

# EL TEST DE TETRAZOLIO EN SEMILLAS DE SOJA





REPÚBLICA FEDERAL DE BRASIL

presidente  
FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ministro de agricultura  
FRANCISCO SÉRGIO TURRA

**Embrapa**

*Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria*

presidente  
ALBERTO DUQUE PORTUGAL

directores  
DANTE DANIEL GIACOMELLI SCOLARI  
ELZA ANGELA BATTAGLIA BRITO DA CUNHA  
JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PERES

*Centro Nacional de Investigación en Soja*

jefe  
JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO

jefe de investigación y desarrollo  
PAULO ROBERTO GALERANI

jefe administrativo  
VÂNIA BEATRIZ RODRIGUES CASTIGLIONI

jefe de comunicación y negocios  
AMÉLIO DALL'AGNOL

*Ejemplares de esta publicación pueden ser solicitadas a:*

*Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja  
Caixa Postal 231 - CEP 86001-970  
Tel. 55 43 371-6000 - Fax 55 43 371-6100  
Londrina, PR - Brasil*

Las informaciones vertidas em este documento solamente pueden ser reproducidas con la autorización del Comité Editor Interno de la Embrapa Soja.

## **EL TEST DE TETRAZOLIO EN SEMILLAS DE SOJA**

José de Barros França Neto, Francisco Carlos Krzyzanowski,  
Nilton Pereira da Costa

**Embrapa**

**comité editor**

CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO  
IVANIA APARECIDA LIBERATTI  
FLÁVIO MOSCARDI  
JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO  
LÉO PIRES FERREIRA  
NORMAN NEUMAIER  
ODILON FERREIRA SARAIVA

**ilustraciones**

DANILO ESTEVÃO

**traducción**

DANIEL RICARDO SOSA-GOMEZ

**revisión**

MARIA VICTORIA FRANCOMANO DE PICARDI

**tapa**

Semillas de soja con diferentes clases de lesiones causadas por chinches  
(Foto: J. B. França Neto)

**tiraje**

1000 ejemplares  
Junio/1998

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da. El test de tetrazolio en semillas de soja. Londrina : EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 117).

1. Soja - Semilla - Test de tetrazolio. I. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). II. Título. III. Série.

CDD 631.521

**PRESENTACIÓN**

*La evaluación de la calidad fisiológica de la semilla de soja ha sido un gran desafío para los estudiosos de esta área, debido a la influencia de los diversos factores que pueden afectar su calidad, en las diferentes fases de su producción. El test de tetrazolio, por brindar un examen detallado de las estructuras esenciales de la semilla, ha contribuido para identificar estos factores, señalando los más importantes, responsables por la reducción de esa calidad.*

*La Embrapa, mediante los trabajos de investigación desarrollados por el Área de Semillas del Centro Nacional de Investigaciones en Soja, ha contribuido para perfeccionar la metodología del test de tetrazolio. Una de las principales preocupaciones de esta área es la de proporcionar a la industria y los programas de investigación un test eficaz que brinde informaciones confiables en la evaluación de la calidad de las semillas de soja.*

*Esta publicación ha sido editada con la finalidad de compartir la utilización de estos conocimientos con toda la comunidad de profesionales que trabajan con semillas.*

**PAULO ROBERTO GALERANI**

Jefe de Investigación y Desarrollo  
Embrapa Soja

# **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2 HISTORIA .....</b>	<b>9</b>
<b>3 PRINCIPIOS DEL TEST .....</b>	<b>12</b>
<b>4 MATERIAL NECESARIO .....</b>	<b>13</b>
<b>5 INTERPRETACIÓN .....</b>	<b>16</b>
5.1. Diagnóstico de las Causas del Deterioro de la Semilla de Soja .....	20
5.2. Identificación de los Niveles de Viabilidad .....	25
CLASE 1 (vigor muy elevado) .....	35
CLASE 2 (alto vigor) .....	36
CLASE 3 (vigor medio) .....	40
CLASE 4 (vigor bajo) .....	45
CLASE 5 (vigor muy bajo) .....	49
CLASE 6 (no viable) .....	51
CLASE 7 (no viable) .....	51
CLASE 8 (semilla muerta) .....	55
5.3. Utilización de la Ficha e Interpretación de los Resultados .....	55
5.3.1. Interpretación de los Resultados .....	58
<b>6 PRECISIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>7 VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL TEST .....</b>	<b>61</b>
<b>8 CUANDO APLICAR EL TEST DE TETRAZOLIO .....</b>	<b>62</b>
<b>9 REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>68</b>

# **EL TEST DE TETRAZOLIO EN SEMILLAS DE SOJA**

Jose de Barros França Neto<sup>1</sup>  
Francisco Carlos Krzyzanowski<sup>1</sup>  
Nilton Pereira da Costa<sup>1</sup>

# 1

## **INTRODUCCIÓN**

La producción y utilización de semillas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de alta calidad son factores básicos de mayor importancia para el éxito de su producción. Para que se alcancen los niveles adecuados de calidad, el sistema de control de calidad en el sistema de producción de semillas de soja debe ser ágil, versátil y confiable, proporcionando resultados precisos de manera rápida. Algunas determinaciones, como pureza física y varietal, contenido de humedad e índice de daños mecánicos pueden ser realizadas en algunos minutos, cumpliendo, parcialmente, las exigencias de calidad.

La demora en la obtención de resultados basados en la determinación del poder germinativo resulta en seria limitación durante el proceso de decisión en el sistema de producción de semillas. Además de la demora en la ejecución, este análisis no proporciona informaciones sobre vigor, y no permite la identificación precisa de los factores que afectan la calidad de las semillas. Sus resultados son frecuentemente enmascarados por la presencia de daños por imbibición rápida (França Neto *et al.*, 1997) y por la presencia de hongos como *Phomopsis* sp. y *Fusarium semitectum* (Henning y França Neto, 1980; França Neto y West, 1989a, 1989b). Estas limitaciones pueden resultar en serios perjuicios para los productores de semillas o pueden afectar negativamente las

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, Ph.D., Investigador de la Embrapa Soja; Caixa Postal 231; 86001-970 Londrina, PR, Brasil. E-mail: franca@cnpso.embrapa.br

decisiones relacionadas con: la cosecha, el procesamiento, el almacenaje y la comercialización.

Entre los diversos métodos de control de calidad de semillas adoptados en Brasil, el test de tetrazolio se ha destacado, principalmente en el cultivo de la soja, por su rapidez, precisión y por el gran número de informaciones obtenidas mediante el mismo. Este análisis, además de evaluar la viabilidad y el vigor de los lotes de semillas, proporciona el diagnóstico de los problemas más comunes responsables por la reducción de calidad, tales como daños mecánicos, deterioro por humedad y daños de chinches. Sin embargo, además de éstos, los daños de secado, de “stress” hídrico y los de heladas pueden también ser visualizados por este test. Este método de diagnóstico ha presentado elevados índices de adopción en Brasil, porque además de señalar los problemas de reducción de calidad de la semilla, puede identificar los puntos de origen de esos problemas, permitiendo que se adopten medidas correctivas, dando como resultado la producción de semillas de alta calidad.

En el caso de la soja, debido a la publicación de las primeras versiones de este manual (França Neto *et al.*, 1985; França Neto *et al.*, 1988), y también a los diversos entrenamientos ofrecidos por profesionales de la Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria, Embrapa Soja y de otras instituciones, estamos seguros de que el método es utilizado en todos los laboratorios de análisis de semillas brasileños que trabajan con esta especie. En consecuencia, actualmente, se puede mencionar que Brasil es el líder mundial en la utilización del test de tetrazolio, en forma rutinaria. Algunos datos ilustran la importancia de este liderazgo: para la siembra de 12,5 millones de hectareas, previstos para la campaña 1997/98, fueron necesarias aproximadamente un millón de toneladas de semillas de soja, lo que significa 20 millones de bolsas de 50 kg, esto representa aproximadamente 100.000 lotes. Si en promedio se analiza el 80% de éstos lotes, por lo menos dos veces por el test de tetrazolio, durante el proceso de control de calidad, esto resultará en 160.000 análisis realizados en 1997, sólomente para el cultivo de la soja.

El uso del test de tetrazolio en Brasil repercute no sólo en relación a los aspectos cuantitativos, conforme ilustran los números presentados anteriormente, sino también y principalmente, en los cualitativos. Su realización en conjunto con otros métodos, ha propiciado la comercialización de lotes de

semilla que efectivamente presentan elevados patrones de calidad. Esto ha resultado en un sistema de control de calidad de alta confiabilidad, significando mayores beneficios para los productores de semillas, debido a la producción de semillas de alta calidad a menor costo. En consecuencia, según informaciones recibidas de diversos productores de semillas, los índices de reposición de semillas y de resiembra han sido casi nulos.

## 2

## HISTORIA

“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, 1985, p. 2). Revisiones más detalladas sobre la historia del test de tetrazolio han sido publicadas por Cottrell (1948), Delouche *et al.* (1962), Gadd (1950), Isely (1952), Lakon (1953), Lindenbein (1965) y Moore (1962b, 1966, 1969, 1976). Una síntesis de los principales hechos que contribuyeron para su desarrollo se detallan 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 (1969), 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. Durante este viaje, Hasegawa reveló al científico alemán F.E. Eidmann, algunos detalles de su metodología de análisis que, a su vez, mejoró el método del selenio (Moore, 1969).

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, 1940). 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. Según Cottrell (1948) y Isely (1952), los trabajos de Kühn e Jerchel (1941), indicaban que diversos compuestos de tetrazolio podrían reducirse en los tejidos vivos. 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 *et al.* (1947), de la Universidad Estatal de Iowa. Otros estudios pioneros, realizados en ese mismo país, según Moore (1976), 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, Raspert 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 (Delouche *et al.*, 1962). 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, 1983), 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, 1985), publicado por la ISTA. Tal publicación contiene detalles sobre los métodos utilizados en el test para más de 650 especies.

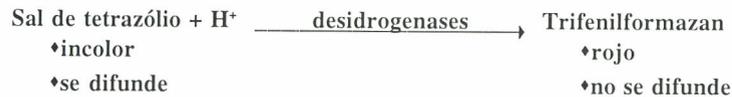
El test de tetrazolio fue también adoptado con éxito en diversos países. En Brasil, el método fue introducido por diversos profesionales, que recibieron entrenamientos en la Universidad Estatal de Misisipi. El método fue mejorado

para la soja por los investigadores del Centro Nacional de Investigaciones en Soja de la Embrapa, que publicaron tres manuales específicos para soja (França Neto, 1981; França Neto *et al.*, 1985; França Neto *et al.*, 1988). Hoy, el ensayo es rutinario en todos los laboratorios de análisis de semillas que trabajan con soja, en Brasil.

## 3

### PRINCIPIOS DEL TEST

El test de tetrazolio se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland *et al.*, 1959; Moore, 1973; Smith, 1952; Smith y Throneberry, 1951) 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 mas 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 distúrbios que pueden ocurrir en los tejidos embrionarios (Moore, 1973).

## 4

### MATERIAL NECESARIO

Para aplicar este método es necesario el siguiente material:

- a) reactivos:
    - ♦ sal de tetrazolio: 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio, normalmente comercializado en frascos con 10 g;
  - b) material de vidrio:
    - ♦ cajas de Petri;
    - ♦ vasos de precipitación o vasos de plástico, volumen de 50 ml;
    - ♦ frasco de vidrio, color ámbar, para almacenar la solución de tetrazolio (se reduce con la luz).
- Importante:** no utilizar frascos metálicos, porque puede haber reducción de la solución de tetrazolio, en formación, cuando entra en contacto con ciertos metales, según Bulat (1961).
- c) hoja de afeitar;
  - d) estufa o germinador, con temperatura entre 35°C y 40°C;
  - e) lupa de seis aumentos (6X) con iluminación fluorescente, preferentemente circular;
  - f) heladera para almacenar las muestras;
  - g) papel de germinación.

## **Preparación de la solución**

Es recomendable utilizar la solución con una concentración de 0,075%. Esto permite la coloración adecuada de las semillas, es más económico y hace posible visualizar con precisión los daños mecánicos recientes, causados por abrasión, los que normalmente no serían detectados con el uso de soluciones más concentradas (0,5 a 1,0%), como se sugiere en la literatura internacional (AOSA, 1983; Delouche *et al.*, 1962; Grabe, 1970; Moore, 1985). Además, la utilización de esta solución menos concentrada es más económica: con un frasco de 10 g de sal se puede ensayar la viabilidad de hasta 200 lotes de semillas, utilizando la solución al 0,075%; solamente 15 muestras podrían ser analizadas con 10 g de sal, en el caso que la solución utilizada tuviera la concentración de 1,0%.

Inicialmente, se prepara la solución de reserva a 1,0%, mezclando 10,0 g de la sal de tetrazolio en 1,0 litro de agua destilada. Esta solución debe ser almacenada en un pote de vidrio de color ámbar, en lugar oscuro y fresco, preferiblemente en heladera.

Cuando sea necesario, se prepara la solución de trabajo a 0,075%, que también debe ser almacenada con los mismos cuidados que la solución de reserva:

1,0 litro de solución a 0,075% = 75 ml solución de reserva (1,0%) + 925 ml de H<sub>2</sub>O.

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**

### **❖ Muestreo / Número de Semillas**

La muestra de trabajo debe ser representativa del lote y colectada de acuerdo a lo establecido por las Reglas para Análisis de Semillas (RAS).

Para el ensayo de germinación standard (en arena o rollo de papel) las RAS recomiendan la utilización de 400 semillas por muestra, (8 repeticiones

con 50 semillas cada una). Para el test de tetrazolio se sugiere la utilización de 100 semillas (2 sub-muestras con 50 semillas cada una), según lo sugerido por la AOSA (1983), Moore (1973) y França Neto *et al.* (1985; 1988). La necesidad de un menor número de semillas para el test de tetrazolio se debe a las condiciones homogéneas a las que son sometidas todas las semillas durante su preparación, lo que normalmente no ocurre durante la ejecución del test standard de germinación. Los resultados de este último test pueden ser afectados por diversos factores como: variaciones de humedad y temperatura comúnmente encontrados en los germinadores, diferencias de pH, de textura del papel, variaciones en la cantidad de agua adicionada al substrato y a la presencia de hongos, como *Phomopsis* spp. y *Fusarium semitectum*.

### **❖ Acondicionamiento**

Las semillas deben 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 deben permanecer en cámaras húmedas, o en bolsas plásticas, en germinador o en desecador, con agua en lugar de sílica gel.

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

En el caso de que sea necesaria mayor rapidez, puede ser utilizado el método alternativo, sugerido por Costa *et al.* (1998), realizándose acondicionamiento por 6 horas a 41°C, lo que representa ganancia de 10 horas en la preparación de las semillas, sin pérdida de precisión de los resultados.

### **❖ Coloración**

Después del acondicionamiento previo, las semillas deben ser colocadas, totalmente inmersas en la solución de tetrazolio (0,075%), en vasos de precipitación o vasos de plástico. Las semillas deben permanecer entre 35°C y 40°C por aproximadamente 150 a 180 minutos. Esta temperatura puede ser obtenida utilizándose una estufa o germinador. Es necesario resaltar que esta operación debe ser realizada en la oscuridad, debido a que la solución de tetrazolio es sensible a la luz (Lakon, 1949).

### ❖ Lavado de la muestra

Una vez que se alcanzó la coloración ideal, las semillas deben ser retiradas del ambiente a 35°C - 40°C, y a continuación son lavadas con agua común, deben ser mantenidas sumergidas en agua hasta el momento de la evaluación. En el caso de que las muestras no sean analizadas de inmediato, deben ser mantenidas en heladera, hasta 12 horas.

## 5

### INTERPRETACIÓN

Apesar de que no se utilizan instrumentos o reactivos caros, el método requiere que el analista de semillas tenga entrenamiento en la técnica. El analista deberá tener conocimientos básicos de las estructuras anatómicas de la semilla. Experiencia, intuición y juicio crítico son también necesarios para que pueda visualizar las diferentes formas de anomalías de las plántulas, que son revelados por el test del tetrazolio. La precisión del test depende del conocimiento de todas las técnicas y procedimientos involucrados en el test.

Según Moore (1985), existen tres objetivos básicos en la evaluación de las semillas: a) determinar el potencial de germinación de un lote de semillas en las condiciones más ideales posibles; b) clasificar las semillas en diferentes clases de viabilidad; y c) diagnosticar las posibles causas que provocaron la pérdida de viabilidad de las semillas. Los dos primeros 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. La habilidad del analista de semillas en reconocer los síntomas típicos de los diferentes tipos de daños que pueden ocurrir en las semillas es imperativo para la obtención del diagnóstico correcto de las causas de pérdida de viabilidad.

Para que la interpretación sea menos tediosa, se sugiere que sea efectuada bajo lupa de seis aumentos (6 X), con iluminación fluorescente. Las semillas deben ser analizadas una a una, seccionándolas longitudinalmente a través del centro del eje embrionario (Fig. 1), con el auxilio de una hoja de afeitar. En el

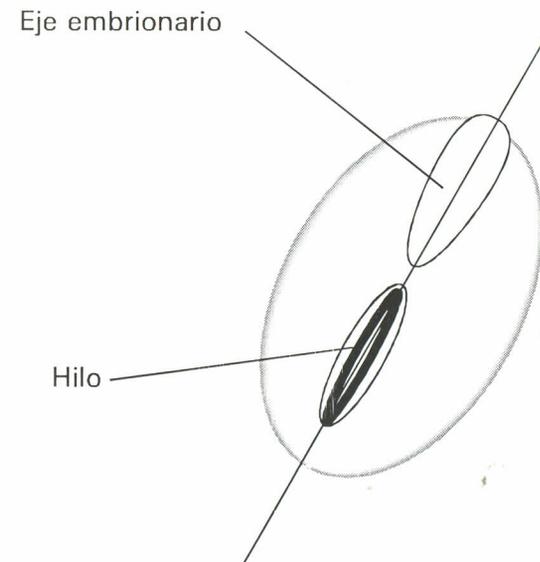


FIG. 1. Ilustración del corte de la semilla de soja, a través de la parte central del eje embrionario y del hilo.

caso de que el corte no sea bien centralizado, la evaluación de la condición del eje embrionario debe ser realizada en la mitad que contenga la mayor parte del eje, exponiéndose su cilindro central, después de los cortes adicionales.

Después de seccionadas las semillas, las dos mitades de las semillas son separadas, siendo el tegumento removido para que la superficie externa de los cotiledones sea expuesta. El analista debe observar la superficie externa e interna de los cotiledones, determinando todas las formas de daños.

Cuidados especiales se deben tomar durante la evaluación del eje radícula-hipocótilo, que es compuesto por dos tipos de tejidos: el **córtex** y el **cilindro central** (Fig. 2). El cilindro central es la estructura más crítica del eje radícula-hipocótilo. Generalmente, cuando ocurre algún daño en ese eje, pero no es lo suficientemente profundo para dañar el cilindro central, la semilla puede, entonces, ser considerada viable. En el caso que el daño alcance el cilindro central, la semilla será considerada no viable (Fig. 3).

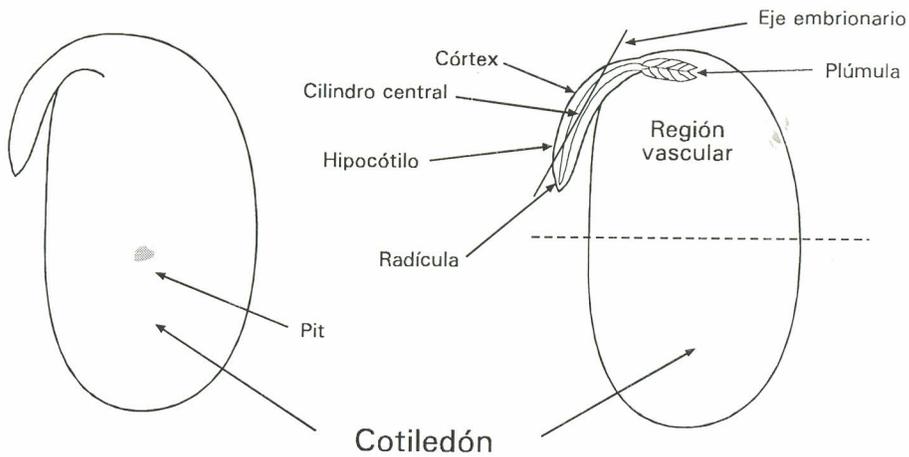


FIG. 2. Corte longitudinal de una semilla de soja, mostrando sus estructuras embrionarias.

Además del cilindro central, otra región crítica en la semilla de soja, que debe ser observada con mucha atención es la **región vascular** (Figs. 3 y 4). 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. En el caso que tal región sea afectada por algún daño, el vigor y/o la viabilidad de la semilla estarán comprometidos.

Otro factor que debe ser observado es la diferenciación de colores de los tejidos:

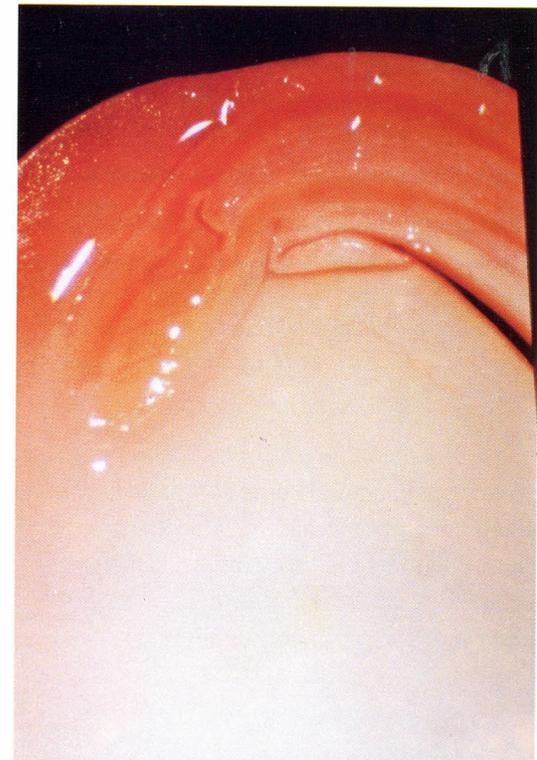


FIG. 4. Detalle de la región vascular y de la plúmula en semillas de soja vigorosas. Note la región meristemática y la diferenciación del córtex y del cilindro central del hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).

VIABLE

NO-VIABLE



FIG. 3. Corte longitudinal de dos semillas de soja, mostrando daños en el eje radícula-hipocótilo.

- ♦ rojo carmín: tejido vivo y vigoroso
- ♦ rojo carmín fuerte: tejido deteriorándose
- ♦ blanco lechoso: tejido muerto

De acuerdo con Moore (1985), tejidos vigorosos tienden a adquirir la coloración gradual e uniformemente (Figs. 5 y 6) y cuando embebidos, se presentan turgentes. 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. Cuando expuestos al aire, tales tejidos pierden la turgencia más rápidamente que los tejidos vigorosos. El blanco identifica tejidos muertos, que no presentan actividad enzimática necesaria para la producción de formazan. Tejidos muertos normalmente son flácidos y presentan coloración blanco-opaco, pero pueden ser amarillentos, cenizas o verdosos, principalmente cuando han sufrido daños causados por chinches. En raras oportunidades, 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, porque son flácidos y friables.

Se debe enfatizar que después del seccionamiento de las semillas, las superficies internas de los cotiledones son normalmente decoloradas (blancas), debido a la falta de difusión de la solución de tetrazolio hacia las capas más profundas (Fig. 6). Moore (1985) caracteriza los tejidos viables, que no adquieren color, como normalmente turgentes, brillantes, presentando tonalidades blanco-rosadas o blanco-amarillentas.

La posición y la extensión de los daños que ocurren en las semillas son características de importancia crucial para la correcta evaluación de las mismas y deben ser consideradas en combinación. Por ejemplo, una pequeña lesión causada por chinches, que afecta el hipocótilo, alcanzando el cilindro central, resultará en consecuencias más serias que una lesión de gran extensión, localizada en la mitad inferior de un cotiledón, lejos del eje embrionario.

### **5.1. Diagnóstico de las Causas del Deterioro de la Semilla de Soja**

Varios factores afectan la calidad de la semilla de soja, los principales, según Moore (1960, 1962a, 1973) y França Neto (1984) son: daños mecánicos,



FIG. 5. Patrón de coloración por tetrazolio en una semilla de soja muy vigorosa. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 6. Patrón de coloración por tetrazolio de la faz interna de una semilla de soja muy vigorosa. (Foto: J. B. França Neto).

deterioro causado por humedad, daños causados por chinches, daños por sequía y altas temperaturas, daños de secado y daños causados por heladas. Cada tipo de daño está asociado con lesiones características, que son descriptas resumidamente a continuación.

❖ **Daños mecánicos** (Figs. 7 a 12) resultan del impacto físico durante las operaciones de cosecha, trilla, secado, limpieza, transporte y siembra de las semillas de soja. Existen tipos de daño mecánico que son fácilmente identificados por el test de tetrazolio: rajaduras, presión y abrasión. El último es identificado por la presencia de lesiones de color rojo oscuro, en el caso de que hayan ocurrido recientemente, o por lesiones blancas con tejidos flácidos, si no son recientes. Un analista inexperto puede confundir el “pit”, una pequeña cavidad, (Fig. 2) con lesiones de daños mecánicos. El “pit” es una depresión en la superficie externa de los cotiledones, compuesto por un grupo de células especializadas, en oposición directa al “antipit” del tegumento, que es una camada de células en la superficie ventral del tegumento (Yaklich *et al.*, 1984, 1986).

❖ **Deterioro por humedad** (Figs. 12 a 19), según lo descrito por Moore (1973), França Neto (1984), Pereira y Andrews (1976), resulta de la exposición de las semillas de soja a ciclos alternados de condiciones húmedas y secas en la fase final de maduración, antes de la cosecha. Tales daños presentan mayor magnitud, en ambientes calientes, típicos de regiones tropicales. Semillas con deterioro por humedad presentan arrugas características en los cotiledones, en la región opuesta al hilo, o sobre el eje embrionario. Después de la coloración, las semillas pueden presentar lesiones de coloración roja intensa o blanca sobre los tejidos embrionarios adyacentes a las arrugas. Frecuentemente, estas lesiones están asociadas con la infección provocada por ciertos hongos. Las lesiones pueden ser profundas y en el caso que el cilindro central se encuentre dañado, o más del 50% de los tejidos de reserva de los cotiledones estuvieren deteriorados, la semilla es considerada no viable. El deterioro por humedad presenta una característica muy típica, que es la simetría de las lesiones en ambas mitades de la semilla (Figs. 13 y 14).

❖ **Daños provocados por chinches** (Figs. 20 a 22): las chinches pueden afectar seriamente la calidad de la semilla de soja. Entre las diferentes especies, la

chinche verde *Nezara viridula* (L.) presenta su ocurrencia generalizada en la mayor parte de las regiones productoras de soja (Turnipseed e Kogan, 1976). Otras especies, como *Piezodorus guildinii* (Westwood) y *Euschistus heros* (Fabricius), pueden también causar serios daños a las semillas. Al alimentarse de las semillas de soja, las chinches inoculan la levadura *Nematospora coryli* Peglion (Sinclair, 1982) que irá a colonizar los tejidos, resultando en severas reducciones de vigor y de viabilidad (Bowling, 1980; Villas Bôas *et al.*, 1982). Esa infección provoca lesiones características, circulares, muchas veces arrugadas y profundas (Fig. 6). Los tejidos lesionados mueren y se tornan flácidos, presentando la coloración típica blanquecina, a veces verdosa, amarillenta o ceniza. Un anillo de coloración rojo intenso separa, en la mayoría de los casos, los tejidos muertos de los vigorosos (Fig. 22). Lesiones múltiples pueden ocurrir en una única semilla y en el caso que ocurra sobreposición de las mismas, el síntoma circular típico no será distinguible. Con frecuencia, una pequeña perforación causada por el insecto puede ser observada en el centro de las lesiones circulares. Puntos deprimidos y profundos pueden ocurrir, como resultado de la inoculación del hongo *N. coryli* en los tejidos centrales de las semillas. Estas lesiones no siempre pueden ser observadas en la superficie externa de las semillas.

❖ **Daños por sequía y altas temperaturas** (Fig. 23) pueden ser observados en semillas de algunos cultivares de soja, cuando ocurren altas temperaturas (superiores a 30°C) asociadas con períodos de sequía, durante la fase de llenado de los granos. Los síntomas son variables, la lesión típica puede ser caracterizada por la presencia de una depresión en los cotiledones hasta la formación de arrugas en toda la semilla. Algunas semillas producidas bajo estas condiciones de “stress” pueden tornarse impermeables al agua. Semillas con síntomas superficiales de ese tipo de daño (pequeñas depresiones), después de la tinción, pueden presentar lesiones rojo oscuras o blancas que pueden ser confundidas con el deterioro por humedad. La constatación de esas depresiones en las semillas secas, por los analistas, evitará que ocurran interpretaciones erróneas de ese tipo. Semillas arrugadas, después de la tinción, pueden ser deformadas y presentar manchas rojo oscuras y blanquecinas, dispersas sobre los cotiledones, con mayor concentración en la región próxima al eje embrionario (Fig. 23). Los tejidos muertos se presentan flácidos y friables. Semillas severamente

arrugadas normalmente no germinan debido a la desintegración de los tejidos del eje embrionario y de las regiones superiores a los cotiledones.

❖ **Los daños de secado excesivo** son consecuencia del secado de las semillas a niveles de humedad abajo de 10,0%. Se caracterizan por la constatación de elevados índices de semillas de soja con grietas transversales en los cotiledones, siempre en la misma posición (Fig. 24). Cuando la semilla de soja se seca excesivamente, estará sujeta a quebrarse, de preferencia en esa posición, cuando expuesta a un impacto mecánico.

❖ **Daños por heladas** en semillas de soja son más comunes en regiones de clima templado. La expresión de ese tipo de daño depende del estadio de desarrollo de las semillas, de la temperatura y del período de exposición a condiciones de baja temperatura (Moore, 1973). Semillas inmaduras expuestas a heladas generalmente mueren y permanecen verdes. Por otro lado, semillas secas y maduras resisten bien a ese tipo de “stress”. Los tejidos dañados son identificados con el test de tetrazolio por la coloración de los ejes embrionarios. Además de un rojo más intenso se observa la presencia de un precipitado rojo que se acumula en el tegumento y en la solución de tetrazolio. Tejidos dañados por heladas también pueden presentar una coloración roja con tonos verdosos o marrones (Osorio, 1987).

Todas las lesiones mencionadas pueden ser intensificadas durante el almacenamiento. Tal intensificación dependerá de las condiciones de temperatura y de humedad relativa del aire en el lugar donde se almacenan las semillas. Daños mecánicos, principalmente los de abrasión y deterioro por humedad son las formas de daño que más comúnmente se intensifican en el almacenaje, pudiendo resultar en severas reducciones de germinación y vigor, principalmente en las fases finales del almacenaje.

En una semilla pueden ocurrir más de un tipo de daño (Fig. 12). Otras formas de daño pueden también deberse al envejecimiento de la semilla o a la ocurrencia de condiciones inapropiadas durante el almacenaje. Condiciones calientes y húmedas durante el almacenamiento resultarán en deterioro severo. En el test de tetrazolio, los síntomas iniciales de deterioro por almacenaje inapropiado pueden ser confundidos con señales de deterioro por humedad. En este caso, el diagnóstico más preciso de la causa del deterioro puede ser obtenido

con la ejecución de un test de patología de semillas, por ejemplo el test del papel de filtro (“blotter test”). La constatación de altos índices de hongos de almacenaje, con *Aspergillus flavus* o *Penicillium* spp., caracterizan problemas de almacenamiento; elevada infección por hongos de campo, como *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., o *Cercospora kikuchii*, caracterizan los daños a campo.

La caracterización de los factores que afectan la calidad de la semilla de soja puede parecer compleja inicialmente. Sin embargo, con entrenamiento y experiencia, el analista de semillas puede reconocer y diferenciar con facilidad los síntomas.

## 5.2. Identificación de los Niveles de Viabilidad

El test de tetrazolio se basa en el análisis de la condición de cada semilla individualmente. Cada semilla es clasificada como viable o no y las formas de daño son anotadas. Moore e Smith, citados por Copeland *et al.*, (1959) y por Moore (1961, 1962b, 1967), definieron un sistema de clasificación para semillas de maíz y de soja, donde cada semilla era clasificada en clases de 1 a 5, en el caso de ser viables, y de 6 a 8, si eran no viables. La presencia, la localización y el tipo de daño, además de las condiciones físicas de las estructuras embrionarias, son utilizadas en ese sistema de clasificación. Este método fue modificado y descrito en detalles para ser aplicado a semillas de soja por França Neto *et al.* (1985, 1988), como se detalla a continuación.

Los aspectos presentados en las ilustraciones son considerados los más comunes, de acuerdo con la experiencia de los autores. Cada diagrama representa una semilla que fue seccionada longitudinalmente. La superficie externa de la semilla es ilustrada a la izquierda y la interna a la derecha.



FIG. 7. Semillas de soja con lesiones típicas causadas por daños mecánicos. A la izquierda semilla con daño latente (por abrasión). Derecha: daño inmediato (semilla trincada). (Foto: J. B. França Neto).

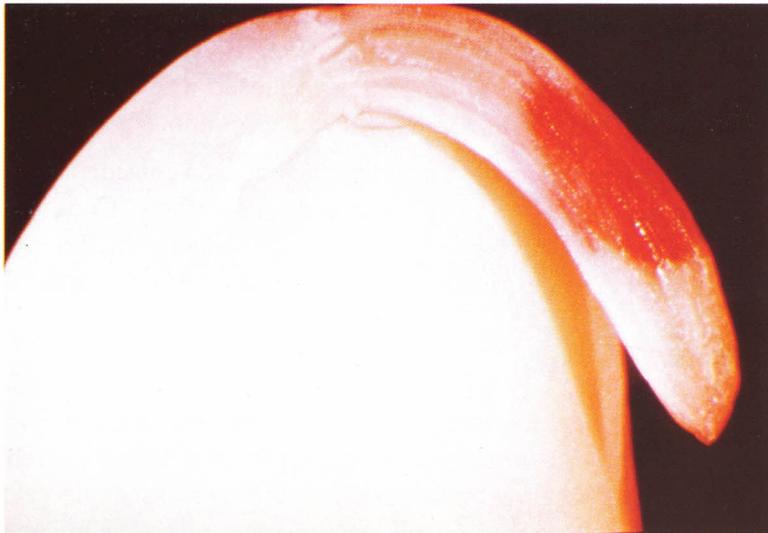


FIG. 8. Daño mecánico crítico en el eje radícula-hipocótilo, alcanzando el cilindro central. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 9. Daño mecánico por abrasión sobre el hipocótilo, alcanzando el cilindro central. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 10. Daño mecánico afectando totalmente los tejidos meristemáticos en la región de la plumula. (Foto: J. B. França Neto).

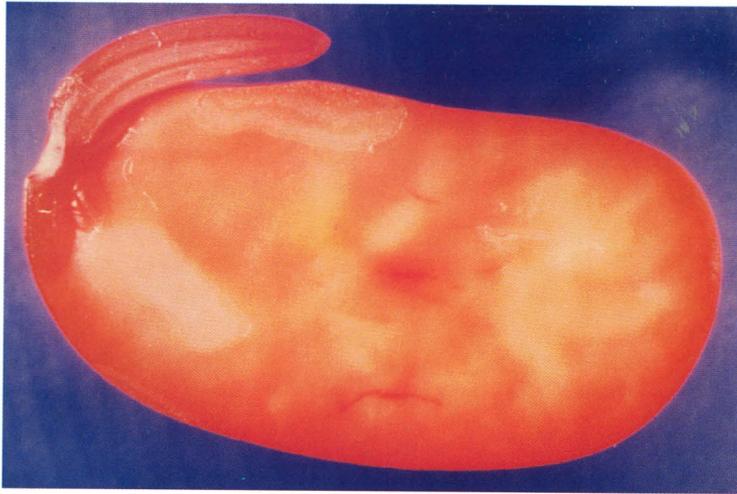


FIG. 11. Pequeño daño mecánico afectando la región vital del cilindro central y la región meristemática de la plumula. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 12. Semilla de soja con lesiones típicas de daño mecánico en la radícula y cotiledones y de deterioro por humedad superficial en el córtex del hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 13. Semilla de soja con lesión típica de deterioro por humedad. Note a simetría das lesiones e os síntomas no eje embrionário. (Foto: J. B. França Neto).

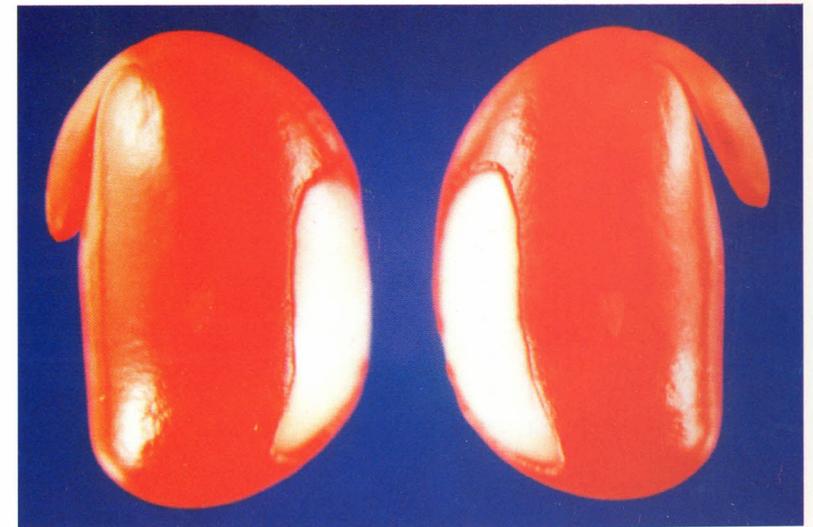


FIG. 14. Semilla de soja con lesión típica de deterioro por humedad. Note la simetría das lesiones en los cotiledones. (Foto: J. B. França Neto).

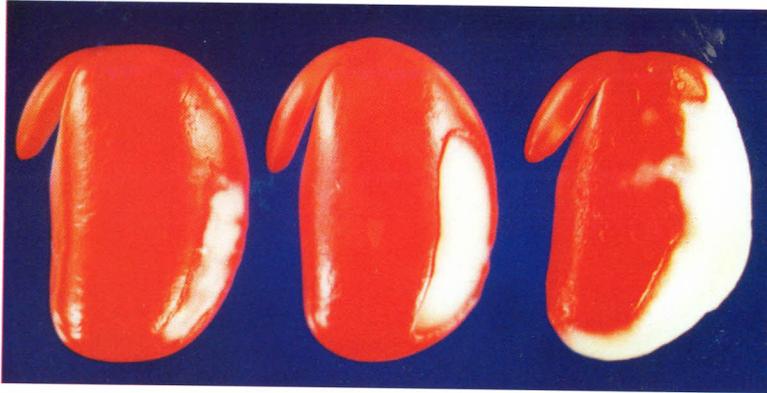


FIG. 15. Semillas de soja con tres niveles de deterioro por humedad. (Foto: J. B. França Neto).

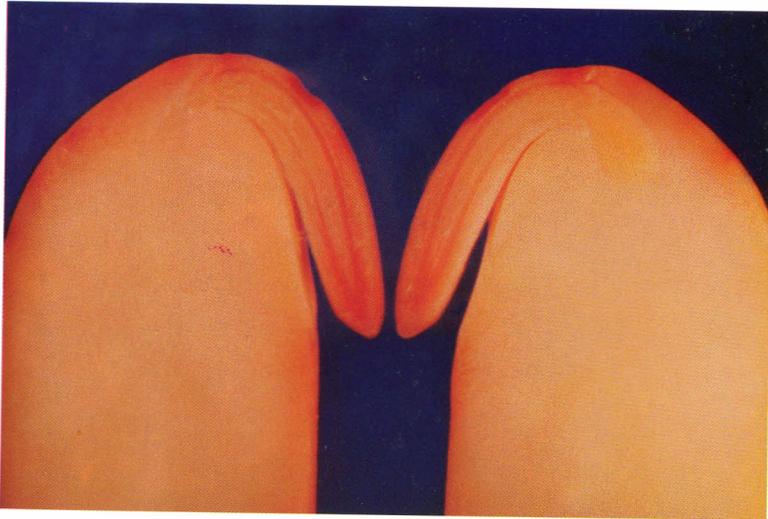


FIG. 16. Semilla de soja con lesión superficial de deterioro por humedad en el córtex del hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 17. Lesiones evidentes de deterioro por humedad en condiciones de campo en semillas de soja. (Foto: J. B. França Neto).

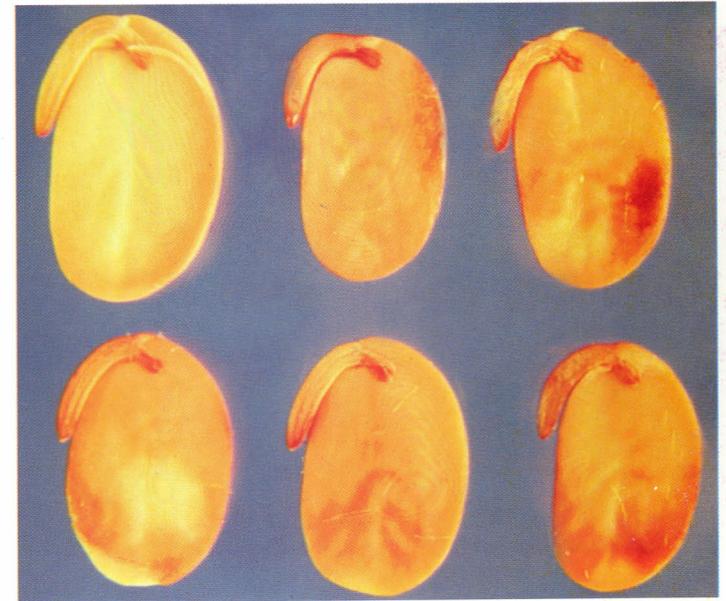


FIG. 18. Semillas de soja con plúmulas coloridas en función del deterioro intenso en el campo. (Foto: J. B. França Neto).

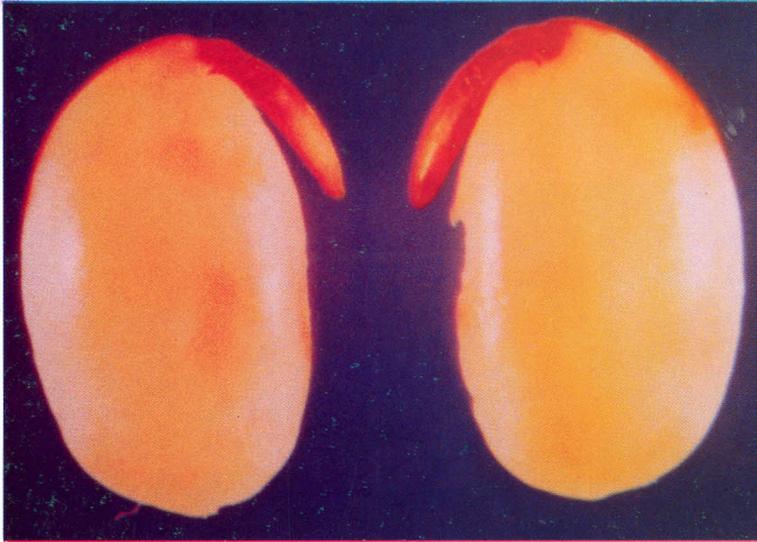


FIG. 19. Semillas de soja clasificadas en la Clase 8, en función del deterioro intenso por humedad. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 20. Semillas de soja con lesiones típicas de daños provocados por chinches sobre los cotiledones. (Foto: J. B. França Neto).

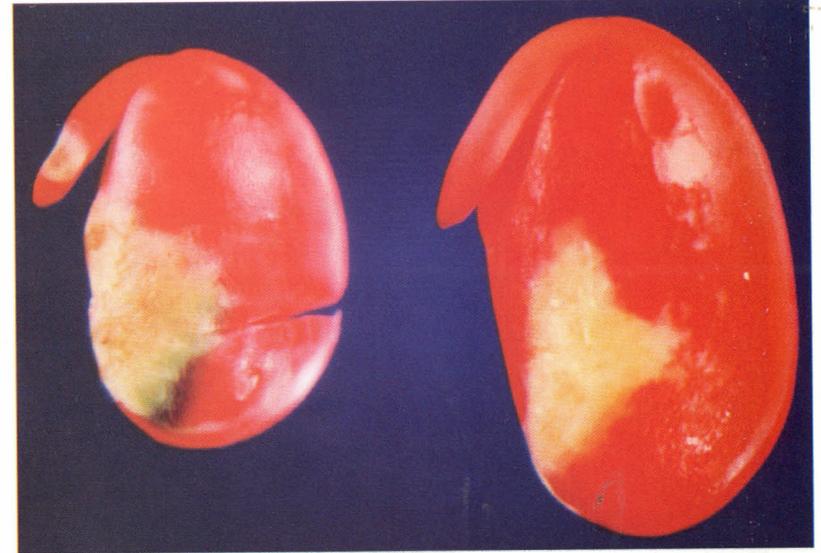


FIG. 21. Semillas de soja con lesiones resultantes de daños provocados por chinches en los cotiledones y en el eje embrionario. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 22. Lesión típica de daño causado por chinches en los cotiledones. Observe la forma circular de la lesión y el anillo de tejido deteriorado (rojo intenso) al alrededor del tejido muerto. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 23. Semillas de soja con lesiones causadas por altas temperaturas y deficiencia hídrica durante a fase de llenado de granos. Arriba: semillas secas; abajo: semillas coloreadas. (Foto: J. B. França Neto).

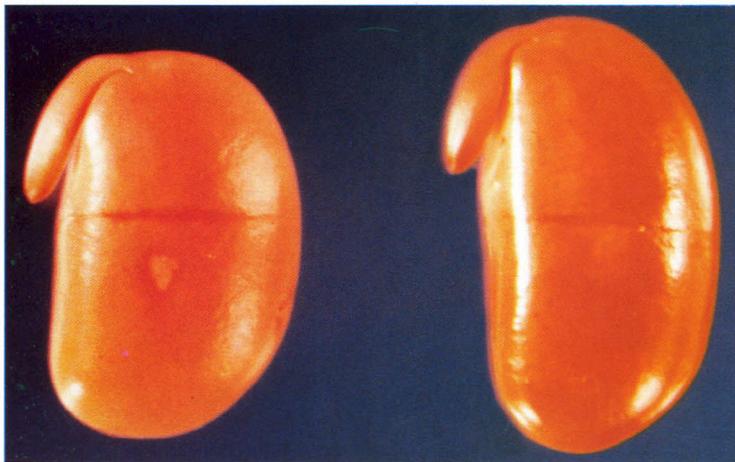
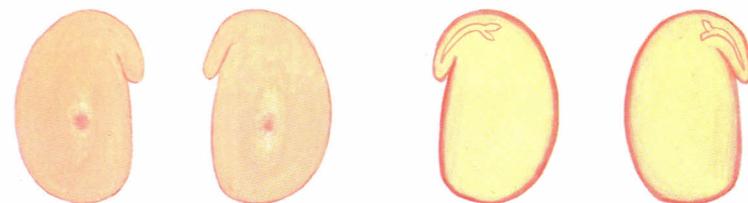
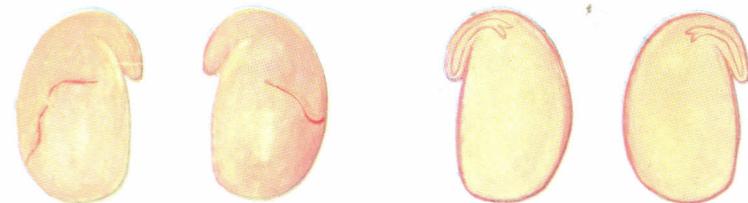


FIG. 24. Semillas de soja con daño característico de secado excesivo: los lotes con el problema presentan altos índices de semillas con trincas en la misma posición transversal de los cotiledones. (Foto: J. B. França Neto).

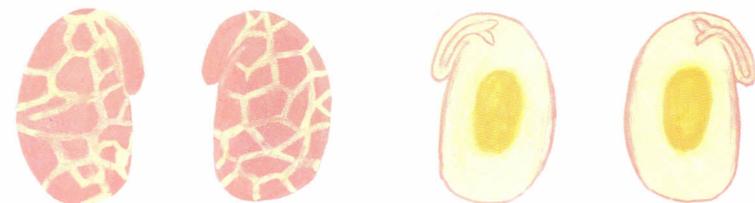
**CLASE 1 (vigor muy elevado)**



1a. Coloración uniforme y superficial, indicando penetración lenta de la sal de tetrazolio; parte interna (entre los cotiledones) no presentando coloración, salvo en el borde, todos los tejidos con aspectos normales y firmes.



1b. Casi igual al anterior, excepto por la presencia de fajas o estrías superficiales (un a dos décimos de milímetro de profundidad) más intensamente coloreadas, una o dos por cotiledón, debido al deterioro por humedad.

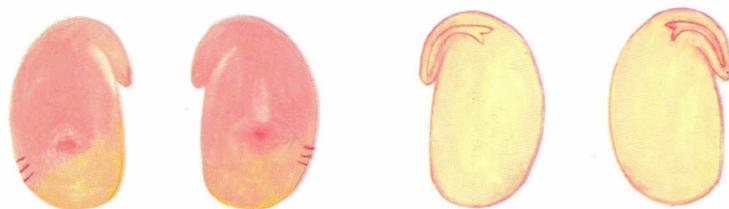


1c. Semilla con aspecto de mosaico (Fig. 25) debido a un proceso lento de imbibición; los tejidos son firmes y en la faz interna de los cotiledones generalmente aparece una cavidad central de color amarillento, indicando insuficiente absorción de agua. Puede ocurrir en semillas semi-permeables. Tales síntomas pueden también estar relacionados a una imbibición inadecuada durante el acondicionamiento, o debido al uso de semillas con un tenor de humedad muy bajo.

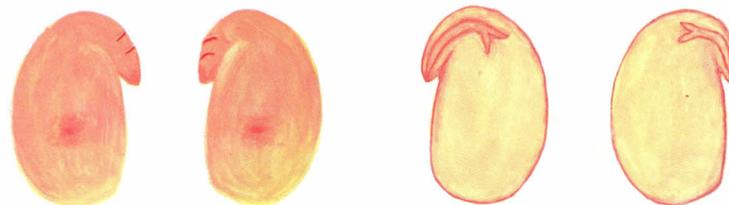


FIG. 25. Semilla de soja con aspecto de mosaico debido a un proceso inadecuado de imbibición. (Foto: F. C. Krzyzanowski).

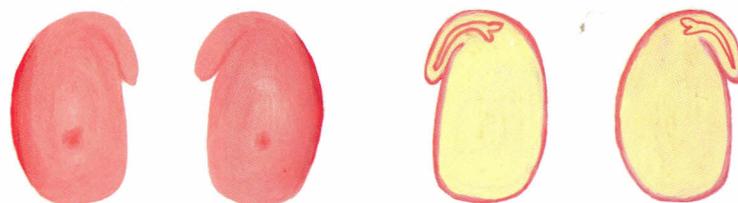
**CLASE 2 (alto vigor)**



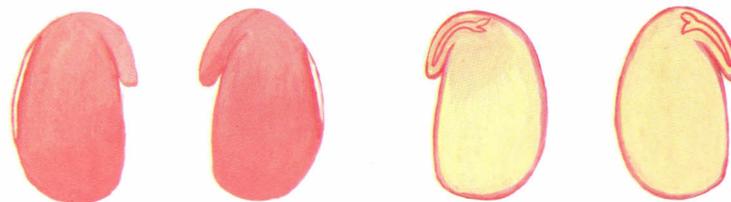
2a. Pequeñas estrías localizadas en los cotiledones en la región opuesta al eje embrionario, las cuales son originadas por presión del tegumento sobre los cotiledones causado por sucesivas hidrataciones (expansión) y deshidrataciones (contracción) en proporciones diferentes. Esto resulta en tegumento arrugado y lesiones, en los cotiledones, donde la respiración y la actividad enzimática son más intensas, evidenciándose el color rojo carmín fuerte. Las estrías no deben ser superiores a 0,5 mm de profundidad; la parte interna de los cotiledones se presenta como en 1a. Los daños en los cotiledones son generalmente simétricos.



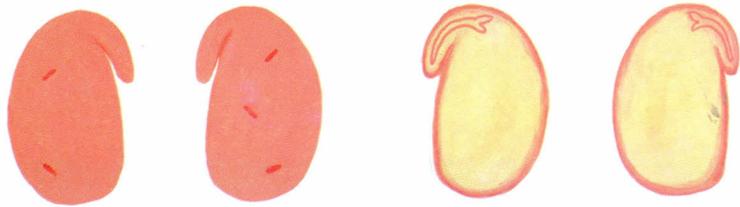
2b. Pequeñas estrías debidas al mismo motivo mencionado en el ítem 2a, pero localizadas sobre el eje embrionario. Estas estrías son superficiales, no se observan alteraciones internas, como en el ítem 1a. Los daños en los cotiledones son generalmente simétricos.



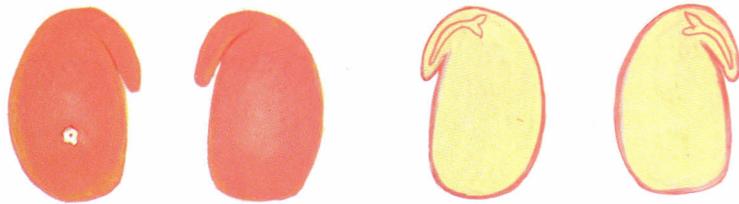
2c. Áreas de coloración mas intensa, no mayor que la de la ilustración, probablemente debido a la confluencia de pequeñas estrías (2a), formando una faja continua. La parte interna de los cotiledones se presentan como en 1a. Los daños en los cotiledones son generalmente simétricos.



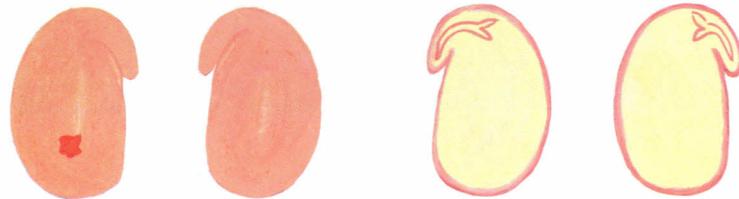
2d. Áreas del tejido sin coloración (blanco lechoso) por lo tanto, muerto, no mayor que el de la ilustración. La parte interna de los cotiledones como en el ítem 1a. Todas las lesiones referidas en los ítems 2a y 2d, en general, son simétricas en los dos cotiledones, siendo esta una característica utilizada para diferenciar daños debido al arrugamiento del tegumento de otros tipos de daño.



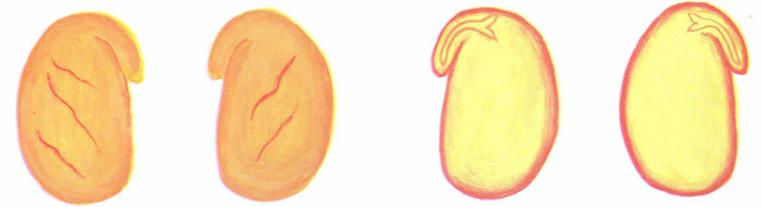
2e. Pequeños daños mecánicos sobre la superficie externa de los cotiledones y con una profundidad máxima de 0,5 mm. La superficie interna de los cotiledones se presenta como en 1a.



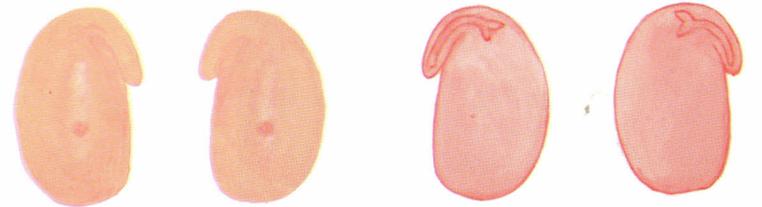
2f. Daños debidos a picadura de chinches, con el área total no mayor que la mostrada en la ilustración y profundidad máxima de 0,5 mm. Su localización debe estar alejada de la región vascular (esto es, abajo de una línea imaginaria, pasando transversalmente por la mitad del cotiledón). La región afectada se presenta más o menos necrosada (tejido muerto, coloración blanquecina, de aspecto pulverulento, a veces con la señal de la punción bien visible, otras veces no). Superficie interna de los cotiledones como en 1a.



2g. Daño idéntico al anterior pero con la región de las punciones sin necrosis. El aspecto es arrugado, de coloración rojo carmín fuerte, sin partes blanquecinas. Este tipo de lesión es característico de picadas que probablemente ocurren en un estado mas avanzado de maduración, cuando la semilla ya está en fase adelantada de deshidratación.



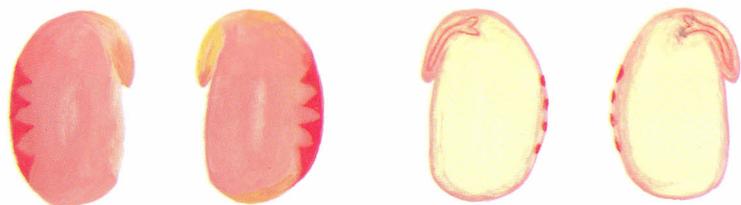
2h. Más que dos estrías por cotiledón (no profunda, como en 1b). Superficie interna de los cotiledones como en 1a.



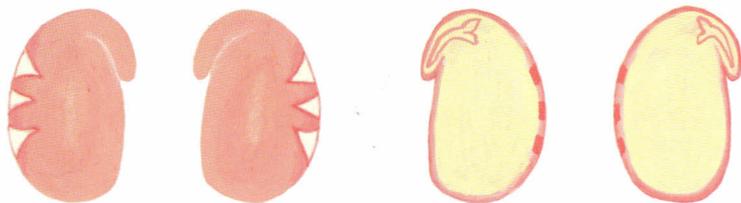
2i. Coloración de la superficie externa de los cotiledones como en 1a. La superficie interna de los cotiledones se presenta también con coloración uniforme debido a la penetración de la solución de tetrazolio a través de una herida del tegumento.

**Observación:** semillas clasificadas en las Clases 1 ó 2 no presentan daños en las superficies internas de los cotiledones.

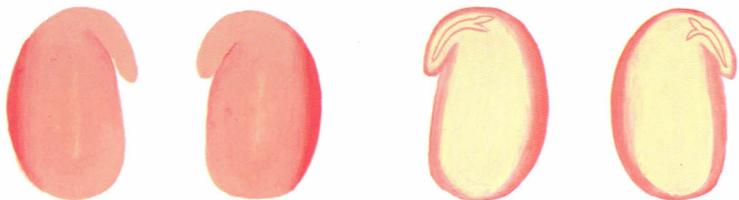
**CLASE 3 (vigor medio)**



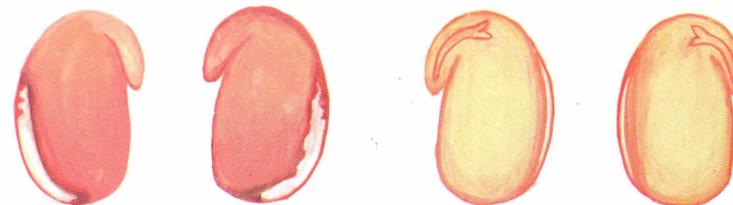
3a. Estrías de coloración roja carmín fuerte localizadas en los cotiledones, en la región opuesta al eje embrionario, con un área total no mayor que la representada en la ilustración. La superficie interna de los cotiledones puede presentar pequeñas áreas más oscuras, correspondientes a las estrías externas y con espesor máximo de 0,5 mm.



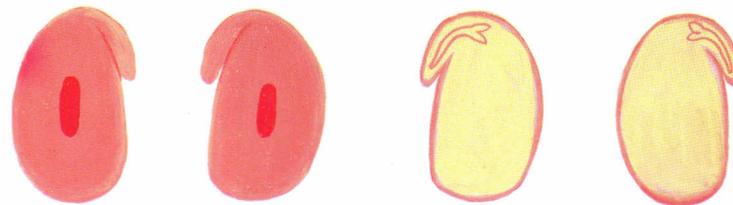
3b. Daño casi idéntico al anterior, pero con las estrías pudiendo presentar algunas áreas de coloración blanco-lechoso, indicando tejidos muertos. Superficie interna de los cotiledones como en 3a.



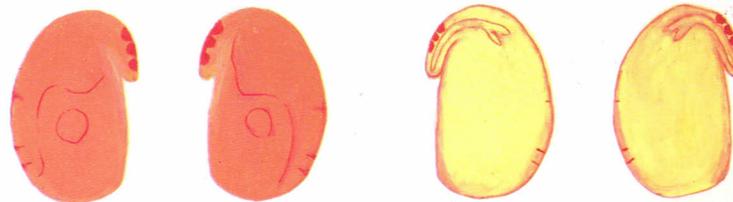
3c. Áreas de coloración más intensa, no mayores que las mostradas en la ilustración, probablemente debido a la confluencia de las estrías formando una faja continúa. La superficie interna de los cotiledones puede presentar, en correspondencia, una faja más oscura con espesor máximo de 0,5 mm.



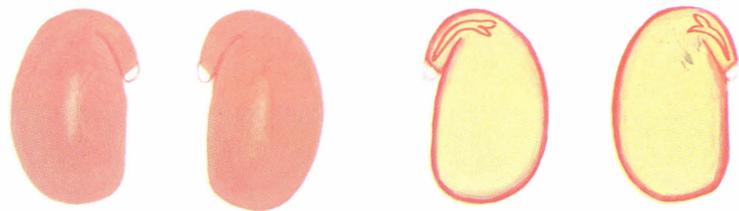
3d. Daño casi idéntico al anterior, pero la faja puede ser de tejido de coloración blanco-lechoso (tejido muerto) en un área no mayor que de la ilustración. Superficie interna con una faja de tejido muerto en un espesor máximo de 0,5 mm.



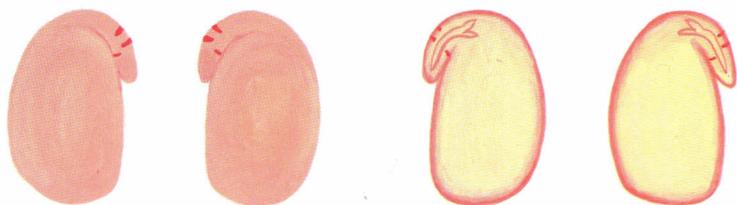
3e. Área de color rojo intenso en la superficie externa de ambos cotiledones no mayor que la mostrada en la ilustración y con profundidad máxima de 0,5 mm (daño mecánico). Superficie interna como en el ítem 1a.



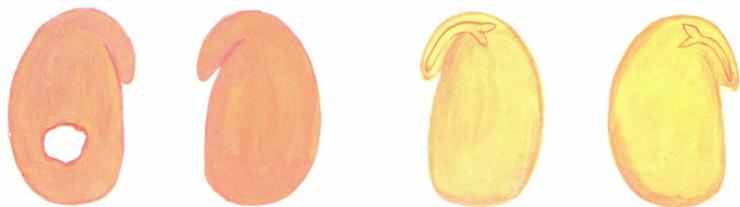
3f. Estrías localizadas en la superficie del eje embrionario sin profundizar más allá del córtex, i.e, sin afectar el cilindro central.



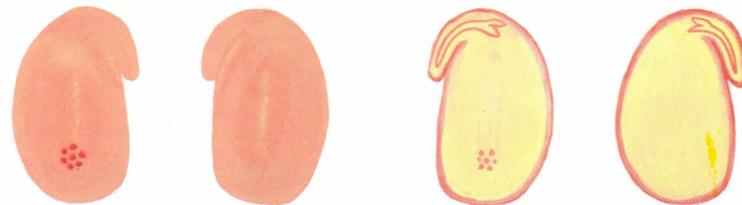
3g. Extremidad de la radícula mostrando coloración blanco-lechoso, indicando tejido muerto, sin afectar el cilindro central.



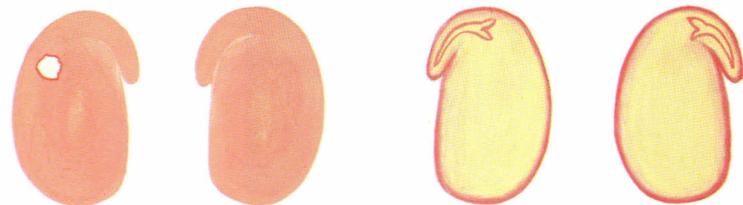
3h. Pequeñas fracturas localizadas en el eje embrionario no afectando, el cilindro central.



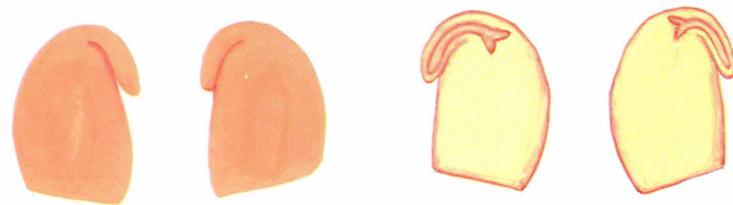
3i. Picaduras de chinches, con la parte central necrosada (tejido muerto, i.e, coloración blanco-lechoso, con aspecto pulverulento) o no, con área total no mayor que la que se presenta en la ilustración. El área lesionada no debe tener profundidad superior a 0,5 mm y debe estar localizada en la región abajo de una línea imaginaria pasando transversalmente por la mitad del cotiledón (región no vascular). Superficie interna de los cotiledones como en el ítem 1a.



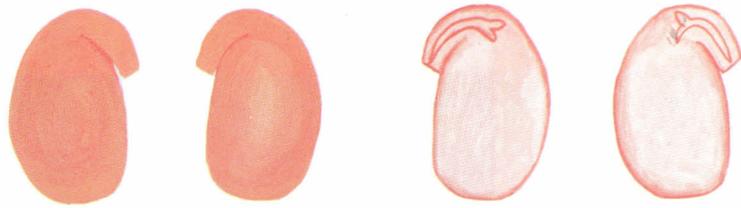
3j. Picaduras de chinches, con el área total no mayor que la mostrada en la ilustración, sin áreas necrosadas (muertas), localizadas abajo de una línea imaginaria pasando transversalmente por la mitad del cotiledón. Picaduras afectando la superficie interna de uno de los cotiledones, que se presentan arrugados con pequeñas puntuaciones rojas (áreas continuas de color rojo carmín acentuado o áreas necrosadas). Uno de los cotiledones con coloración superficial como en 2i.



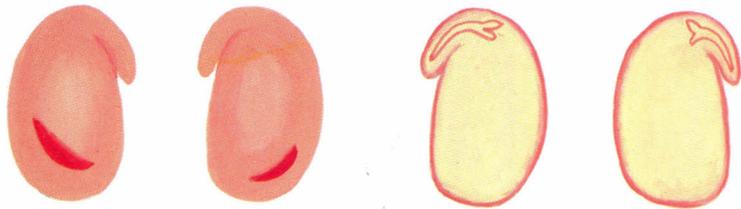
3k. Picaduras de chinches, con el área total no mayor que la representada en la ilustración, localizada arriba de una línea imaginaria que pasa transversalmente por la mitad de los cotiledones. La región lesionada no debe ser superior a 0,5 mm de profundidad y localizada de tal manera que no afecta la región por arriba de la línea imaginaria (región vascular).



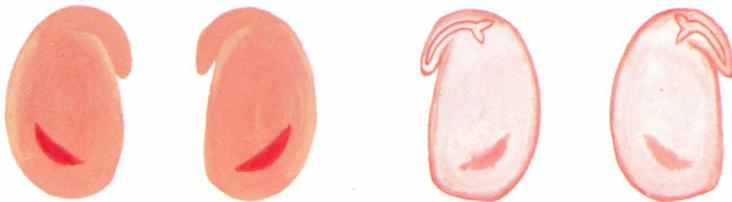
3l. Fractura de los cotiledones en la región opuesta al punto de unión del eje embrionario, en una extensión máxima como se observa en la ilustración. La superficie interna de los cotiledones se puede presentar como en 1a o 2i.



3m. Extremidad de la radícula fracturada, no obstante, sin afectar al cilindro central. La superficie interna de los cotiledones se puede presentar como en 1a o 2i.

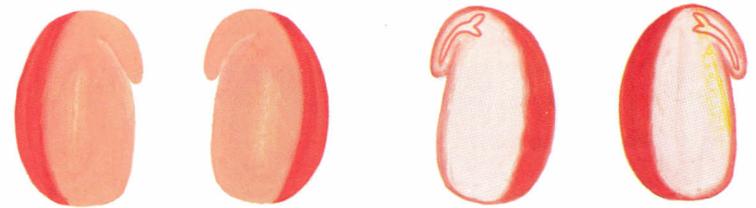


3n. Daños de origen mecánica con o sin tejido muerto, con profundidad máxima de 0,5 mm o sin afectar la región vascular. La superficie interna de los cotiledones como en 1a o 2a.

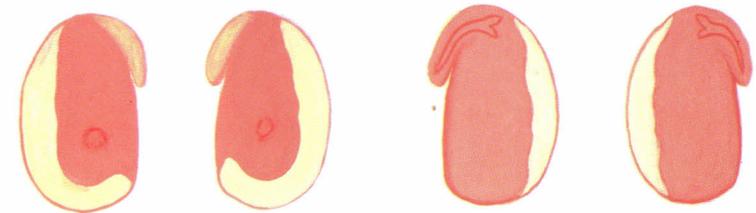


3o. Daños de origen mecánica localizados por debajo de la región vascular, afectando la superficie interna de los mismos como se observa en la ilustración.

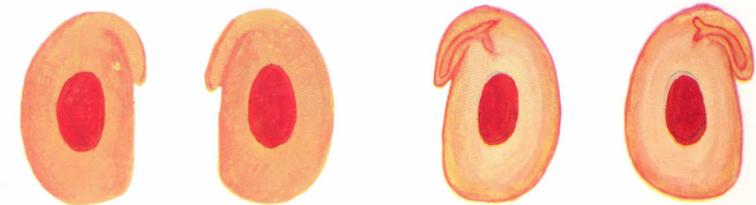
**CLASE 4 (vigor bajo)**



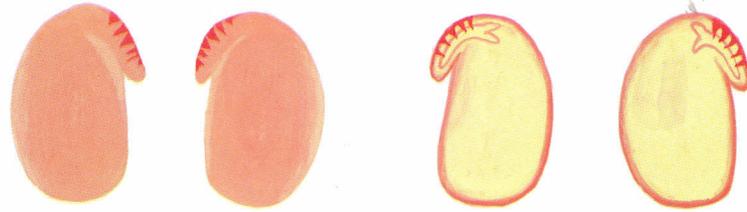
4a. Área de color rojo carmín fuerte en ambos cotiledones, cubriendo menos de la mitad de los mismos. La superficie interna también presenta área de coloración roja carmín fuerte. La región vascular, sin embargo no debe estar afectada.



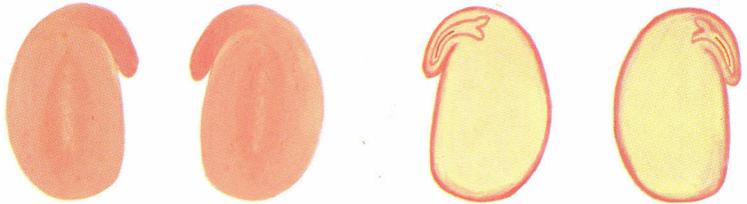
4b. Daño casi idéntico al anterior presentando, sin embargo, tejidos muertos (coloración blanco-lechoso).



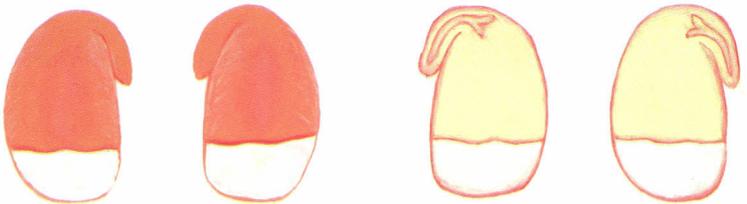
4c. Área de coloración roja carmín fuerte en el centro de los cotiledones (externa e internamente), afectando parte de la región vascular. Sin embargo, próximo al punto de unión, los vasos deben estar funcionales, permitiendo el transporte de las reservas de los cotiledones para el eje embrionario.



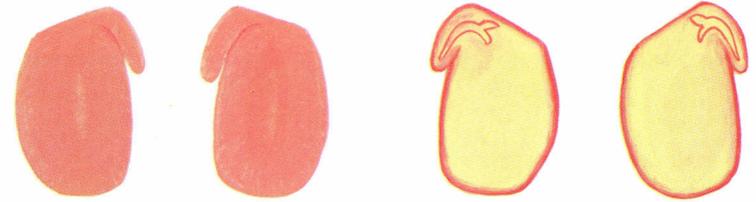
4d. Estrías localizadas sobre el eje embrionario afectando inclusive el cilindro central, sin embargo, con una extensión menor que la mitad de su espesor.



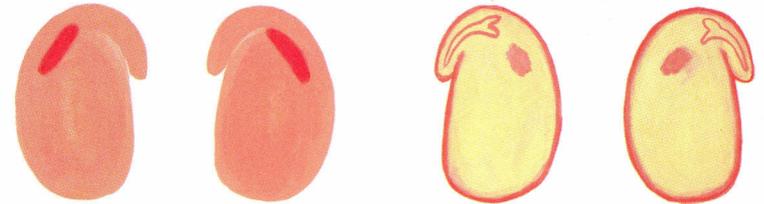
4e. Área de color rojo carmín fuerte en el eje embrionario pero con las estructuras del cilindro central y del córtex perfectamente definidas.



4f. Área de tejido muerto en una extensión menor que la mitad del área total de los cotiledones.



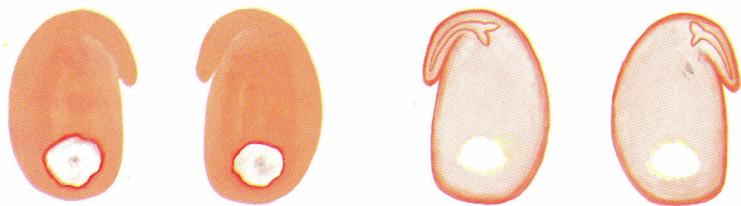
4g. Fractura de uno o ambos cotiledones en la región próxima al punto de unión, pero dejando la región vascular en gran parte intacta.



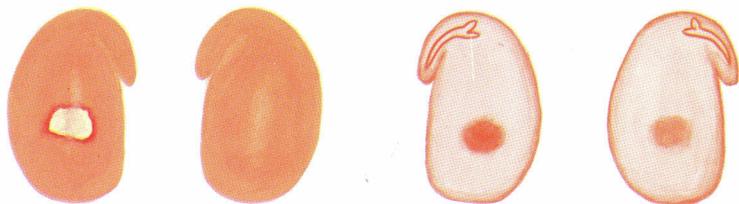
4h. Daños de origen mecánica en la región vascular de los cotiledones afectando la faz interna y parte de la región vascular. Sin embargo, los vasos próximos al punto de unión de los cotiledones con el eje embrionario, deben permanecer funcionales.



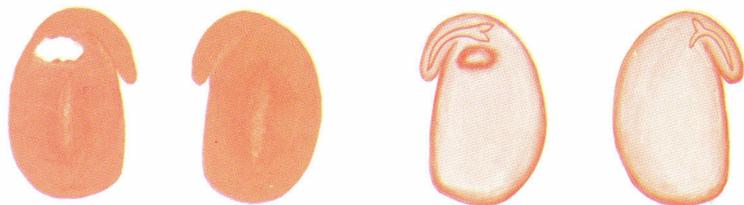
4i. Fracturas sobre el eje embrionario, afectando el córtex y el cilindro central, sin embargo, en una extensión menor que la mitad de su espesor.



4j. Daños debidos a picaduras de chinches con área necrosada (tejido muerto), alcanzando la parte interna de los cotiledones pero localizados por debajo de la región vascular.



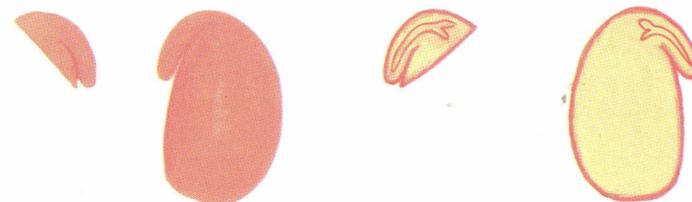
4k. Daños debidos a picaduras de chinches localizados en sólo un cotiledón, tornándolo prácticamente no funcional y afectando apenas levemente al segundo cotiledón en la faz interna, el cual se mantiene casi integralmente.



4l. Daños debidos a picaduras de chinches localizados en uno de los cotiledones, bloqueando completamente la región vascular, tornándose no funcional. La plántula dependerá, para su establecimiento, de las reservas de apenas un cotiledón.



4m. Fractura de más de la mitad de uno de los cotiledones.



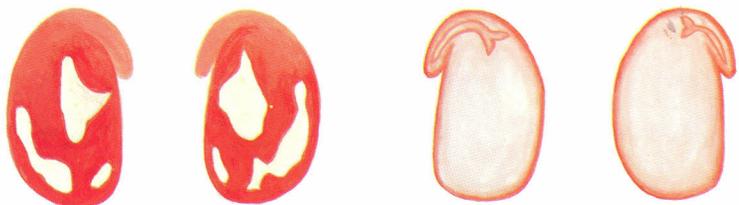
4n. Fractura de uno de los cotiledones dejando, intacto el eje embrionario (inclusive la plúmula).



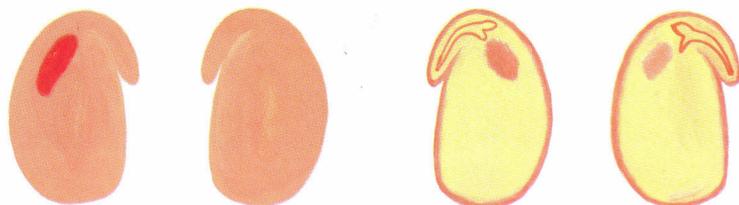
4o. Fractura de ambos cotiledones en una extensión inferior a la mitad de los mismos.

**CLASE 5 (vigor muy bajo)**

Las clases de vigor 5 y 6 (esta última no viable) son las de interpretación más problemática. Cuando la muestra analizada esta compuesta por un elevado porcentaje de semillas en estas clases, los resultados varían y pueden ser discrepantes.



5a. Semillas con ambos cotiledones mostrando un aspecto de mosaico, con áreas de coloración rojo carmín fuerte entremezcladas de áreas más claras y hasta muertas. Los tejidos afectados alcanzan una profundidad superior a 1 mm, pero inferior a la mitad del espesor de los cotiledones. La superficie interna de los cotiledones se presenta también con algunas áreas de color mas intenso. El eje embrionario se presenta bien definido con la estructura del córtex y del cilindro central bien visibles.



5b. Daños de origen mecánico, afectando totalmente la región vascular próxima al punto de unión de uno de los cotiledones y lesionando, parcial e internamente al área correspondiente del segundo cotiledón.



5c. Cotiledones fracturados de tal forma que es difícil saber si la parte remanente es mayor o menor que la mitad del total de la semilla.



5d. Daños debidos a chinches, afectando la región del punto de unión como en 5b.

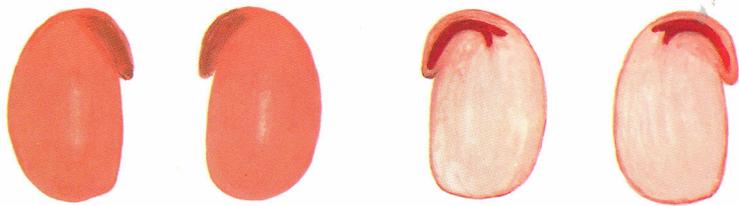
**CLASE 6 (no viable)**

Los daños de esta clase son semejantes a los de la clase 5 (ver ilustraciones), sin embargo, con mayor extensión de las áreas afectadas, lo que torna inviable a la semilla.

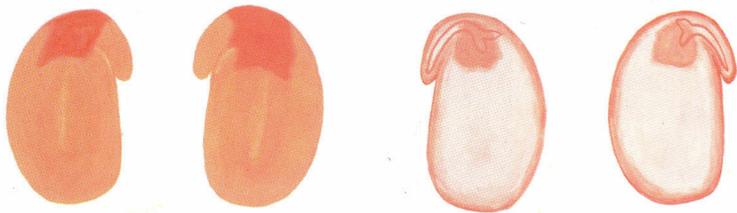
**CLASE 7 (no viable)**



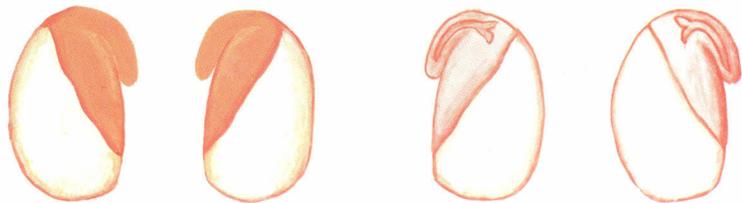
7a. Semillas con ambos cotiledones mostrando un aspecto de mosaico con áreas de un color rojo carmín fuerte entremezcladas de otras más claras y muertas. Los tejidos afectados alcanzan la mitad (o más) del espesor de los cotiledones, bloqueando completamente la región vascular.



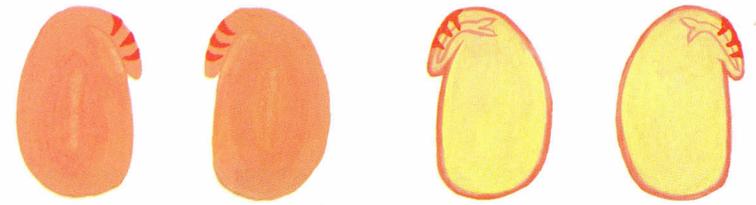
7b. Eje embrionario presentando color rojo carmín fuerte, distribuído por toda su extensión.



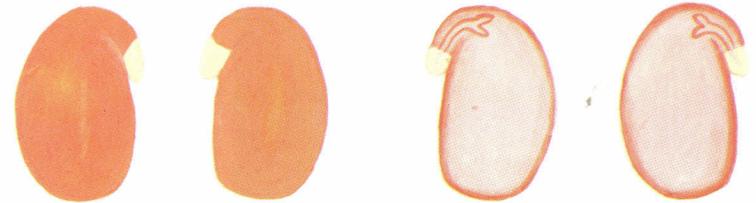
7c. Color rojo carmín fuerte en el punto de inserción de ambos cotiledones, alcanzando la región vascular. También puede ocurrir una coloración blanco lechoso (indicador de tejidos muertos).



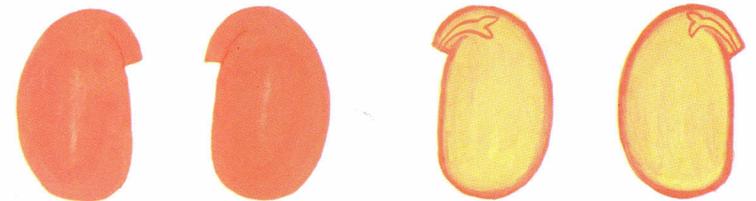
7d. Tejidos muertos de coloración blanco lechoso en una extensión superior a la mitad de la superficie total de la semilla.



7e. Estrías de color rojo carmín fuerte, sobre el eje embrionario, alcanzando una profundidad superior a la mitad del espesor del cilindro central.



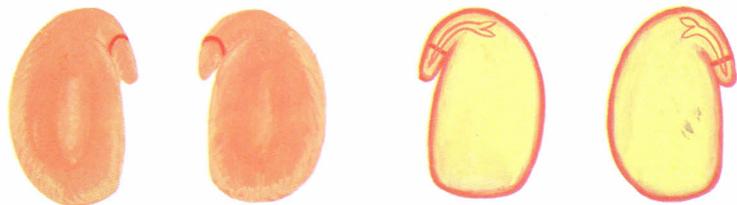
7f. Extremidad de la radícula presentando coloración blanco-lechoso (tejido muerto) alcanzando no solamente el córtex, sino también el cilindro central.



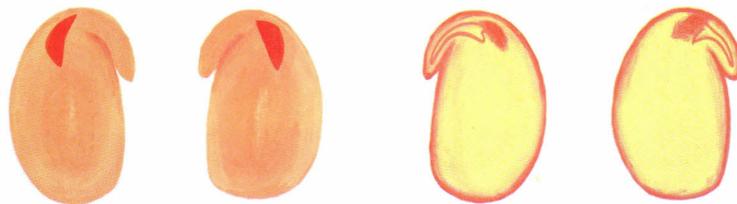
7g. Fractura de la extremidad de la radícula, afectando no solamente el córtex, sino también al cilindro central.



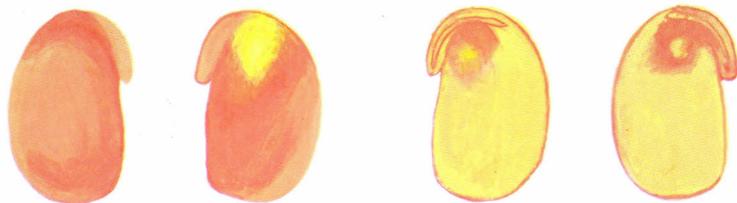
7h. Fractura de los cotiledones, siendo la parte remanente inferior a la mitad de la superficie total de la semilla.



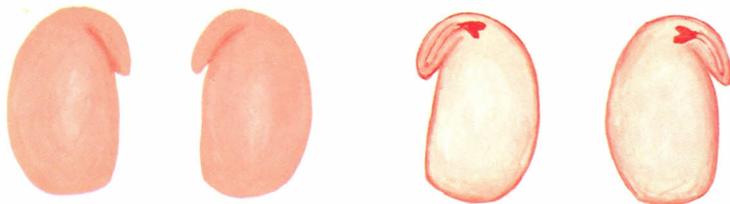
7i. Fractura del eje embrionario, seccionando el cilindro central.



7j. Daños de origen mecánico, afectando la región vascular de ambos cotiledones, próximos al punto de unión.



7k. Daños debidos a picaduras de chinches, afectando la región vascular de ambos cotiledones, próximos al punto de unión.



7l. Plúmula de color rojo carmín fuerte (deteriorada).

### CLASE 8 (semilla muerta)

Semilla totalmente muerta (blanca, a veces con tonalidad rosada), presentando tejidos flácidos.

❖ **Semillas Duras:** la constatación de semillas duras en la muestra puede requerir procedimientos especiales. Cuando una muestra presenta un bajo índice de semillas duras, o sea de 2% a 5%, las mismas pueden ser consideradas como viables y vigorosas, pudiendo ser anotadas en la Clase 1. Sin embargo, en el caso que el índice de semillas impermeables sea superior a tales valores, las mismas deben ser escarificadas con lija número “cero”, siendo nuevamente acondicionadas y coloreadas, realizandose a continuación la lectura de las mismas.

❖ **Anormalidades embrionarias:** algunas clases de embriones anormales pueden ser constatados con el test de tetrazolio (Figs. 26 y 27). Es común encontrar tres o más cotiledones, cotiledones deformados o doblados o con la localización inadecuada del eje embrionario. La mayoría de estas semillas no producirán plantas normales, conforme el ejemplo de la Fig. 27. Sin embargo, semillas con la anomalía ilustrada en la Fig. 26 pueden resultar en plantas normales, desde que no presenten daños serios en sus componentes vitales.

### 5.3. Utilización de la Ficha e Interpretación de los Resultados

Se sugiere la utilización de una ficha para la evaluación del test de tetrazolio, (ver apéndice). Después de la evaluación de cada semilla, se debe registrar en esa ficha el nivel de viabilidad y la identificación de los tipos de daños que puedan haber determinado el referido nivel. Se sugiere utilizar los siguientes símbolos:

- |                                    |                  |
|------------------------------------|------------------|
| χ : sin daño                       | ∟ : DM + DH      |
| ∟ : daño mecánico (DM)             | ∩ : DH + DC      |
| ∟ : daño causado por chinches (DC) | ∩ : DH + DM + DC |
| P : daño causado por humedad (DH)  |                  |
| ∟ : DM + DC                        |                  |



FIG. 26. Anormalidad de formación embrionaria en semillas de soja, detectada en el test de tetrazolio. (Foto: J.B. França Neto).



FIG. 27. Semilla de soja con anomalía embrionaria. Observe la posición anormal del eje embrionario. (Foto: J.B. França Neto).

**Observación Importante:** es común la ocurrencia de semillas clasificadas en los niveles de 6 a 8 (no viables) con dos o mas tipos de daños (Fig. 12). Cuando esto ocurra y apenas un tipo de daño sea responsable por la pérdida de viabilidad, tal daño debe ser marcado en la ficha con trazo más fuerte. Por ejemplo: una semilla presenta un daño mecánico que fracturó totalmente el eje embrionario, suficiente para causar la pérdida de viabilidad; esta misma semilla presenta también un deterioro por humedad en los cotiledones, lejos de las zonas vitales, daño que no es suficiente para que la semilla sea clasificada como no viable (Fig. 28). Al anotar esta semilla en la ficha como Clase 7 (no viable), se debe marcar el símbolo de daño mecánico con mayor intensidad que el símbolo de deterioro por humedad. Esto debe ser realizado siempre que situaciones semejantes ocurran, marcándose los daños, que efectivamente sean responsables por la pérdida de viabilidad, con mayor intensidad en la ficha y los daños más superficiales, no suficientes para resultar en pérdida de viabilidad, en intensidad normal, según ilustran las fichas en el Apéndice.

Después de la evaluación de todas las semillas (2 X 50), se determina el porcentaje de las clasificadas en cada nivel de viabilidad, calculando el potencial de germinación (sumatoria de los valores clasificados en los niveles 1 a 5) y el

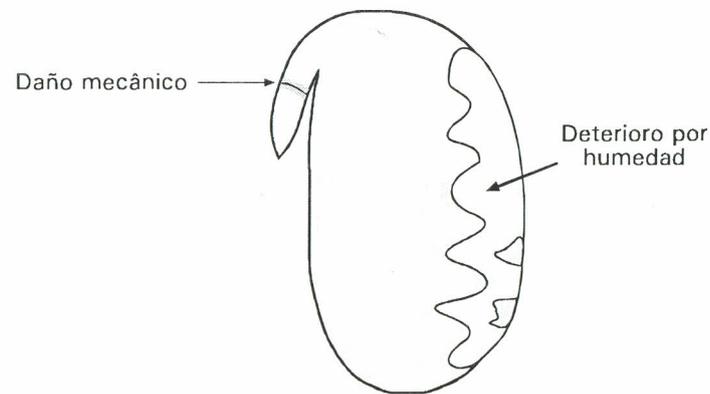


FIG. 28. Esquema de semente de soja com deterioração por umidade nos cotilédones e com dano mecânico que fraturou o eixo embrionário.

vigor (sumatoria de los niveles 1 a 3), según lo ilustrado en las fichas que fueron completadas a modo de ejemplo (ver Apéndice).

En el pie de página de la ficha se anotan los resultados de las dos submuestras, calculando las medias de vigor y viabilidad. Se calculan también los porcentajes de todos los tipos de daños (mecánico, deterioro por humedad y por chinches) anotados para los niveles (1-8) y (6-8). Para el nivel (1-8), se calcula, en cada submuestra, el número de semillas que presentaron señales de daños mecánicos, por ejemplo; se multiplica el total por "2", para obtener el porcentaje. Se hace lo mismo para la segunda submuestra, calculándose la media de esos dos valores. El mismo procedimiento se debe seguir para los otros tipos de daños.

Para el nivel (6-8), se hace lo mismo, sin embargo, en el caso de semillas que presentan más de un tipo de daño, se debe computar apenas aquellos daños que efectivamente contribuyeron a la pérdida de viabilidad, o sea, que fueron marcados con mayor intensidad. Ver las fichas del Apéndice para más informaciones.

**Necesidad de un nuevo análisis:** la muestra deberá ser analizada nuevamente cuando ocurran variaciones iguales o superiores al 10% entre los resultados de viabilidad obtenidos con las dos submuestras.

### 5.3.1. Interpretación de los Resultados

Los niveles de vigor pueden ser interpretados mediante la siguiente clasificación:

- ♦ vigor muy alto: igual o superior a 85%
- ♦ vigor alto: entre 84% y 75%
- ♦ vigor medio: entre 74% y 60%
- ♦ vigor bajo: entre 59% y 50%
- ♦ vigor muy bajo: igual o inferior a 49%

Los valores obtenidos para germinación deben recibir la misma interpretación que los alcanzados en el test de germinación.

Los porcentajes de daños mecánicos, deterioro por humedad y por chinches en los niveles 6 a 8, indican el porcentaje de pérdida de viabilidad ocasionado por los referidos daños, siendo considerados con relación a la calidad de la semilla como:

- ♦ sin restricción: inferior a 6%
- ♦ problemas serios: entre 7% y 10%
- ♦ problemas muy serios: superior a 10%

Si son diagnosticados problemas serios o muy serios por el analista de semillas mediante el test de tetrazolio, por ejemplo, un nivel elevado de daños mecánicos, o de daños por chinches, puede ser adoptada una medida de corrección, para mejorar la calidad de las semillas producidas. El productor de semillas puede ser orientado, por ejemplo, para ajustar el sistema de trilla de su cosechadora, o para mejorar el método de control de chinches.

Ejemplos de resultados obtenidos por el test de tetrazolio están ilustrados en la Tabla 1. El lote n° 1 presenta buen vigor y viabilidad, no presentando problemas serios relativos a ningún tipo de daño. El lote n° 2 tiene viabilidad de 82%, siendo el vigor (65%) clasificado como medio, debido principalmente a problemas serios (10%) con daños mecánicos. El lote n° 3 tiene 75% de viabilidad y vigor muy bajo (49%), debido a problemas serios de daños de chinches (9,0%) y muy serios (12,0%) de deterioro por humedad. Las fichas utilizadas para anotar los resultados de los lotes 1 a 3 se encuentran en el Apéndice.

**TABLA 1. Resultados del test de tetrazolio obtenidos en tres lotes de semillas de soja.**

Parámetro	Lote n° 1	Lote n° 2	Lote n° 3
Viabilidad	93	82	75
Vigor <sup>1</sup>	79	65	49
Daños Mecánicos	2 <sup>2</sup>	10	5
Deterioro por Humedad	4 <sup>2</sup>	5	12
Daños por Chinches	1 <sup>2</sup>	4	9

<sup>1</sup> Nivel de vigor: muy alto:  $\geq 85\%$ ; alto: 75 a 84%; medio: 60 a 74%; bajo: 50 a 59%; muy bajo:  $\leq 49\%$ .

<sup>2</sup> Porcentaje de pérdida de viabilidad causada por el respectivo tipo de daño.

Un ejemplo de la practicidad de la utilización de los resultados del test de tetrazolio fue ilustrado por Costa *et al.* (1987). Altos niveles de daños mecánicos fueron constatados en semillas de soja producidas en el estado de Paraná. Después de la constatación del problema, los productores fueron instruídos para mejorar el método de regular el sistema de trilla de la máquina cosechadora. En dos años, los niveles de daños mecánicos en semillas de soja fueron drásticamente reducidos a niveles inferiores al 6%.

## 6

### PRECISIÓN DE LOS RESULTADOS

Un buen nivel de precisión y confiabilidad del test de tetrazolio fue demostrado por França Neto *et al.* (1986). Varias muestras de semillas de soja fueron enviadas para 41 laboratorios de semillas, con instrucciones específicas para la ejecución de los siguientes tests: a) germinación “standard”, de acuerdo con las RAS (Brasil, 1976); b) envejecimiento acelerado mediante el método del “gerbox” (cajas plásticas de 12 x 12 x 3,5 cm); c) test de tetrazolio, como descrito por França Neto *et al.* (1985); y d) emergencia en arena. Después del test de standard de germinación, el test de tetrazolio fue clasificado como el más preciso, superando los otros dos tests evaluados.

En condiciones normales, los resultados de viabilidad obtenidos en los ensayos de germinación y de tetrazolio deben ser semejantes, permitiendo diferencias de hasta 5% entre los mismos. No obstante, pueden ocurrir discrepancias mayores entre los resultados, siendo explicadas por una, o varias, de las siguientes razones: a) diferencias de muestreo; b) técnicas inapropiadas en el test de germinación; c) técnicas inapropiadas en el test de tetrazolio; d) presencia de semillas duras en las muestras; e) uso de lotes de semillas con vigor medio o bajo; f) presencia de semillas con elevados índices de daños mecánicos o con daños causados por chinches; g) semillas infectadas por hongos, tales como *Phomopsis* spp., *Fusarium semitectum*, o *Colletotrichum truncatum*.

Lakon, citado por Gadd (1950, p. 253), mencionó que cuando había diferencias entre los resultados, al comparar el test de tetrazolio con el de germinación “standard”, el problema estaba siempre ligado al test de germinación.”

## 7

### VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL TEST

#### 7.1. Ventajas

- el test no sufre la interferencia de diversas condiciones que pueden afectar el test “standard” de germinación;
- centraliza la atención en las condiciones físicas y fisiológicas del embrión de cada semilla en forma individualizada;
- permite la rápida evaluación de la viabilidad y del vigor (8 horas para soja);
- permite la identificación de diferentes niveles de viabilidad;
- proporciona al diagnóstico las causas de la reducción de la viabilidad de las semillas;
- los instrumentos necesarios son simples y de bajo costo; y
- un analista con experiencia puede tener un rendimiento de cuatro a cinco muestras (2 x 50 semillas) por hora de trabajo.

#### 7.2. Limitaciones

- requiere entrenamiento especial sobre la estructura embrionaria de la semilla y sobre técnicas de interpretación;
- es relativamente tedioso, ya que las semillas son evaluadas una a una, requiriendo, de esta forma, experiencia y paciencia;
- aunque es un test relativamente rápido, consume mayor número de horas hombre que el test de germinación “standard”;
- no muestra la eficacia de tratamientos químicos y tampoco los daños que puedan causar; y
- por las características del test, requiere del analista la capacidad de decisión.

Mason *et al.* (1982) señaló que el test de tetrazolio no fue eficaz en la detección de daños mecánicos recientes. Tal limitación puede ser fácilmente superada con la utilización de una solución de tetrazolio de menor concentración, o sea, 0,075%, como sugerido anteriormente.

## 8

### CUANDO APLICAR EL TEST DE TETRAZOLIO

El test puede ser aplicado en todas las etapas del sistema de producción de semillas, con la finalidad de mejorar el control de calidad, ya sea en la cosecha, en la recepción, antes y después de la limpieza, en el secado, durante el almacenaje y antes de la siembra.

Este test ha sido utilizado con éxito antes de la cosecha. Aproximadamente uno o dos días antes de la cosecha, se hace un muestreo de plantas de un determinado campo de producción, realizándose la trilla de las semillas manualmente. Mediante la evaluación de estas semillas por el test de tetrazolio, se puede verificar los niveles de vigor, viabilidad y la ocurrencia de daños de chinches y de deterioro por humedad. Dependiendo de los resultados obtenidos, podrá decidirse con seguridad si el campo en consideración posee calidad para ser cosechado como semilla o como grano. Esto puede significar una economía significativa para los productores de semillas, en lo que se refiere a evitar gastos innecesarios de transporte, secado, procesamiento, embalaje y almacenamiento de lotes de semillas de baja calidad.

### OBSERVACIÓN FINAL

Las informaciones vertidas en este manual fueron ilustradas en la película "DIACOM: diagnóstico completo de la calidad de la semilla de soja. 1. Metodología del test de tetrazolio" (DIACOM, 1994), disponible, en portugués, en el Sector de publicaciones de la Embrapa Soja.

## 9

### REFERENCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. The Seed Vigor Test Committee. **Seed vigor testing handbook**. [S.l.], 1983. 88p. The Handbook on Seed Testing, Contribution, 32).
- BOWLING, C.C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybeans. **Journal of Economic Entomology**, College-Park, v.73, p.1-3, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1976. 198p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.26, p.686-696, 1961.
- COPELAND, T.G.; BRUCE, C.F.; MIDYETTE Jr., J.W. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 49, p.134-141, 1959.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; HENNING, A.A. Avaliação da qualidade da semente de soja produzida no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, p.1157-1165, 1987.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; OLIVEIRA, M.C.N. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília (en prensa). 1998.

- COTTRELL, H.J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.25, p.123-131, 1948.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi: Mississippi State University, 1962. 63p. (Technical Bulletin, 51).
- DIACOM: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. 1. Metodologia do teste de tetrazólio. Carlos Magno de Paiva Rola. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 1 video, con sonido, color, 28 min., VHS NTSC.
- FRANÇA NETO, J.B. **Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja**. Curitiba: TECPAR, 1981. 14p. (Boletim LASP, v.3,n.1).
- FRANÇA NETO, J.B. Qualidade fisiológica da semente. In: FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. p.5-24. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).
- FRANÇA NETO, J.B.; DIAS, M.C.L.L.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Soybean seed quality referee test in Brazil. **Newsletter of the Association of the Official Seed Analysts**, Fort Collins, v.60, n.3, p. 17, 1986..
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja - Versão Preliminar**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985. p.9-43. 1985.
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 58p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 32).
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Avaliação da suscetibilidade de cultivares de soja ao dano de embebição no teste padrão de germinação. **Informativo ABRATES**, Campinas, v.7, n.1/2, p.127, 1997. (Resumen presentado en X Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu).

- FRANÇA NETO, J.B.; WEST, S.H. Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. **Journal of Seed Technology**, Fort Collins, v.13, n.2, p.122-135, 1989a.
- FRANÇA NETO, J.B.; WEST, S.H. Effects of *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* on viability and quality of soybean seed. **Journal of Seed Technology**, Fort Collins, v.13, n.2, p.136-149, 1989b.
- GADD, I. Biochemical tests for seed germination. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.16, p.235-253, 1950.
- GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. [S.l.], Association of Official Seed Analysts, 1970. 62p.
- HASEGAWA, K. On the determination of viability in seed by reagents. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, East Lansing, v.7, p.148-153, 1935.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Problemas na avaliação da germinação de semente de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v., n.3, p.9-22, 1980.
- ISELY, D. Employment of tetrazolium chloride for determining viability of small grain seeds. **Proceedings of the Association Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 42, p.143-153, 1952.
- LAKON, G. The topographical selenium method, a new method for the establishment of viability of cereal seed without a growth test. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.12, p.1-18, 1940.
- LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v.24, p.389-394, 1949.
- LAKON, G. Germination potential and germination tendency according to the present state of research. **Saalgutwirtsch**, v.5, p.180-183, 205-207. 1953.
- LINDENBEIN, W. Tetrazolium testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 30, p. 89-97, 1965.

- MANSON, S.C.; VORST, J.J.; HANKINS, B.J.; HOLT, D.A. Standard, cold, and tetrazolium germination tests as estimators of field emergence of mechanically damaged soybean seed. **Agronomy Journal**, Madison, v.74, p.546-550, 1982.
- MOORE, R.P. Soybean germination. **Seedsmen's Digest**, San Antonio, v.11, n.3, p.12, 52, 54-55, 1960.
- MOORE, R.P. Tetrazolium evaluation of the relationship between total germination and seed quality. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 51, p.127-130, 1961.
- MOORE, R.P. Tetrazolium as a universally acceptable quality test of viable seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.27, n.3, p.795-805, 1962a.
- MOORE, R.P. TZ checks your seed for quality. **Crops Soils**, v.15, n.1, p.10-2, 1962b.
- MOORE, R.P. Tetrazolium best method for evaluating seed life. **Seedsmen's Digest**, San Antonio, v.17, n.11, p.38-40, 1966.
- MOORE, R.P. Freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 57, p.138-140, 1967.
- MOORE, R.P. History supporting tetrazolium seed testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.34, p.233-242, 1969.
- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. p.347-366.
- MOORE, R.P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v.1, p.17-30, 1976.
- MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International Seed Testing Association, 1985. 99p.

- OSORIO, J.A. **Freezing injury in soybean seeds and relationships to germination and fungal colonization**. Ames: Iowa State University, 1987. 86p. Tesis de Maestría.
- PEREIRA, L.A.G.; ANDREWS, C.H. Comparação de alguns teste de vigor para avaliação da qualidade de sementes de soja. **Semente**, Brasília, v.2, n.2, p.15-25, 1976.
- PORTER, R.H.; DURRELL, M.; ROMM, H.J. The use of 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. **Plant Physiology**, Bethesda, v.22, p.149-159, 1947.
- SINCLAIR, J.B. **Compendium of soybean diseases**. 2.ed. St.Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 104p.
- SMITH, F.G. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. **Plant Physiology**, Bethesda, v.27, p.445-456, 1952.
- SMITH, F.G.; THRONEBERRY, G.O. The tetrazolium test and seed viability. **Proceedings of the Association Official Seed Analysts**, East Lansing, v.40, p.105-109, 1951.
- TURNIPSEED, S.G.; KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p.247-282, 1976.
- VILLAS BÔAS, G.L.; GAZZONI, D.L.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; ROESSING, A.C. **Efeito de cinco populações de perceijos sobre diversas características da soja cv. UFV-1**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. 13p. (EMBRAPA-CNPSO. Pesquisa em Andamento, 3).
- YAKLICH, R.W.; VIGIL, E.L.; WERGIN, W.P. Scanning electron microscopy of soybean seed coat. **Scanning Electron Microscopy**, v. 2, p.991-1000, 1984.
- YAKLICH, R.W.; WERGIN, W.F.; VIGIL, E.L. Special secretory cells in the soybean seed coat. **Protoplasma**, New York, v. 134, p.78-87, 1986.



**Embrapa** FICHA DE EVALUACIÓN DEL TEST DE TETRAZOLIO

MUESTRA: N° 1	LOCAL: LONDRIÑA, PR
N° DE SEMILLAS EVALUADAS: 2 x 50	CONC. DE LA SOLUCIÓN: 0.075%
FECHA: 15/01/98	NOMBRE DEL TÉCNICO: ELIZA

1. XXXX XXXX XXXX XXXX	40
2. PDDPL PPAAP PEPAP	30
3. PDDPP (PEA	18
4. PPII	4
5. II	0
S.D. II	0
6. II	0
7. PEA	8
8. II	0
Nivel de vigor (1-3): 88 Viabilidad(1-5): 92	

1. XXXX XXXX XXXX XXXX	38
2. PDDP (PAAP PDDP	28
3. LPAAP PDDP	18
4. PPA	10
5. II	0
S.D. II	0
6. II	0
7. LPA	6
8. II	0
Nivel de vigor (1-3): 84 Viabilidad(1-5): 94	

REPETICIONES	DAÑO MECÁNICO		HUMEDAD		CHINCHES		DURAS	VIGOR	VIAB.
	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8			
I	12	2	62	4	4	2	0	88	92
II	10	2	52	4	8	0	0	84	94
MEDIAS	11	2	57	4	6	1	0	86	93

**Embrapa** FICHA DE EVALUACIÓN DEL TEST DE TETRAZOLIO

MUESTRA: N° 2	LOCAL: LONDRIÑA, PR
N° DE SEMILLAS EVALUADAS: 2 x 50	CONC. DE LA SOLUCIÓN: 0.075%
FECHA: 15/01/98	NOMBRE DEL TÉCNICO: VILMA

1. XXXX Y	42
2. PPLPP PLLP PPEI	28
3. PEPPE (PPP PPA	26
4. PEPPE P	12
5. PPEI	6
S.D. II	0
6. P	2
7. PEPPE (L	14
8. II	0
Nivel de vigor (1-3): 66 Viabilidad(1-5): 84	

1. XXXX	8
2. PPEP (PEAP PPI	24
3. PPAPL PDDPP PDDP P	32
4. PEPPE L	12
5. PA	4
S.D. II	0
6. PU	4
7. LPA (L	16
8. II	0
Nivel de vigor (1-3): 64 Viabilidad(1-5): 80	

REPETICIONES	DAÑO MECÁNICO		HUMEDAD		CHINCHES		DURAS	VIGOR	VIAB.
	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8			
I	32	8	76	6	12	4	0	66	84
II	28	12	76	4	14	4	0	64	80
MEDIAS	30	10	76	5	13	4	0	65	82





---

*Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria  
Centro Nacional de Investigación en Soja*

Ministerio de Agricultura

Rod. Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231 - 86001-970

Tel. 55 43 371-6000 Fax 55 43 371-6100

Londrina, PR - Brasil



ES TIEMPO DE BRASIL