



Viabilidad, vigor y germinación de semillas verdes de soja.

Martínez, M.¹⁻²; Montechiarini, N.⁴; Gosparini, C.³⁻⁴; Arango Perearnau, M.¹; Gallo, C.¹ y Craviotto, R.¹

1 Tecnología de Semillas, INTA EEA Oliveros. 2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 3 IICAR (Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario). 4 Lab. Fisiología Vegetal. Fac. Cs. Agrarias, UNR. Zavalla, Santa Fe.

 Palabras clave: *Glycine max* L., calidad fisiológica, semilla verde.

Las semillas verdes de soja son el resultado de un desequilibrio fisiológico producido durante la maduración del cultivo, asociado a condiciones de estrés termo-hídrico. El contenido de semillas verdes de un lote depende de la intensidad del estrés, del momento de ocurrencia y de la susceptibilidad del cultivar. Las semillas verdes presentan retención de pigmentos clorofílicos que podrían conducir a la reducción de la viabilidad, del vigor y de la germinación de los lotes de soja. Los objetivos del presente trabajo fueron: I) Analizar la viabilidad y el vigor de semillas verdes de soja y II) Estudiar la germinación de semillas, embriones y ejes embrionarios provenientes de semillas verdes.

Se utilizaron lotes de semillas de tres cultivares comerciales que maduraron bajo condiciones de estrés hídrico y térmico, y se obtuvieron los porcentajes de semillas verdes. Los porcentajes de viabilidad y de vigor se determinaron mediante la Prueba Topográfica por Tetrazolio sobre semillas maduras y semillas verdes de cada material. El Porcentaje de Germinación de semillas, embriones y ejes embrionarios provenientes de semillas maduras y semillas verdes se realizó en placas de Petri. Como indicador de velocidad se utilizó el tiempo que demoraron para alcanzar el 50% de la germinación. Los cultivares presentaron diferencias en la susceptibilidad a pre-

sentar semilla verde y en el impacto sobre su calidad fisiológica, pese a que maduraron bajo similares condiciones de estrés termo-hídrico. La condición verde tuvo un impacto negativo pronunciado sobre la germinación a nivel de semilla completa, siendo el tegumento una posible restricción adicional a la germinación.

Introducción

La producción de simientes y su calidad fisiológica son el resultado de la interacción de factores bióticos y abióticos que inciden durante el desarrollo y la maduración del cultivo (Tekroni, 1980; Salinas, 2008). La calidad fisiológica de semillas es el grado de excelencia en atributos que determinan su comportamiento como simiente, tales como son la viabilidad, la germinación, el vigor y la sanidad (Hampton, 2002).

Cuando el cultivo alcanza R6 (Fehr y Caviness, 1977) la semilla de soja contiene una elevada concentración de clorofila y, entre R6 y la madurez fisiológica (R8), los pigmentos clorofílicos se degradan por la actividad de las enzimas clorofilasas, cambiando su coloración de verde a amarillo (Sinnecker, 2002; Cencig, 2013). Una semilla completamente amarilla es considerada como fisiológicamente madura (Tekrony *et al.*, 1979). Sin embargo, condiciones de estrés termo-hídrico durante la maduración del cultivo pueden causar muerte prematura de plan-



tas, maduración forzada de semillas y alteraciones en la actividad de las enzimas clorofilasas, resultando en la persistencia de pigmentos clorofílicos en las semillas (Bohner, 2003).

El genotipo y las condiciones climáticas son los factores que determinan la aparición de las semillas verdes (McGregor, 1991). Los cultivares de soja presentan diferente susceptibilidad a la retención de clorofila en semillas bajo condiciones de estrés hídrico y térmico durante la maduración (Pádua, 2006). La intensidad del estrés, el momento de ocurrencia y la susceptibilidad del cultivar determinan la intensidad de la retención de pigmentos clorofílicos (França-Neto *et al.*, 2005).

La presencia de semillas verdes representa un factor negativo sobre la calidad fisiológica de los lotes de semillas de soja. Padua *et al.* (2007) concluyeron que existen reducciones lineales en la viabilidad, la germinación y el vigor a medida que se incrementa el contenido de semilla verde de lotes de soja. Craviotto *et al.* (2006) determinaron que las semillas verdes, independientemente de las alteraciones físicas como arrugas y abolladuras, manifiestan bajos niveles de viabilidad, germinación y vigor.

Craviotto y Arango (2001) identificaron dos tipos de semillas verdes: semillas totalmente verdes (coloración verdosa completa a nivel de tegumento y cotiledones) y semillas con tinte verdoso (tonalidad

verde difusa sólo en cotiledones). La permanencia de los pigmentos clorofílicos indica que los tejidos están inmaduros y presentarían dificultades en la germinación e implantación. Los autores mencionaron que, si el embrión alcanza su madurez fisiológica, entonces existirían posibilidades de que germine, independientemente de que los cotiledones estén inmaduros.

Las semillas verdes presentan retención de pigmentos clorofílicos que podrían conducir a la reducción de la viabilidad y del vigor de los lotes de soja. La presencia de pigmentos clorofílicos en tejidos seminales como tegumentos, cotiledones y ejes embrionarios podría incidir sobre la capacidad germinativa de las semillas verdes.

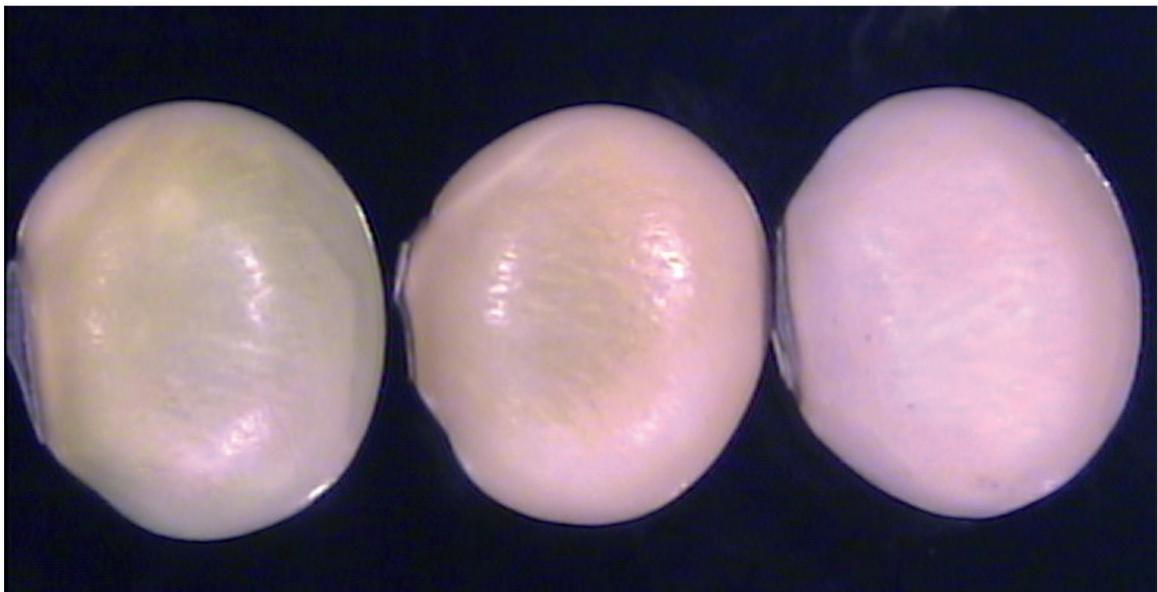
Materiales y métodos

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y en el Laboratorio de Semillas de la Estación Experimental Agropecuaria Oliveros, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Se utilizaron lotes de semillas de soja (*Glycine max* L.) de los cultivares SRM 3410 (cv1), SP 4x4 (cv2) y DM 4214 STS (cv3), sembrados el 23 de octubre de 2017 en la EEA Oliveros, provincia de Santa Fe. Entre los estadios R5 y R7, predominaron condi-

F1

Figura 1. Categorías de semillas verdes: (a) semillas con coloración verdosa total (V), (b) semilla con tonalidades verdosas parciales (Vp) y (c) semilla madura (M).





ciones de estrés hídrico y térmico, predisponiendo a la aparición de lotes con diferentes grados de retención de pigmentos clorofílicos.

Porcentaje de semilla verde

El porcentaje de semillas verdes (%SVT) de cada cultivar se determinó a partir de una muestra de 100g de semillas. La determinación se realizó en forma manual y se consideraron dos categorías de semillas verdes, semillas con tonalidades verdosas parciales (Vp) y semillas con coloración verdosa total (V) (Figura 3). El %SVT se calculó sumando las dos categorías Vp y V (Figura 1).

Esta categorización se utilizó como indicador de la susceptibilidad en la retención de pigmentos clorofílicos del material experimental ante condiciones de estrés.

Prueba Topográfica por Tetrazolio para evaluar Viabilidad y Vigor

De cada lote se extrajeron semillas con coloración verdosa total (V) y maduras (M), y se analizaron mediante la prueba Prueba Topográfica por Tetrazolio (PTTz) para evaluar Viabilidad y Vigor. La PTTz es una prueba bioquímica que permite determinar viabilidad y vigor utilizando una solución incolora de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio. Esta solución revela los procesos de reducción que ocurren durante la respiración en células vivas (ISTA, 2019). Las áreas vivas de las semillas se tiñen de color rosado-rojizo, distinguiéndose de las muertas que permanecen sin tinciones. La evaluación de la tinción en cuanto a ubicación, el color y la intensidad permite la identificación de las semillas de acuerdo con su viabilidad y vigor (Craviotto *et. al.*, 2008).

Se utilizaron 4 repeticiones de 50 semillas V y M de cada cultivar. Para el pre-acondicionamiento, las semillas se hidrataron en rollos de papel humedecido durante 18 horas a 20 °C. Para realizar la tinción, se colocaron las semillas en la solución de Tetrazolio a una concentración de 0.1% y se incubaron en baños termostáticos a 35°C de temperatura durante 2,5 horas. Después del período de tinción, las semillas se lavaron con agua corriente. Para la evaluación se consideraron las indicaciones de las Reglas ISTA (ISTA, 2018) y el Manual de la Prueba Topográfica por Tetrazolio en Soja (Craviotto *et. al.*, 2008). Los

resultados se expresaron como porcentaje de Viabilidad (%Vi) y Vigor (%Vg).

Prueba de Germinación

Se estudió la germinación de semillas completas (S), embriones (E) y ejes embrionarios (J) provenientes de la condición V y M. Para ello, se incubaron en placas de Petri en agua destilada a 24 ± 1 °C y en oscuridad. Se analizaron tres réplicas de 10 muestras para cada condición. Se midió el porcentaje de germinación (%G) de S y E hasta las 184h de incubación y 170h para J. Se consideró como semilla germinada aquella que evidenció protrusión de la radícula a través del tegumento. En tanto, se consideró a E y J germinados cuando se alcanzaron un alargamiento de la radícula superior a los 5 mm de longitud (Gosparini *et al.*, 2007). Como estimador de velocidad de germinación se utilizó el tiempo necesario para alcanzar el 50 %G (tG50).

Para el análisis estadístico, los resultados expresados en porcentajes se transformaron usando el arco seno de la raíz cuadrada de la proporción ($\arcsin \sqrt{x/100}$). Los datos obtenidos en cada prueba se sometieron al análisis de varianza utilizando la prueba F y las medias se compararon mediante el método LSD de Fisher, con un nivel de significación del 0.05. Se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

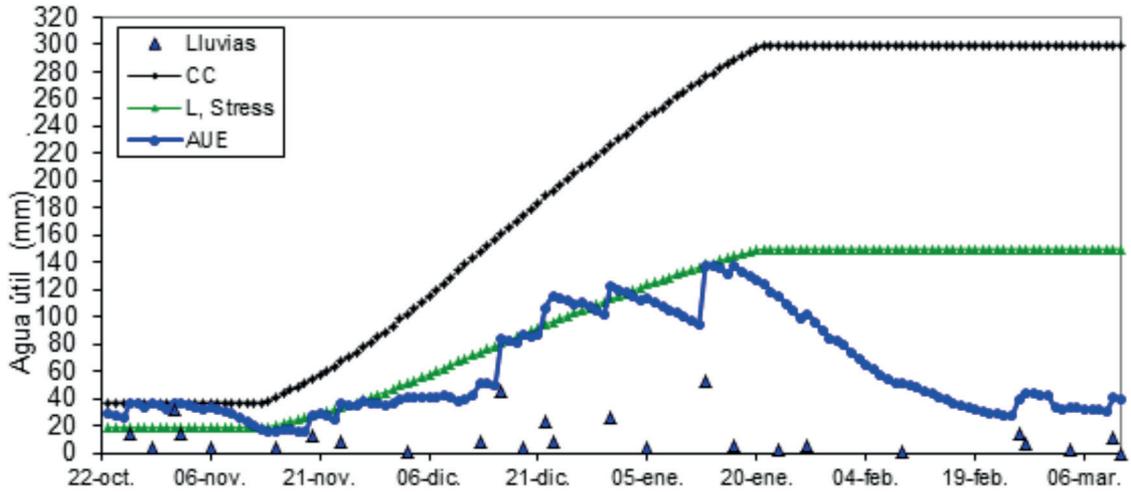
Resultados y discusión

Los datos meteorológicos de temperaturas máximas, medias y mínimas y los balances hídricos diarios de la EEA Oliveros durante la campaña 2017/18, indicaron que existieron condiciones de estrés térmico e hídrico durante el período R5-R7 para producir semillas verdes en los materiales analizados. El período de llenado de los tres cultivares se ubicó entre los meses de enero y febrero, donde existió un marcado estrés hídrico (Figura 2) y las temperaturas medias máximas superaron los 30°C, siendo de 32,6 °C para el mes de enero y de 34,2°C para febrero (Figura 3).



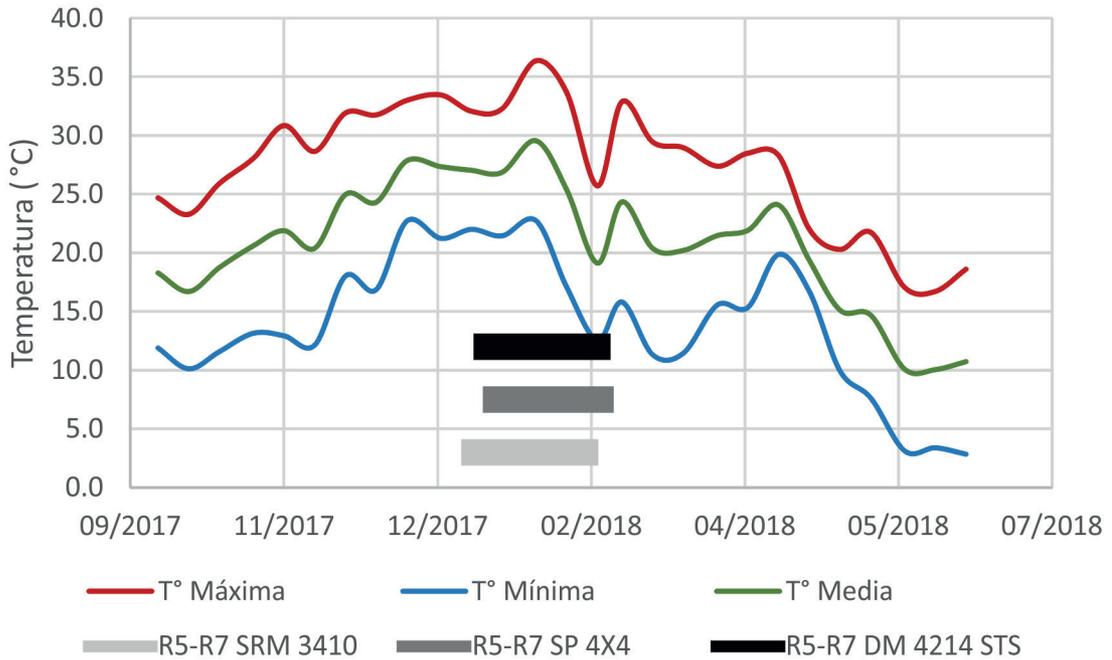
F2

Figura 2. Balance de agua en el suelo. Línea de retención de agua máxima (AUM) en el suelo explorado por las raíces y línea de límite de estrés hídrico (L, Stress). Lluvias y riegos diarios (). Cuando la línea de agua disponible está por debajo del límite de estrés, el cultivo está siendo afectado por déficit hídrico.



F3

Figura 3. Temperaturas medias máximas, medias y mínima de la campaña 2017/18 y período correspondiente a los estadios R5 -R7 de los cultivares SRM 3410, SP 4X4 y DM 4214 STS.



Se observaron diferencias en cuanto a la susceptibilidad de los cultivares a presentar semillas verdes ante similares condiciones de estrés termo-hídrico, coincidente con lo mencionado por Pádua (2009). En la Tabla 1, se observa el %SVT alcanzado por los lotes de semillas de los cultivares cv1, cv2 y cv3, siendo los valores alcanzados de 44.81 %, 21.47 % y 31.92 %, respectivamente. El cv1 alcanzó el mayor %SVT, pero fue similar al cv3 en cuanto a %V.

Los porcentajes de viabilidad (%Vi) y vigor (%Vg) mostraron diferencias en la calidad fisiológica entre los cultivares; sin embargo, no se obtuvieron diferencias entre las SV y SM en cv1 y cv2. El cv3 presentó los menores %Vi y %Vg y se evidenció una caída marcada en la condición V con respecto a M (Tabla 1). En el cv3, que tuvo los mayores niveles de daño, se



observaron semillas verdes sin tinción, que podrían demostrar fallas en el sistema enzimático respiratorio para la reducción de la sal de tetrazolio (Craviotto *et al.*, 2006; Gallo *et al.*, 2012). En coincidencia con los resultados obtenido por Gallo *et al.*, (2012), se observaron ejes embrionarios con distintos niveles de deterioro o muertos y cotiledones con coloración verdosa (Figura 4).

No hubo diferencias significativas en %G de las semillas entre cultivares, pero sí se registraron diferencias estadísticamente significativas entre la con-

dición V y M. El %G de SM y SV fue de 77 y 30 % para el cv1, 97 y 30 % para el cv2 y 97 y 33 % para el cv3. El tG50 de las SM fue de 39 h, 28 h y 31 h para cv1, 2 y 3, respectivamente. Sin embargo, las SV de los 3 cv no lograron alcanzar el 50% de G durante el experimento (Tabla 2).

La germinación y la tasa de germinación de los embriones indicaron acentuadas diferencias entre M y V y entre cultivares (Tabla 2) (Figura 5). En cuanto a la tasa de germinación, las diferencias fueron más marcadas en la condición V, siendo el tG50 de los EM y EV en el cv1 de 13h y 58h, el cv2 de 18h y 32h y en el cv3 de 21h y 39h.

En los cultivares analizados, no se observaron coloraciones verdosas a nivel de ejes embrionarios, lo cual podría indicar que, visualmente, alcanzaron la madurez fisiológica. El %G y tG50 de los JM presentaron un comportamiento similar en los cv analizados; sin embargo, hubo diferencias en cuanto al %G de los JV, siendo para el cv1 de 67%, para el cv2 100% y para el cv3 83% (Figura 5). No se observaron diferencias en cuanto a la tasa de germinación de los JV y JM entre los cultivares (Tabla 2).

T1

Tabla 1. Porcentajes de viabilidad y germinación de los cultivares SRM 3410, SP 4X4 y DM 4214 STS.

Cultivar	Maduración	Viabilidad (%)	Vigor (%)
SRM 3410	MADURAS	74 b	63 bc
SRM 3410	VERDES	73 b	60 c
SP 4X4	MADURAS	88 a	80 a
SP 4X4	VERDES	91 a	78 ab
DM 4214 STS	MADURAS	71 b	50 cd
DM 4214 STS	VERDES	49 c	36 d

F4

Figura 4. Semillas con cotiledones verdes y ejes embrionarios con distintos niveles de deterioro (a y b) o muertos (c) del lote de semillas del cultivar DM 4214 STS.



T2

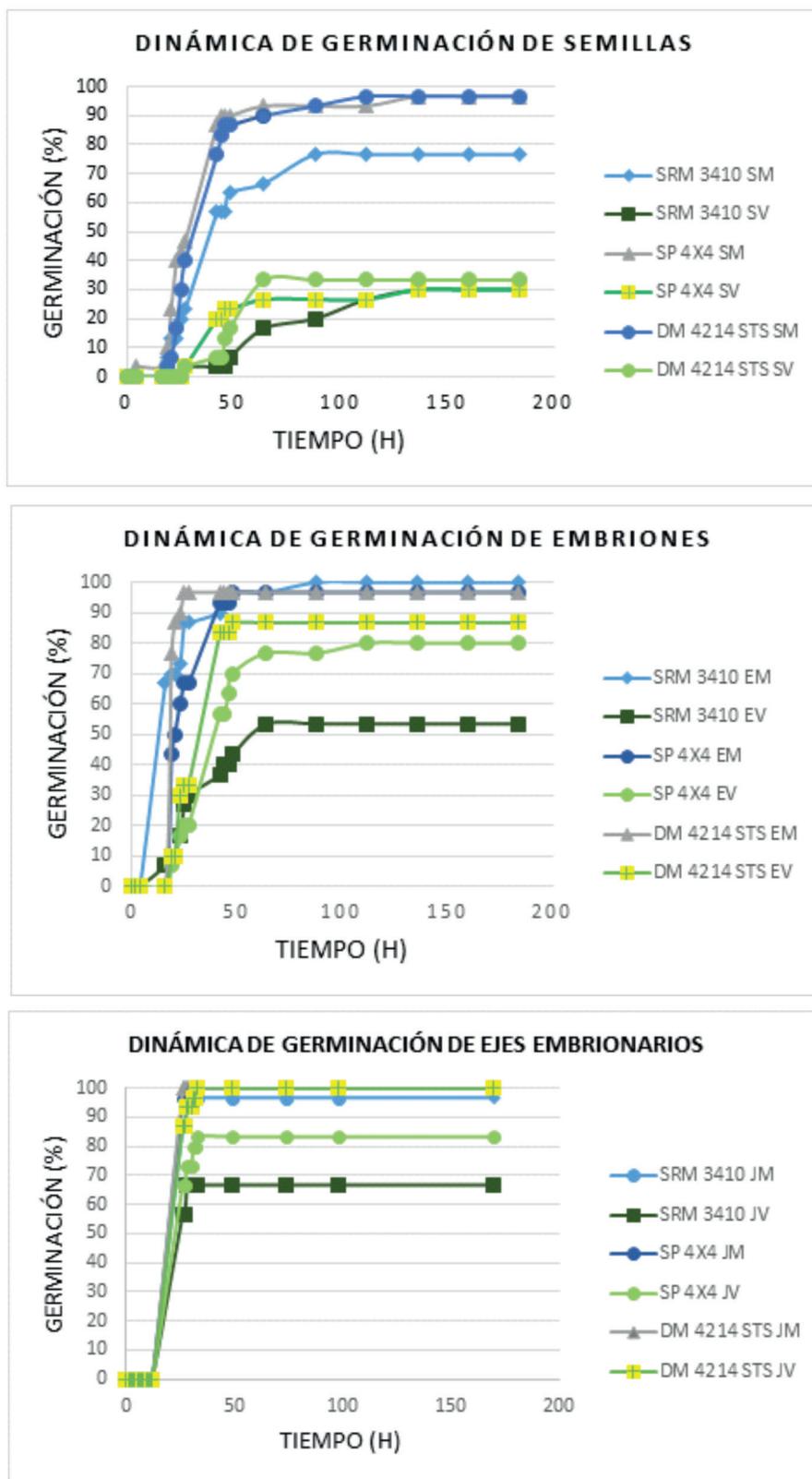
Tabla 2. Porcentajes de Germinación y tasas de Germinación de las semillas, embriones y ejes embrionarios obtenidos de semillas verdes y maduras.

Cultivar	Maduración	Germinación de Semillas (%)	Germinación de Embriones (%)	Germinación de Eje Embrionarios (%)	tG50 Semillas (h)	tG50 Embriones (h)	tG50 Ejes Embrionarios (h)
SRM 3410	MADURAS	77 a	100 a	97 a	39	13	20
SRM 3410	VERDES	30 b	53 d	67 c	NO	58	24
SP 4X4	MADURAS	97 a	97 ab	100 a	28	18	19
SP 4X4	VERDES	30 b	87 bc	100 a	NO	32	24
DM 4214 STS	MADURAS	97 a	97 ab	100 a	31	21	19
DM 4214 STS	VERDES	33 b	80 c	83 b	NO	39	20



F5

Figura 5. Dinámica de Germinación de semillas, embriones y ejes embrionarios obtenidos de semillas verdes y maduras, de los cultivares SRM3410, SP 4X4 y DM 4214 STS.





Los resultados mostraron que, para cada condición, las S presentaron menores %G y tasas de G respecto a E y J, con retrasos más evidentes para la condición V. Entre E y J el comportamiento fue similar en cuanto al %G. En la tasa de germinación no se observaron diferencias entre JV y JM, pero las diferencias fueron más acentuadas entre EV y EM.

Conclusiones

Los resultados indicaron que ante similares condiciones de estrés termo-hídrico, los cultivares presentaron diferencias en la susceptibilidad a presentar semilla verde y en el impacto sobre su viabilidad, germinación y vigor.

La diferencia en la viabilidad y en el vigor de las SV y SM sólo se hizo evidente en el cultivar DM 4214 STS que alcanzó los mayores niveles de deterioro.

La condición de verde tuvo un impacto negativo pronunciado sobre la germinación a nivel de semilla completa, siendo el tegumento una posible restricción adicional a la germinación.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ing. Agr. Nicolás Sanmarti por el aporte de los datos meteorológicos, al Ing. Agr. M.Sc. Juan Martín Enrico por los lotes de semillas y a Marta Montero por la toma de imágenes fotográficas.

Bibliografía

- Bohner, H. Green Soybeans. Disponible en: <http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/crop-talk/2002/ct_1102a2.htm>
- Cencig, G.F. (2013). Influencia de la temperatura en llenado de grano como factor determinante de la presencia de granos verdes en soja. Tesis de maestría. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 91 p.
- Craviotto, R.M. y Arango, M. (2001). Calidad de semilla 2001. Odisea de la soja. Revista APOSGRAN, 2, 10-13.
- Craviotto, R.M.; Salinas, A.R.; Arango, M.R.; Gallo, C. (2006). Diagnóstico por tetrazolio en semillas de soja verdesarrugadas y abolladas. III Congreso de Soja del MERCOSUR, Rosario, Argentina. 146 – 149.
- Craviotto, R.M.; Arango, M. y Gallo, C. (2008). Prueba Topográfica por Tetrazolio en Soja. Suplemento especial Revista Análisis de Semillas N° 1. ISSN 1851-9415. 96 p.
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). Stages of soybean development.
- França-Neto, J.B., Pádua, G.P., Carvalho, M.D., Costa, O., Brumatti, P.S., Krzyzanowski, F.C., ... y Sanches, D.P. (2005). Semente verde de soja e sua qualidade fisiológica. Embrapa Soja.
- Gallo, C., Enrico, J. M., Craviotto, R., y Arango, M. (2012). Variabilidad de la viabilidad y vigor de lotes de semillas de soja con presencia de simientes verdes pertenecientes a cultivares de distintos grupos de maduración producidos en dos fechas de siembra. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 38(2), 2.
- Gosparini, C.O., Busilacchi, H.A., Vernieri, P., y Morandi, E.N. (2007). Endogenous abscisic acid and precocious germination of developing soybean seeds. Seed Science Research, 17(3), 165-174.
- Hampton, J.G. (2002). ¿What is seed quality? Seed Science and Technology. 30 (1): 1-10.
- ISTA. 2019. International Rules for Seed Testing. ISBN 3-906549-38-0 P.O. BOX 308, 8303 Basserdorf, CH-Switzerland, Suiza, 296 p.
- McGregor, D. I. (1991). Influence of environment and genotype on rapeseed/canola seed chlorophyll content. Seed Science and Technology, Zurich, 19(1), 107-116.
- Pádua, G.P. (2006). Retenção de clorofila e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. Tese Doutorado em Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006. 160 p



- Pádua, G.P., França-Neto, J.B., Carvalho, M.L.M., Costa, O., Krzyzanowski, F.C., y Costa, N.P. (2007). Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. *Revista Brasileira de Sementes*, 29(3), 128-138.
- Sinnecker, P. (2002). Degradación da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja. Tesis de doctorado. Universidad de San Pablo, Facultad de Ciencias Farmacéuticas. 103 p.
- Tekrony, D.M., Egli, D.B., Balles, J., Pfeiffer, T., y Fellows, R.J. (1979). Physiological maturity in soybean. *Agronomy Journal*, 71(5), 771-775.
- Tekrony, D.M; Egli, D.B; Phillips, A.D. (1980). Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed. *AgronomyJournal*, 72, 749-753.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>