lote 2 se observa un 83 % de semillas viables y un 17 % de semillas no viables.

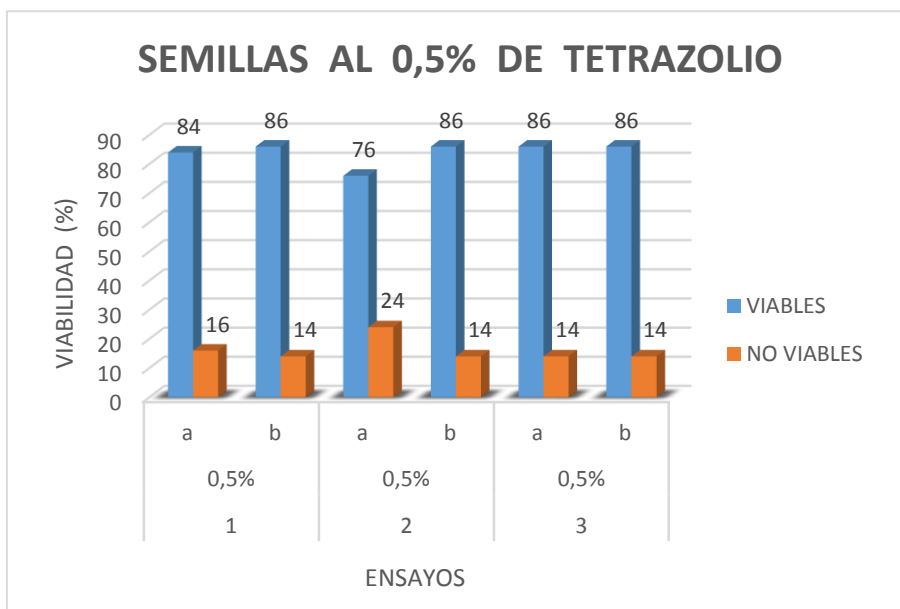
En el lote 3 se observa un 78 % de semillas viables y 22 % de semillas no viables.

4.8. Tercer ensayo: concentración al 0,5 % de sal de tetrazolio.

TABLA N° 5 Concentración al 0,5 % de sal de tetrazolio

| N° | CONCENTRACION DE TETRAZOLIO | ENSAYO | VIABLES | NO VIABLES |
|----|-----------------------------|--------|---------|------------|
| 1 | 0,5% | a | 84 | 16 |
| | | b | 86 | 14 |
| 2 | 0,5% | a | 76 | 24 |
| | | b | 86 | 14 |
| 3 | 0,5% | a | 86 | 14 |
| | | b | 86 | 14 |

GRÁFICO N° 5



En la tabla N° 5 y en el gráfico N° 5 se observa de igual manera la comparación de las semillas viables y no viables en los 3 lotes de semillas de arveja utilizando la concentración de sal de tetrazolio al 0,5 %.

Aquí se pudo observar una tinción de color guindo en las semillas con lo cual con ayuda de una lupa se observó las semillas vivas de las muertas.

El tiempo de tinción necesario para esta concentración al 0,5% fue de 1 hora a una temperatura de 35°C.

De los 3 lotes analizados se observó que el lote 1 presentó mayor viabilidad observando un 85 % de semillas viables y un 15 % de semillas no viables.

En el lote 2 se observa un 81 % de semillas viables y un 19 % de semillas no viables.

En el lote 3 se observa un 86 % de semillas viables y 14 % de semillas no viables.

En este caso la concentración al 0,5 % no nos facilitó la lectura correcta de las semillas ya que estas obtuvieron una tinción de color rojo muy intenso en cual dificultó mucho en la lectura.

Ya dicho anteriormente se utilizaron 3 lotes de semillas de diferentes porcentajes de germinación en el cual se observa que en el lote 3 no se relacionó con el porcentaje de germinación directa que tuvo la semilla anteriormente.

Pudiendo decir que la concentración al 0,5 % de sal de tetrazolio no es aconsejable para la determinación de viabilidad de las semillas de arveja.

4.9. Tabla general del porcentaje de semillas viables y no viables con las 3 concentraciones.

TABLA N° 6 Porcentaje de semillas viables y no viables con las 3 concentraciones

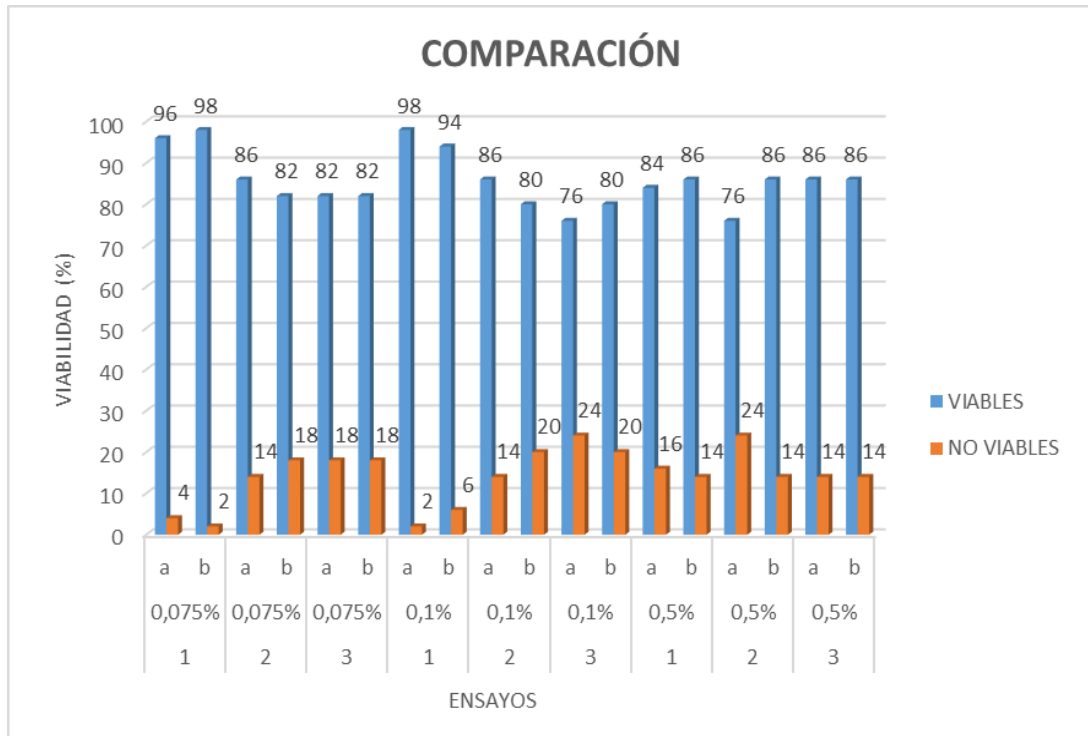
| N° | CONCENTRACION DE TETRAZOLIO | ENSAYO | VIABLES | NO VIABLES |
|----|-----------------------------|--------|---------|------------|
| 1 | 0,075% | a | 96 | 4 |
| | | b | 98 | 2 |
| 2 | 0,075% | a | 86 | 14 |
| | | b | 82 | 18 |
| 3 | 0,075% | a | 82 | 18 |
| | | b | 82 | 18 |
| 1 | 0,1% | a | 98 | 2 |
| | | b | 94 | 6 |
| 2 | 0,1% | a | 86 | 14 |
| | | b | 80 | 20 |
| 3 | 0,1% | a | 76 | 24 |
| | | b | 80 | 20 |
| 1 | 0,5% | a | 84 | 16 |
| | | b | 86 | 14 |
| 2 | 0,5% | a | 76 | 24 |
| | | b | 86 | 14 |
| 3 | 0,5% | a | 86 | 14 |
| | | b | 86 | 14 |

En la tabla N° 6 se muestra el porcentaje general de las 3 concentraciones de sal de tetrazolio, realizada en los 3 lotes de semillas con 2 repeticiones de cada lote. Ya que las semillas que se utilizaron fueron del laboratorio de INIAF los 3 lotes contaban con rendimiento de viabilidad mayor a 80% de germinación.

Es por esto que se observa un mayor rendimiento de semillas viables en comparación con las no viables.

4.10. Gráfico general del porcentaje de semillas viables y no viables con las 3 concentraciones.

GRÁFICO N° 6 Comparación del porcentaje de semillas viables y no viables con las 3 concentraciones



En el gráfico N° 6 se muestra el porcentaje general de las 3 concentraciones de sal de tetrazolio realizada en los 3 lotes de semillas con 2 repeticiones de cada lote. Ya que las semillas que se utilizaron fueron del laboratorio de INIAF los 3 lotes contaban con rendimiento de viabilidad mayor a 80% de germinación.

Es por esto que se observa un mayor rendimiento de semillas viables en comparación con las no viables.

Teniendo en cuenta que el lote 1 contaba con mayor rendimiento de germinación.

4.11. Evaluación de las 3 concentraciones de sal de tetrazolio en 3 diferentes lotes de semillas de arveja.

Concentración de la sal de tetrazolio:

C1 = 0,075%

C2 = 0,1%

C3 = 0,5%

Lotes de semillas de arveja de diferente procedencia:

L1 = Lote 1

L2 = Lote 2

L3 = Lote 3

TABLA N° 7 Diseño experimental completamente al azar

| TRATAMIENTOS | REPLICAS | | TOTALES | MEDIAS \bar{x} |
|--------------|----------|-----|---------|---------------------|
| | I | II | | |
| T1(L1C1) | 96 | 98 | 194 | 97 |
| T2(L1C2) | 98 | 94 | 192 | 96 |
| T3(L1C3) | 84 | 86 | 170 | 85 |
| T4(L2C1) | 86 | 82 | 168 | 84 |
| T5(L2C2) | 86 | 80 | 166 | 83 |
| T6(L2C3) | 76 | 86 | 162 | 81 |
| T7(L3C1) | 82 | 82 | 164 | 82 |
| T8(L3C2) | 76 | 80 | 156 | 78 |
| T9(L3C3) | 86 | 86 | 172 | 86 |
| | 770 | 774 | 1544 | |

Como se observa en la tabla N° 7 el tratamiento que obtuvo mayor porcentaje de viabilidad de semillas de arveja con las diferentes concentraciones tenemos, al T1 (L1C1) con 97%, seguido por el T2 (L1C2) con 96%, el T9 (L3C3) con 86%, y

finalmente el T8 (L3C2) obtuvo un 78% de viabilidad, por el cual se observa que con la concentración C1 (0,075%) y C2 (0,1%) se obtiene mejor resultados al aplicar la sal de tetrazolio

4.12. Tabla de ANOVA para calcular si existe diferencias entre las 3 concentraciones de tetrazolio.

TABLA N° 8 ANOVA

| FUENTES DE VARIACION | gl | SUMA DE CUADRADOS | CUADRADO MEDIO | F CALCULADA | F TABULADA | |
|----------------------|----|-------------------|----------------|-------------|------------|-------|
| | | | | | 5% | 1% |
| TRATAMIENTO | 8 | 679,11 | 84,89 | 7,14** | 3,44 | 6,03 |
| ERROR | 8 | 95,11 | 11,89 | ----- | ----- | ----- |
| TOTAL | 17 | 775,11 | ----- | ----- | ----- | ----- |

En la obtención de resultados se llega a la conclusión que si existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, ya que la F calculada es mayor a la F tabulada, por lo cual se realizó la prueba de TUKEY al 5%.

4.13. Prueba de TUKEY para determinar el mejor tratamiento para la viabilidad de las semillas de arveja con tetrazolio.

TABLA N° 9 Tabla de Valores

| | T1 (97) | T2 (96) | T9 (86) | T3 (85) | T4 (84) | T5 (83) | T7 (82) | T6 (81) |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| T8 (78) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T6 (81) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T7 (82) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T5 (83) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T4 (84) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T3 (85) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T9 (86) | * | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| T2 (96) | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

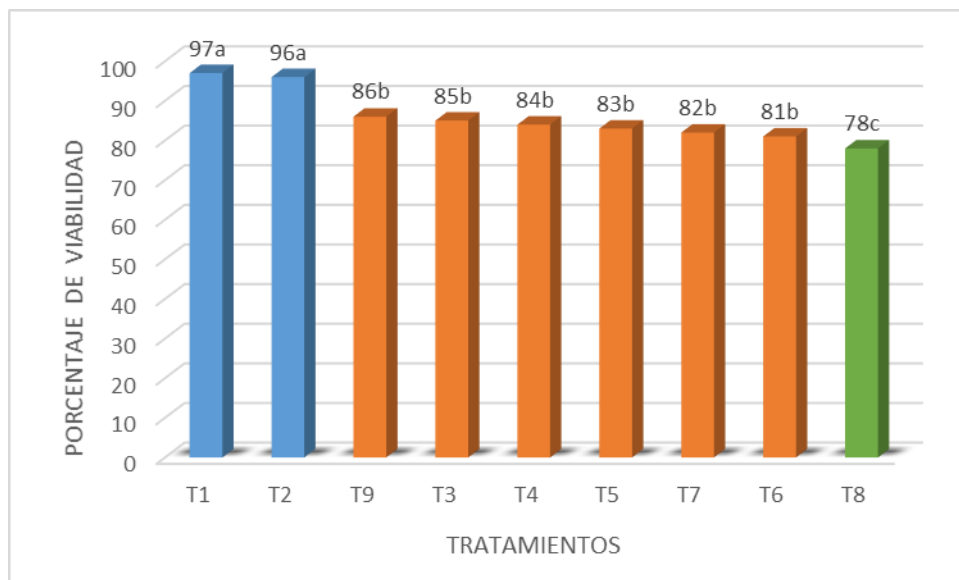
Como se observa en la tabla N°9 de los valores, se puede apreciar que existen diferencias significativas entre los primeros tratamientos, lo cual se demuestra en la siguiente tabla (N°10)

TABLA N° 10 TUKEY

| TRATAMIENTOS | MEDIAS |
|--------------|--------|
| T1 | 97 a |
| T2 | 96 a |
| T9 | 86 b |
| T3 | 85 b |
| T4 | 84 b |
| T5 | 83 b |
| T7 | 82 b |
| T6 | 81 b |
| T8 | 78 c |

En la tabla de TUKEY se puede observar con las letras las diferencias que existen en los tratamientos, donde se obtuvo mayor rendimiento en los T1 Y T2, los demás tratamientos no muestran diferencias significativas.

GRÁFICO N° 7 Promedios de la Viabilidad de las semillas de arveja con aplicación de sal de tetrazolio



Como se puede observar en el gráfico, los tratamientos que difieren según la prueba de TUKEY son, T1 (L1C1) y T2 (L1C2) con 97% y 96% respectivamente, mientras que los demás tratamientos no difieren entre ellos.

4.14. Asociación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación directa.

TABLA N° 11 Asociación entre germinación y tetrazolio

| LOTES | PRUEBA DE GERMINACION (%) | PRUEBA DE TETRAZOLIO AL 0,075% (%) |
|--------------|----------------------------------|---|
| 1 | 89 | 97 |
| 2 | 87 | 84 |
| 3 | 82 | 82 |

Para la determinar si existe asociación en la prueba de germinación directa y la prueba de tetrazolio en semillas de arveja se utilizó los resultados de los porcentajes obtenidos en la germinación directa y los porcentajes obtenidos de la prueba de tetrazolio.

Los resultados obtenidos muestran que en la prueba de germinación directa, en el Lote 1 se obtuvo el 89% de germinación directa, mientras que en la prueba de sal de tetrazolio al 0,075%, se obtuvo un 97% de viabilidad, existiendo una diferencia de 8% de viabilidad en ambas pruebas. Mientras que en el Lote 2, se obtuvo mayor viabilidad con la prueba de germinación directa con 87%, siendo superior a la prueba de tetrazolio con un 84%. Finalmente en el Lote 3 se obtuvieron resultados iguales en ambas pruebas con 82%, por lo cual queda demostrado que al utilizar una concentración de 0,075% de sal de tetrazolio en semillas de arveja, se obtienen lecturas más precisas para determinar la viabilidad.

Por lo cual se demuestra que existe una asociación entre la prueba de germinación directa y la prueba de sal de tetrazolio al 0,075%. Ya que existe una diferencia menor al 10% entre ambas pruebas, el mismo que está dentro del parámetro de aceptación, según el Laboratorio de semillas INIAF.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Se estableció el protocolo a seguir para realizar la prueba de viabilidad rápida de tetrazolio en semillas de arveja.

Se comprobó que con la prueba de tetrazolio a una concentración de 0,075 % de sal de tetrazolio facilita la lectura, obteniendo mejores resultados para determinar la viabilidad en semillas de arveja.

Con la prueba de viabilidad con tetrazolio, es posible obtener un valor de viabilidad que no se diferencia del obtenido por pruebas de germinación directa.

Con las pruebas de tetrazolio en semillas de arveja se demostró que es posible utilizar, para obtener resultados más rápidos ya que es una prueba confiable con respecto a la prueba de germinación directa.

Con una concentración de 0,5 % de sal de tetrazolio no se obtiene buenos resultados al momento de realizar la lectura, ya que toma una coloración muy oscura dificultando la lectura.

5.2. Recomendaciones.

Utilizar pruebas de tetrazolio para determinar de forma más rápida la viabilidad en semillas de arveja.

Para determinar la viabilidad en semillas de arveja, se recomienda utilizar la prueba de tetrazolio que no requiere de conocimientos muy técnicos para su aplicación.

Antes de aplicar la prueba de tetrazolio, se recomienda colocar las semillas en remojo, por un periodo de 16 horas para obtener mejores resultados.

Para determinar la viabilidad en semillas de arveja se debe utilizar una concentración al 0,075 % de sal de tetrazolio por un tiempo de 3 horas a una temperatura de 35°C.

Para obtener mejores resultados se debe realizar como mínimo 2 repeticiones por lote de semillas de arveja.

No utilizar frascos metálicos, porque puede haber reducción de la solución de tetrazolio, en formación, cuando entra en contacto con ciertos metales.