



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**ANÁLISIS DE LA UTILIDAD DE LA PRUEBA TOPOGRÁFICA POR TETRAZOLIO
REALIZADA EN PRECOSECHA COMO CRITERIO PARA LA SELECCIÓN DE
LOTES DE SEMILLA DE SOJA (*Glycine max*)**

Ing. Agr. Federico Eduardo López

**TRABAJO FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS DE CEREALES, OLEAGINOSAS Y
FORRAJERAS**

DIRECTOR: Dra. Jorgelina Cárcova

AÑO 2020

**ANÁLISIS DE LA UTILIDAD DE LA PRUEBA TOPOGRÁFICA POR TETRAZOLIO
REALIZADA EN PRECOSECHA COMO CRITERIO PARA LA SELECCIÓN DE
LOTES DE SEMILLA DE SOJA (*Glycine max*)**

Federico Eduardo López

Ingeniero Agrónomo, 2005- FAUBA.

Este Trabajo Final es presentado como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Especialista en Producción de Semillas de Cereales, Oleaginosas y Forrajeras de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Argentina (provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santiago del Estero) y en Brasil (estados de Río Grande do Sul, Paraná, Goias, Sao Paulo, Minas Gerais, Bahía, Mato Grosso y Santa Catarina), durante el período comprendido entre campañas 2016/17, 2017/18 y 2018/19, con la dirección de la Dra. Jorgelina Cárcova.

Federico Eduardo López

Dra. Jorgelina Cárcova
Directora

Defendido el 11 de diciembre de 2020

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<: Menor que.

>: Mayor que.

%: Por ciento.

A.C.: Antes de Cristo.

Cm: Centímetro.

EEA: Estación Experimental Agropecuaria.

FOB: Free on board.

INASE: Instituto Nacional de Semillas.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

ISTA: International Seed Testing Association.

Kg: Kilogramo.

N: Tamaño de muestra.

PG: Poder germinativo.

R²: Coeficiente de determinación.

u\$: Dólar estadounidense.

RESUMEN

Las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo de soja (*Glycine max*), fundamentalmente después de madurez fisiológica, tienen un alto impacto sobre la calidad fisiológica de la semilla. El contar con una herramienta para evaluar dicha calidad previo a la cosecha, resultaría sumamente útil para la industria semillera. El objetivo de este trabajo es analizar la utilidad del test de tetrazolio, del modo en que Bayer lo implementa actualmente, realizado sobre una muestra tomada previo a la cosecha, como predictor del valor de poder germinativo. Se utilizaron lotes sembrados con veinte variedades, distribuidas en Argentina y Brasil, durante tres campañas agrícolas. Se realizaron análisis de correlación y de regresión simple y múltiple entre las variables viabilidad y vigor vía prueba topográfica de tetrazolio, obtenidos mediante las metodologías empleadas por cada uno de los laboratorios utilizados, y el poder germinativo, al igual que una valoración económica del impacto de la toma de decisiones basado en esos parámetros. No se encontraron correlaciones significativas entre ninguna de las variables analizadas en combinación o separadas y el PG. El impacto económico de tomar decisiones en base a dichas variables sería negativo para las empresas semilleras. Adicionalmente se analizaron posibles causas que expliquen diferencias entre los resultados y la bibliografía. Así es que se comparan las técnicas de tetrazolio entre laboratorios utilizados. Dichas diferencias no logran explicar la falta de correlaciones. Queda planteado para futuros trabajos en esta línea de estudio, el análisis de la metodología de muestreo en precosecha del cultivo.

Palabras clave: soja, semilla, calidad, tetrazolio, poder germinativo.

ABSTRACT

USE ANALYSIS OF THE TETRAZOLIUM TOPOGRAPHIC TEST PERFORMED PRIOR TO HARVEST AS A CRITERIA FOR SELECTING SOYBEAN (*Glycine max*) SEED LOTS

The environmental conditions in which soybean (*Glycine max*) crop develops, especially those that take place after physiologic maturity, have a great impact over the seed physiologic quality. Having a test to analyze that quality prior to harvest, would result very useful for the seed industry. The purpose of this work is to establish if the tetrazolium topographic test, applied the way Bayer currently does, performed over a sample taken prior to harvest, is useful as a predictor of the germination power. Fields sown with twenty varieties over three campaigns, distributed between Argentina and Brazil where used for this investigation. Correlation tests, as well as simple and multiple regression analysis were made between tetrazolium tests (viability and vigor), according to the technic that each laboratory participating in this study uses, and germination power. An economic impact analysis of a decision-making process based upon these variables was also performed. No significant correlations were found between any of the variables and germination power, whether they were analyzed separately or combined. Making decisions based upon these variables would cause a negative economic effect on seed industry companies. Possible causes for the differences between bibliography and this research results were analyzed as well. Tetrazolium laboratory techniques applied by the laboratories used in this work, were contrasted. Differences between them cannot fully explain the lack of correlations. The method used for taking samples at the field prior to harvest is suggested as a future working area.

Keywords: soybean, seed, quality, tetrazolium, germination power.

INDICE

RESUMEN.....	Pág. 4
ABSTRACT.....	Pág. 5
INTRODUCCIÓN.....	Pág. 7
HIPÓTESIS.....	Pág. 13
OBJETIVO.....	Pág. 14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág. 14
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	Pág. 18
CONCLUSIÓN.....	Pág. 26
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	Pág. 27

INTRODUCCIÓN

Comprendiendo a la cadena agroalimentaria como el conjunto de procesos que abarcan desde la investigación hasta la llegada del alimento como tal a la mesa de los consumidores, resulta evidente la importancia de la semilla como primer insumo en dicha cadena de eventos.

Acorde al reporte del año 2018 de la Bolsa de Cereales de Rosario, el mercado internacional de semillas rondó los 50.000 millones de dólares en ese año (Revista Chacra, 2018). Argentina ocupa una posición relevante dentro de dicho mercado, siendo el segundo productor de semillas de Sudamérica, el tercero en América y el noveno a nivel mundial.

Las exportaciones argentinas de semillas representaron ingresos de divisas en el orden de los 256 millones de dólares en 2017 (International Seed Federation, 2019) y 285 millones en 2018 (Revista Chacra, 2018). El 95% de dicho valor está representado por la exportación de semillas de cultivos extensivos, en el orden de las 73.000 toneladas. El 5% restante lo componen principalmente especies hortícolas.

Estados Unidos importa el 20% de las semillas de cultivos extensivos producidas por nuestro país y a su vez es el destino del 40% de las exportaciones argentinas de semilla de maíz (INASE, 2015). Esto demuestra la importancia que tiene para nuestras exportaciones, el mercado de producción de semillas en contraestación con el hemisferio norte.

En contraparte, nuestro país importa simientes por un monto de 117 millones de dólares (International Seed Federation, 2019). En este caso aumenta a 15% la participación de especies hortícolas. Estos valores se han mantenido relativamente constantes durante los últimos cinco años. La relación positiva entre exportaciones e importaciones confiere a la Argentina un carácter netamente exportador, en cuanto a semillas se refiere.

Si se analiza la composición del sector semillero argentino, se observa que conviven empresas multinacionales, nacionales y familiares. Este sector es de los que mayor valor agregan dentro de la cadena agroalimentaria. La semilla de soja puede alcanzar valores de u\$s 0,8 por kilogramo, mientras que un kilo de la misma especie,

pero como *commodity*, ronda aproximadamente los u\$s 0,22. Este valor, al igual que para el resto de las especies autóгамas, es notablemente inferior al de las alógamas. Un claro ejemplo es el maíz, donde un kilogramo de semilla puede valer u\$s 10, en comparación con un kilo de *commodity* cuyo valor es de u\$s 0,12.

Existen registros del cultivo de soja que datan de al menos 2800 años A. C., al igual que acerca del comienzo de su domesticación en el norte de China, alrededor del siglo XI A. C. Si bien su origen se remonta al continente asiático, en la actualidad esta oleaginosa se siembra tanto en zonas templadas como tropicales, siendo el continente americano la principal plaza para su producción (Bergadá *et al.*, 2016). A la fecha, Estados Unidos, Brasil y Argentina concentran el 80% de la producción mundial de soja.

Desde la incorporación del gen de resistencia al herbicida glifosato por parte de Monsanto en 1995, la tasa de adopción y expansión del cultivo fue realmente notoria (Penna *et al.*, 2003). En la actualidad casi la totalidad de la soja sembrada es resistente al glifosato o contiene algún evento biotecnológico. Esto convierte a esta especie, en el organismo genéticamente modificado más sembrado a nivel mundial.

La Argentina no es la excepción a la regla. La superficie sembrada con dicho cultivo pasó de 5,8 millones de hectáreas en 1993 a 17 millones durante la campaña 2018/2019 (Secretaría de Agroindustria, 2019).

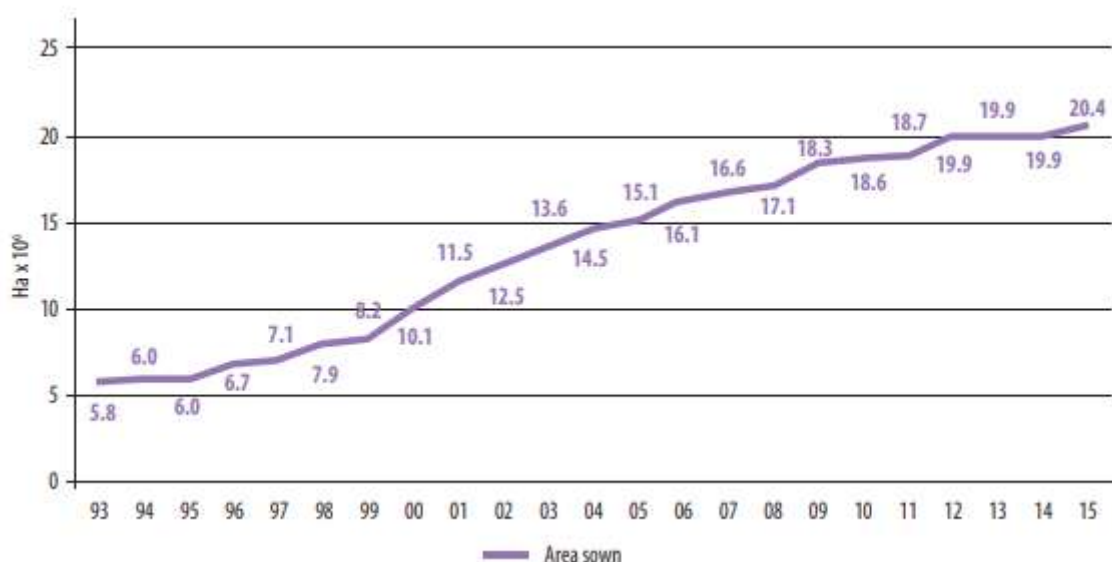


Gráfico 1: Evolución del área sembrada con soja en Argentina. Bergadá *et al.*, 2016.

La superficie cultivada con soja durante la campaña 2018/2019 representa el 44% del área total cultivada a nivel nacional. Esto demuestra la gran importancia del cultivo y su complejo agroindustrial dentro de la actividad agropecuaria de la Argentina y en su economía en general.

Según FAO (2017), Argentina ocupa el tercer puesto en la producción de soja a nivel mundial, con una cosecha total en 2017 de 54,9 millones de toneladas. A su vez es el tercer exportador mundial a nivel complejo sojero, por detrás de los Estados Unidos y Brasil, en ese orden. También en 2017, las exportaciones alcanzaron los 8,9 millones de toneladas, con un valor estimado de 3233 millones de dólares.

Si bien la soja es el principal cultivo sembrado a nivel nacional, esto no se traduce en ventas de semilla de la única categoría habilitada comercialmente en Argentina, la semilla certificada. Una "Ley de Semillas" anticuada (su redacción data de 1973) sumado a la falta de controles por parte del Estado, generan un entorno propicio para la ilegalidad y convierten al sistema de producción de semillas autógamias, en uno altamente ineficiente (Bergadá *et al.*, 2016). Según el Instituto Nacional de Semillas, en 2014 sólo el 15% del volumen de semilla de soja utilizado durante la siembra, correspondió a semilla certificada o legal. El resto se compone de semilla de uso propio sin declarar y "bolsas blancas" (semilla comercializada ilegalmente).

Si consideramos que lleva alrededor de diez años obtener y desarrollar una variedad nueva, uniforme y estable, con pureza genética y mejores atributos productivos tales como mayor rendimiento, resistencia a insectos o a herbicidas, resulta evidente la importancia que radica en el mejoramiento genético y posterior cobro de regalías por parte de los obtentores. Sin ello, el desarrollo de nuevos germoplasmas y tecnologías se ve fuertemente limitado. Un claro ejemplo es el hecho de que, en la actualidad, Argentina cuenta con al menos ocho eventos biotecnológicos aprobados y sólo se comercializan dos.

Más allá de lo mencionado, el sector semillero sojero es económicamente relevante. Durante 2015 se realizaron exportaciones de semilla de soja por un valor FOB de 23,4 millones de dólares. Los principales destinos, en orden de importancia decreciente son Uruguay, Paraguay, Bolivia y Estados Unidos (INASE, 2016).

A diferencia de lo que sucede con las especies híbridas, donde la producción de la semilla la realiza usualmente el semillero obtentor, en el caso de la soja y demás

autógamas, toma relevancia el papel que juega un nuevo actor en la cadena productiva, el multiplicador. Hoy en día el esquema productivo de semilla de soja más difundido abarca al semillero obtentor, quien es el que desarrolla la nueva variedad y vende la semilla de categoría original al multiplicador. Este último es el responsable de la siembra de la semilla original, para producir y cosechar semilla certificada de primera multiplicación. Esta es luego volcada a la red de distribución y comercialización hacia el productor a campo, quien es el cliente final.

Dentro del entorno desfavorable para el desarrollo del mercado de semillas de soja, resulta evidente y hasta legalmente necesario, que las bolsas certificadas se diferencien de las “bolsas blancas”. El principal atributo para lograrlo, sumado a la pureza varietal, es la garantía de una calidad fisiológica mínima y estandarizada que permita el correcto establecimiento y posterior desarrollo del cultivo.

El análisis de pureza y los tests de germinación han sido ampliamente utilizados en la evaluación de la calidad de lotes de semilla por extenso tiempo. Aparte de estos parámetros, actualmente han cobrado relevancia otros tales como sanidad, pureza genética y vigor (Salinas *et al.*, 2001).

Sin dejar de lado la posible caída de calidad durante el almacenamiento post cosecha, es la intención de este estudio, hacer foco en los eventos que tienen lugar previo a la cosecha del cultivo y su impacto en los parámetros de calidad fisiológica.

La calidad de las semillas de soja puede verse afectada negativamente por un amplio abanico de factores ambientales durante la producción a campo, tanto antes como después de alcanzar la humedad de cosecha. La presencia de una capa seminal altamente permeable, que permite que la semilla absorba fácilmente humedad, influye negativamente sobre este punto (TeKrony *et al.*, 1980). Se ha demostrado que la máxima calidad en términos de habilidad para germinar es lograda en el momento en que la semilla alcanza su madurez fisiológica (Delouche, 1974; Bewley *et al.*, 2013). Lamentablemente debido al alto contenido de humedad, la semilla no puede ser cosechada en ese momento, por lo que debe transcurrir un período de desecación en planta a campo, hasta que alcanza el contenido hídrico óptimo para ser recolectada mecánicamente. La permanencia a campo durante este período, sumado a las alternancias diarias de humedad del grano, genera un impacto negativo sobre la semilla en términos de poder germinativo, susceptibilidad

al daño mecánico durante la cosecha y predisposición a sufrir infecciones por parte de patógenos (TeKrony *et al.*, 1980).

Considerando la alta predisposición de la semilla de soja a sufrir mermas en términos de calidad fisiológica a campo, resulta sumamente útil contar con un test práctico y rápido para conocer su viabilidad previa a la cosecha. Esto permitiría la reducción de importantes costos al descartar directamente a campo, lotes que no lograrán cumplir con el requisito mínimo de 80% de poder germinativo que establece el INASE.

Entre las pruebas disponibles para determinar la viabilidad de un lote de semillas, se destaca la prueba topográfica por tetrazolio. Este test es el que refleja dicho atributo de calidad con mayor rapidez (Moore, 1985) y es considerada la más apta a nivel mundial (Craviotto *et al.*, 2011).

El ensayo topográfico de tetrazolio es un análisis bioquímico basado en las reacciones de oxidación-reducción que se producen en las células vivas del embrión u otros tejidos de la semilla al entrar en contacto con la sal de tetrazolio. Las células vivas poseen unas enzimas, denominadas deshidrogenasas, que están implicadas en la respiración celular, y son capaces de reaccionar con la solución de tetrazolio, formando un compuesto insoluble de color rojo (formazán) que permite identificarlas, diferenciándolas de las células muertas que pueden encontrarse en la semilla (ISTA, 2020). Los colores obtenidos mediante esta prueba corresponden al rojo indicativo de tejidos vivos y al blanco indicativo de tejidos muertos.

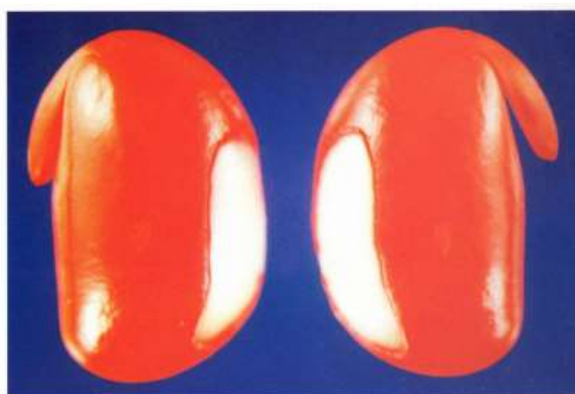


Figura 1: Ejemplo visual de zonas de tejido vivo (rojo) y muerto (blanco) mediante test de Tetrazolio.

França Neto *et al.*, 1998.

Se trata de un método rápido que, en menos de 48 horas, permite obtener resultados sobre la viabilidad de las semillas.

Este test ha sido de gran adopción en la industria semillera de Brasil. França Neto (1998) establece que, utilizando una metodología alternativa a la definida por ISTA, además de evaluar la viabilidad y el vigor, esta prueba permite diagnosticar otros problemas clave tales como daños mecánicos, deterioro por humedad, daños por ataque de chinches, al igual que aquellos generados por el secado, stress hídrico y heladas.

En la Argentina, si bien se utiliza, su difusión no es masiva como en el país vecino, encontrando adeptos y detractores del test dentro de la industria semillera. Probablemente esto se deba a que ISTA, en sus hojas de trabajo, no refleja la verdadera importancia de desarrollar la técnica en semillas de soja y emitir recomendaciones que permitan validar la metodología entre los laboratorios de análisis de semilla locales (Craviotto *et al.*, 2011). Si bien no se define un valor mínimo en dichos documentos, a modo empírico, muchas empresas productoras de semilla de soja en nuestro país suelen tomar como valor mínimo el 90% de viabilidad vía test de tetrazolio para considerar como aceptable a un lote de semillas.

Tomando como base la técnica desarrollada por ISTA, varios organismos e instituciones han desarrollado mejoras al método y fundamentalmente al modo en que los daños son interpretados. La EEA Oliveros del INTA es uno de ellos.

Éste establece un rango de categorías más amplio que el propuesto por ISTA a la hora de evaluar daños y es de gran adopción entre los laboratorios de nuestro país. Consiste en un método didáctico e intuitivo que clasifica la viabilidad y vigor de las semillas en cinco categorías (ver Figura 2), según:

- Color de tinción.
- Intensidad del color.
- Turgencia de los tejidos.
- Causa del daño.
- Ubicación del daño.
- Profundidad y alcance del daño.

PRUEBA TOPOGRÁFICA POR TETRAZOLIO EN FABACEAS

PATRONES - NIVELES DE VIABILIDAD Y VIGOR

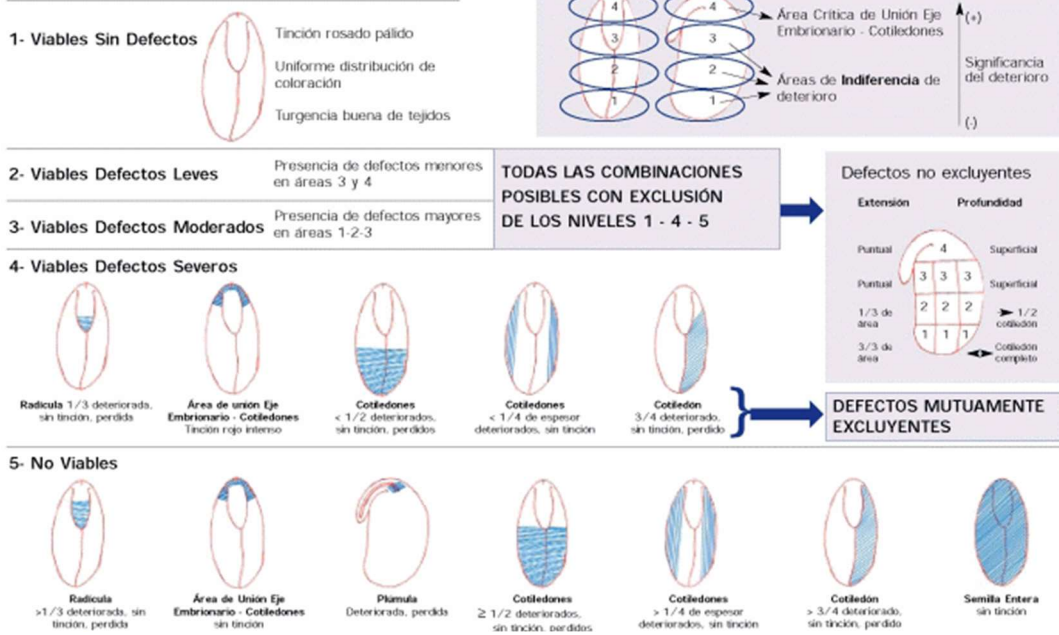


Figura 2: Categorías de viabilidad y vigor desarrolladas por EEA INTA Oliveros (Craviotto *et al.*, 2006)

Mediante el presente trabajo, se pretende analizar la utilidad de la prueba de tetrazolio a campo del modo en que actualmente la realiza Bayer, como predictor del valor de poder germinativo, a fines de ser utilizado como parámetro para descartar o aceptar lotes de semilla de soja previamente a su cosecha. Si este test, de la manera en que Bayer lo emplea, resultara consistente y tuviera buena relación con el poder germinativo, podría ser incorporado como prueba estándar dentro de las realizadas por los semilleros en sus planes de control de calidad de soja.

HIPÓTESIS

Existe una correlación entre los valores obtenidos mediante la prueba de tetrazolio realizada a un lote de semillas de soja previo a su cosecha, y el valor de poder germinativo una vez cosechado el mismo.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar la utilidad de la prueba de tetrazolio, del modo en que Bayer actualmente la emplea, realizado sobre una muestra de un lote de semillas de soja tomada a campo, previo a su cosecha mecánica, como predictor del valor de poder germinativo que tendrá ese mismo lote una vez recolectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos realizados en la presente investigación tuvieron lugar tanto en Argentina como en Brasil.

En Argentina, se utilizaron todos (53) los lotes de producción de semilla de categoría original de la marca Asgrow, sembrados durante las campañas agrícolas de 2017/2018 y 2018/2019. Estos pertenecieron a tres productores diferentes, ubicados en las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Chaco. Las variedades utilizadas fueron: 3806IPRO, 4326IPRO, 4736IPRO, 4818IPRO, 4927IPRO, 5714IPRO, 5815IPRO, 6211IPRO, M6210IPRO y M6410IPRO.

La siembra fue realizada durante los meses de octubre (sólo provincia de Buenos Aires), noviembre y diciembre. Las sembradoras utilizadas dependen del productor, pero incluyeron máquinas con sistema de dosificación a placa y neumáticas.

Para el caso de Brasil, se consideró para este ensayo el total (2565) de lotes de producción de semilla de categorías original y primera multiplicación de las marcas Monsoy y Agroeste, sembrados durante las campañas estivales de 2016/2017, 2017/2018 y 2018/2019. En este caso la producción fue realizada por dieciséis productores diferentes, ubicados en los estados de Río Grande do Sul, Paraná, Goias, Sao Paulo, Minas Gerais, Bahía, Mato Grosso y Santa Catarina. Las variedades utilizadas fueron: AS3590IPRO, AS3610IPRO, AS3730IPRO, AS3797IPRO, AS3810IPRO, AS3820IPRO, AS3680IPRO, AS3850IPRO, M6210IPRO, M7198IPRO y M8644IPRO.

La siembra tuvo lugar durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre, dependiendo de la zona de producción. Las sembradoras utilizadas fueron con sistemas de dosificación a placa, neumática y de tipo air drill.

Para ambos países, el distanciamiento entre surcos fluctuó entre 35cm, 42cm y 52cm, dependiendo del productor y la maquinaria utilizada.

Durante el ciclo de cultivo, ninguno de los lotes presentó afecciones de origen biótico o abiótico de relevancia. La producción fue supervisada por personal de Bayer.

En todos los casos la cosecha fue realizada con cosechadoras de tipo axial, con humedad de grano de entre 10 y 13,5%, procurando de esta manera, garantizar una buena condición de almacenaje de las semillas en silo.

Las variables analizadas en este estudio fueron:

- Viabilidad mediante test de tetrazolio.
- Vigor mediante test de tetrazolio.
- Poder germinativo post cosecha.

Prueba topográfica por tetrazolio

Siguiendo el procedimiento interno de Bayer, todos los lotes de campo fueron muestreados entre siete y cinco días previo a la cosecha. En lotes menores a cincuenta hectáreas, se tomaron ocho muestras primarias y en aquellos de mayor superficie, una muestra cada diez hectáreas, con un mínimo de ocho. Cada muestra primaria se compone de la totalidad de las semillas recolectadas de cuatro plantas consecutivas. El lote se recorre en forma de zigzag.

La trilla de las vainas se realizó manualmente, evitando provocarle daños mecánicos a la semilla que puedan generar distorsiones en los resultados del test de tetrazolio.

En los casos en que llovió más de diez milímetros entre el muestreo y la cosecha del lote, se repitió el mismo.

En Argentina, las muestras fueron analizadas en dos laboratorios externos de uso regular a los que denominaremos A y B, y el propio de Planta María Eugenia de Bayer (Rojas, Buenos Aires). Para el caso de Brasil, todas las muestras fueron remitidas a laboratorios propios de Bayer.

El test de tetrazolio consiste en una prueba bioquímica que permite determinar, entre otros aspectos, la viabilidad de las semillas. Para ella se utiliza una solución

indicadora, con la cual se embeben las semillas. Esta solución reacciona dentro de los tejidos interactuando con los procesos de reducción de las células vivas y dando como resultado la formación de una sustancia llamada formazán. Ésta es de color rojo y permite distinguir a las partes vivas (rojas) de aquellas muertas (incoloras). Además de las semillas viables completamente teñidas y de las no viables no teñidas totalmente, es posible hallar semillas parcialmente teñidas con proporciones variables de tejido necrótico en diferentes zonas de las mismas. La posición y tamaño de dichas secciones determinan si las semillas son consideradas como viables o no viables (ISTA, 2020).

Para el análisis de semillas a través de la prueba de tetrazolio, Bayer no tiene estandarizado un único método entre laboratorios internos y externos. Debido a ello, cada laboratorio participante en el presente trabajo empleó en laboratorio la técnica que habitualmente utiliza, obteniendo todos ellos el valor de viabilidad y, excepto el que emplea la técnica ISTA, también vigor mediante el test de tetrazolio. A modo de resumen, las técnicas aplicadas incluyeron:

- Metodología ISTA: Si bien a partir del año 2017 se incorporó la determinación de vigor a la metodología, en este estudio solo se lo empleó para conocer la viabilidad de las semillas (Leist *et al.*, 2003).
- Metodología EEA INTA Oliveros: Permite conocer viabilidad y vigor de las semillas (Craviotto *et al.*, 2008).
- Metodología de desarrollo propio Bayer Brasil: Permite conocer viabilidad y vigor de las semillas.

Poder germinativo

A los fines de este estudio, se decidió no descartar lotes de semilla en función del valor obtenido mediante el test de tetrazolio, por lo que se analizaron en esta instancia el cien por ciento de los lotes cosechados.

Siguiendo el protocolo interno de Bayer, se muestrearon en post cosecha los silos resultantes de la trilla de los lotes analizados previamente mediante la prueba de tetrazolio. El tiempo transcurrido entre la cosecha y el muestreo fue en promedio de 30 días. Para ello se utilizaron dos metodologías según el tipo de almacenamiento.

Para aquellos lotes almacenados en silos bolsa, se tomó una muestra primaria con calador manual cada cinco metros lineales (equivalente a 20 toneladas aproximadamente), para luego combinarlas en una muestra compuesta de al menos un kilogramo. Se evita calar los primeros cinco metros en cada uno de los extremos del silo, como se observa en la Figura 3.

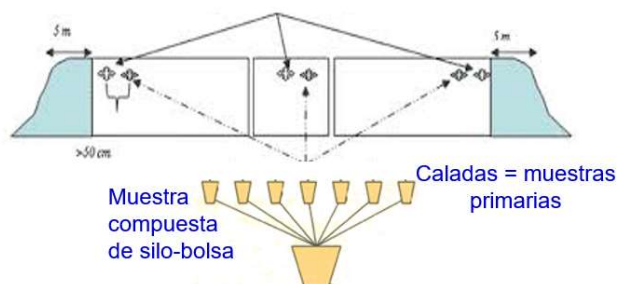


Figura 3: Técnica de muestreo de silos bolsa (Bayer).

Todos los lotes de semilla que fueron almacenados en otro tipo de silo fueron muestreados al ingreso de los camiones a la planta o predio de almacenamiento. El procedimiento consistió en la extracción mediante calador manual o neumático, de nueve muestras primarias que luego se combinaron para formar la muestra compuesta de mínimo un kilogramo. Las muestras primarias se distribuyeron de la siguiente manera: tres en chasis y seis en acoplado, siguiendo el esquema propuesto en la Figura 4.

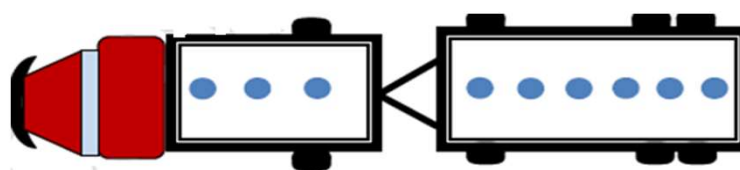


Figura 4: Técnica de muestreo de camiones (Bayer).

Las muestras compuestas fueron remitidas a laboratorios propios de Bayer, tanto en Argentina como Brasil. Cada una de ellas fue testada para conocer su poder germinativo, siguiendo las especificaciones detalladas en las Reglas internacionales para el análisis de semillas de ISTA (ISTA, 2020). Esto incluye los lineamientos definidos en el Capítulo quinto de dichas reglas, al igual que lo establecido en el Manual de evaluación de plántulas redactado por el mismo organismo.

En todos los casos, el poder germinativo se evaluó sobre muestras de semilla sin tratar con fungicida.

Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando las funciones de análisis estadístico de Microsoft Excel (versión 2019).

Se realizaron análisis de correlación y regresión simple y múltiple entre valores de viabilidad y vigor obtenidos por tetrazolio precosecha, en forma conjunta y por separado, con el poder germinativo del lote una vez cosechado. Se contó con una amplia base de datos de lotes de producción de semilla de soja que comprende veinte variedades, once localidades y tres años, aportando robustez al análisis.

Se elaboró un análisis del impacto económico de realizar un descarte de semillas basado en los resultados de tetrazolio precosecha.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La viabilidad y vigor obtenidos mediante el test de tetrazolio en precosecha del cultivo fueron correlacionados individualmente con los valores de poder germinativo (PG) postcosecha. En el Gráfico 2 se muestran por separado el grupo de datos de Argentina y el de Brasil, al igual que la línea de ajuste para el total de los datos y su valor de R2. Como puede apreciarse, la tendencia de los datos es similar en ambos países.

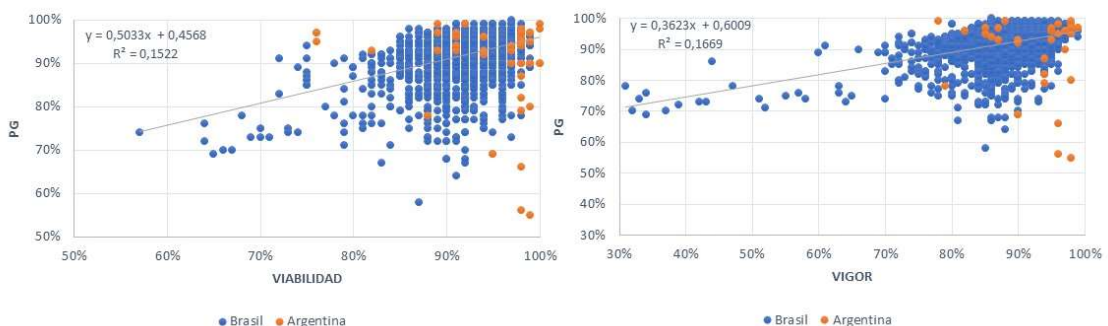


Gráfico 2: Poder germinativo en función de viabilidad y vigor, para Argentina y Brasil.

Los coeficientes de determinación obtenidos a partir del análisis de correlación de los datos combinados de ambos países pueden verse en la Tabla 1.

Variable	PG Completo	PG > 80%	PG < 80%
Viabilidad	0,15	0,12	0,00008
Vigor	0,16	0,11	0,00005

Tabla 1: Valores de coeficiente de determinación entre variables analizadas y poder germinativo.

En primer lugar, se analizó el set completo de datos de poder germinativo, dando como resultado valores muy bajos de R² tanto para viabilidad como para vigor individualmente.

INASE define al 80% como valor mínimo legal de poder germinativo. Tomando en cuenta dicho valor, se dividió el set de datos en dos grupos y se repitió el análisis de correlación por separado. Tal como se ve en la Tabla 1, para todos los casos el valor de coeficiente de determinación (R²) es bajo, lo que indica la carencia de correlación entre las variables viabilidad y vigor (por separado) y el poder germinativo.

ISTA (2020) establece que, si bien la viabilidad y el poder germinativo son variables independientes, no debería observarse diferencias significativas entre sus valores, siempre y cuando la semilla:

- No presente dormancia.
- No esté infectada por patógenos.
- No esté brotada.
- No haya sido deteriorada durante el test.
- No haya sido aplicada con inhibidores de la germinación.
- Haya germinado en condiciones óptimas.

Cabe la posibilidad de que alguno de estos factores, principalmente la presencia de patógenos, pueda haber tenido algún efecto en estos resultados. Ello daría origen a plántulas anormales durante el análisis de poder germinativo, que no pueden ser detectadas durante el test de tetrazolio. De todos modos, para las condiciones en que fue realizado este estudio, la viabilidad no explica por sí sola el valor de poder germinativo post cosecha.

El vigor tampoco explica individualmente el valor de poder germinativo. França Neto (2004) plantea este atributo como variable más determinante que la viabilidad, sobre el poder germinativo. Incluso establece un modelo matemático predictivo de poder germinativo, basándose sólo en el vigor por tetrazolio. Ahora bien, su planteo establece que el vigor obtenido por tetrazolio puede ser utilizado para determinar la emergencia potencial a campo cuando la prueba se realiza dos o tres semanas antes de la siembra. No hace referencia a la aplicabilidad del modelo sobre muestreos tan anticipados y realizados en precosecha del cultivo.

Sin embargo, Salinas (2001) plantea que ciertos lotes de semilla que presentan poderes germinativos elevados y similares pueden comportarse de manera diferente cuando son sembrados en condiciones idénticas sin estrés a campo. Esto se debe a diferencias en su vigor. Ferguson (1995) amplía este concepto, señalando que el poder germinativo brinda información insuficiente sobre el desempeño de un lote de semillas, cuando éste es de baja calidad. De este modo, semillas con alto poder germinativo, pueden tener valores de vigor altos, medios o bajos, que resultarán en emergencias diferentes a campo dependiendo de las condiciones de siembra.

El motivo por el cuál este trabajo busca establecer y analizar la correlación entre el vigor obtenido mediante la prueba topográfica de tetrazolio y el poder germinativo, es debido a que actualmente Bayer Brasil utiliza el vigor como predictor de PG y criterio para aceptar o rechazar lotes de semilla.

Los valores de coeficiente de determinación ajustados obtenidos mediante los análisis de regresión múltiple entre las variables de viabilidad y vigor, y el poder germinativo, se muestran en la Tabla 2. Al igual que con el análisis de cada variable por separado, se analizó el set de datos completo de poder germinativo y separándolo en dos grupos, utilizando como valor de quiebre el 80% determinado como mínimo legal por INASE.

Variable	PG Completo	PG > 80%	PG < 80%
Viabilidad y vigor	0,17	0,13	-0,01

Tabla 2: Valores de coeficiente de determinación ajustado entre variables analizadas y poder germinativo.

Tal como sucede con las variables viabilidad y vigor por separado, en conjunto tampoco logran explicar estadísticamente el valor de poder germinativo postcosecha. En base a los coeficientes obtenidos mediante los análisis de regresión múltiple, se elaboró un modelo que permitiría estimar el valor de poder germinativo. La ecuación predictiva sería la siguiente:

$$PG = 0,515 + 0,209 \times Viabilidad + 0,24 \times Vigor$$

En el Gráfico 3 se observan los valores de PG estimado obtenidos mediante la ecuación, en función del dato de PG real.

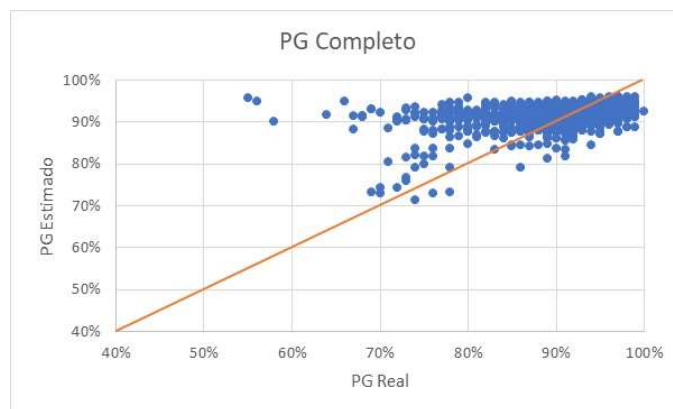


Gráfico 3: Comparación entre PG real y PG estimado mediante el modelo de regresión múltiple.

Resulta evidente que dicho modelo no sería de utilidad, ya que para el grupo de datos con PG real menor a 80% (límite legal), la ecuación tiende a sobreestimar el valor de PG predicho. Si se tomaran en cuenta los valores predichos para la toma de decisiones, se estarían considerando como útiles para ser utilizados como semilla, lotes cuyo PG real no superará el mínimo legal establecido por INASE.

Independientemente del impacto que esto podría generar a nivel de abastecimiento del mercado, ya que se considerarían como comercializables bolsas que finalmente no se venderán, el avanzar con el proceso de clasificación de esos lotes generaría un extra-costo para las empresas semilleras del orden de los u\$s 7 por bolsa de 40Kg. Este valor se compone de u\$s 4/bolsa por el proceso de clasificación y embolsado, más u\$s 3/bolsa en concepto de corte de las mismas y posterior envío a consumo.

Estas diferencias se condicen con lo planteado por Mason (1982) en sus estudios. En ellos se establece que el test de tetrazolio realizado acorde a la metodología propuesta por ISTA arroja valores de viabilidad significativamente superiores al poder germinativo. Según este autor, dicho test tiende a sobreestimar el valor de poder germinativo en el orden de entre 0 y 20%.

La correlación entre valores de viabilidad obtenidos a través de la Prueba de tetrazolio precosecha y poder germinativo postcosecha, se representa en el Gráfico 4.

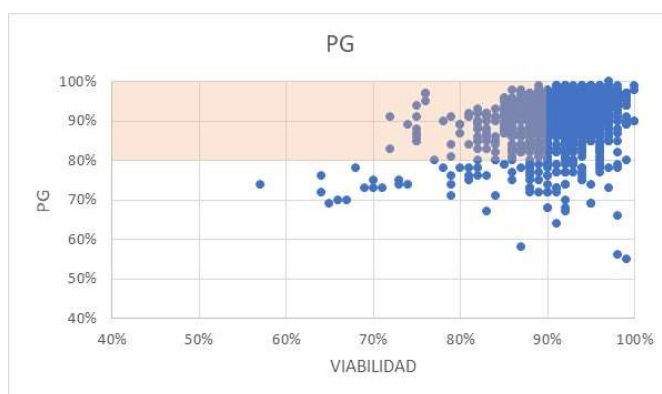


Gráfico 4: Correlación entre viabilidad precosecha y poder germinativo postcosecha.

En dicho gráfico se puede advertir que, en el caso en que se aplicara el criterio de decisión para descartar lotes utilizado por varias empresas semilleras (mínimo 90% de viabilidad), se estarían dejando de considerar como aptos a numerosos lotes que finalmente tuvieron valores de poder germinativo superiores al mínimo legal exigido por INASE. Dichos lotes son los que figuran dentro del área resaltada en el gráfico.

Estos representan un total de 10.140 toneladas, que se traducen en 215.475 bolsas de 40Kg. Basado en los valores de mercado, el hecho de haberlas descartado siguiendo un criterio erróneo, implicaría un costo de oportunidad hundido para la empresa de u\$s 4.740.450 totales, acumulado durante las tres campañas agrícolas analizadas.

En función de esto último, a partir de la campaña 2017/18, Bayer Brasil modificó su modelo de toma de decisiones a la hora de determinar qué lotes se consideran aptos y cuáles no, en base al test de tetrazolio. El cambio consistió en dejar de considerar

como criterio de selección al valor de viabilidad y en su lugar, utilizar solo el vigor, tomando como valor mínimo de aceptación al 85%, tal como se indicó anteriormente. Se decidió evaluar este criterio como alternativa al que actualmente se utiliza localmente por la industria semillera (viabilidad). Como pudo observarse en la Tabla 1, el coeficiente de determinación cuando se correlacionan vigor y poder germinativo, sigue siendo muy bajo ($R^2 = 0,16$). Esto indicaría una falta de correlación entre dichas variables.

Al repetir el análisis del costo de oportunidad que implicaría descartar lotes de semilla que finalmente resultan con PG superiores al límite legal, pero esta vez utilizando el criterio de selección por vigor, los valores siguen siendo elevados. De este modo se estarían descartando alrededor de 8.600 toneladas de semilla, equivalentes a 182.750 bolsas de 40Kg, con un valor de mercado de u\$s 4.000.000. Acorde a este análisis, modificar el criterio de selección de lotes al implementado por Bayer Brasil, no traería aparejada una mejora significativa al negocio.

En vistas de la falta de correlación entre las variables analizadas y el poder germinativo evidenciada en este trabajo, se plantearon dos posibles causas que puedan explicar estos resultados y las diferencias con respecto a la bibliografía citada. Una de ellas hace referencia a la técnica utilizada para realizar el test de tetrazolio en los distintos laboratorios y la otra abarca el modo en que se realiza el muestreo a campo en precosecha del cultivo.

França Neto (1988) establece en sus investigaciones, al test de tetrazolio como la segunda prueba más precisa con respecto a la repetibilidad después de la prueba de germinación estándar. Sin embargo, la deficiencia de las reglas ISTA planteadas por Craviotto (2011), a la hora de desarrollar una técnica específica y detallada para el cultivo de soja, ha conllevado a que varias instituciones o laboratorios hayan modificado y adaptado la técnica localmente. Estas diferencias entre técnicas podría ser la causa de discrepancias en los resultados entre laboratorios.

Los puntos más importantes del método fueron relevados para cada laboratorio utilizado y los resultados se presentan a continuación, en la Tabla 3.

	Laboratorio A	Laboratorio B	Bayer ARG	Bayer BRA
Imbibición de semilla	16-18 horas. En papel húmedo a temperatura ambiente.	16-18 horas. En papel húmedo, en cámara a 20°C.	16-18 horas. En papel húmedo, a temperatura ambiente.	16 horas. En papel húmedo, en cámara a 25°C. Si la humedad de la semilla es menor a 12%, se realiza pretratamiento en Gerbox con tela.
Concentración de solución	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Tiempo de incubación	3 horas.	3 horas.	3,5-4 horas.	2,5 horas.
Temperatura de incubación	35°C	30-35°C	30-35°C	38°C
Interpretación de resultados	Metodología EEA INTA Oliveros. 5 niveles de viabilidad.	Metodología EEA INTA Oliveros. 5 niveles de viabilidad. Poca experiencia con este test.	Para evaluar viabilidad no se corta la semilla, se analiza solo por fuera. 2 categorías: viable y no viable. Si se evalúa vigor, se aplica la metodología de EEA INTA Oliveros.	Técnica de desarrollo propio. 8 niveles de viabilidad y vigor. 1. Alto vigor 2. Alto vigor 3. Medio vigor. 4 y 5. Sin vigor, pero viable. 6 a 8. Muertas. Vigorosa: 1+2+3 Viable: 1+2+3+4+5

Tabla 3: Comparación entre técnicas de tetrazolio utilizadas por los laboratorios participantes en el estudio.

Las diferencias entre técnicas empleadas resultan evidentes, fundamentalmente en el modo en que cada laboratorio interpreta y clasifica los resultados obtenidos.

Para evaluar el efecto real de la diferencia entre metodologías de laboratorio, se aisló y analizó por separado al grupo de datos más robusto (n=2565), que es el de Brasil. Esos datos se obtuvieron en laboratorios propios de Bayer, empleando la técnica detallada en la Tabla 3 (Bayer BRA) y con analistas experimentados en el test de tetrazolio.

Los resultados de los análisis de correlación entre las variables viabilidad y vigor por separado y poder germinativo, al igual que el de la regresión múltiple de ambas variables, se resumen en la Tabla 4.

Variable	R2
Viabilidad	0,18
Vigor	0,19
Viabilidad y vigor	0,2

Tabla 4: Valores de coeficiente de correlación para grupo de datos de Brasil.

Aislando el posible efecto de las diferencias en la técnica entre laboratorios, las variables viabilidad y vigor no logran explicar significativamente el valor de poder germinativo. Esto sucede tanto cuando son analizadas combinadas o de manera separada.

Si bien no se puede negar que las diferencias entre métodos existen, para el caso de este estudio, el factor laboratorio no resultó determinante a la hora de explicar la poca correlación entre variables analizadas.

ISTA no define un método específico para la toma de muestras a campo en precosecha y mucho menos en particular para el test de tetrazolio, pero si aplicamos el recomendado para el muestreo de lotes a granel (Tabla 5), se puede inferir que el que utilizan la mayoría de las empresas semilleras a campo podría ser insuficiente.

Tamaño de lote	Número de muestras primarias a tomar
Hasta 500 Kg	Al menos cinco muestras primarias
501-3000 Kg	Una muestra primaria cada 300 Kg, pero no menos de cinco.
3001-20000 Kg	Una muestra primaria cada 500 Kg, pero no menos de 10.
Mayor a 20001 Kg	Una muestra primaria cada 700 Kg, pero no menos de 40.

Tabla 5: Cantidad mínima de muestras primarias a tomar de lotes de semilla mayores a 100 Kg (traducción libre). (ISTA, 2010)

Considerando que la totalidad de los lotes analizados superan los 20.000 Kg., de acuerdo con la Tabla 5, se debería aplicar el criterio de tomar una muestra primaria cada 700 Kg. con un mínimo de 40 muestras. Este volumen y frecuencia de muestreo difiere ampliamente del pautado por los procedimientos internos de las empresas semilleras, definiendo al muestreo en esta instancia como un punto de análisis en sí mismo y estableciendo las bases para posibles futuras oportunidades

de mejora. La adecuación de la técnica de muestreo a campo para prueba de tetrazolio en precosecha podría ser objeto de estudio para un trabajo futuro de investigación aplicada en la industria semillera.

CONCLUSIONES

Si bien existe bibliografía que indica lo contrario, en las condiciones en las que fue realizado el presente estudio, las variables viabilidad y vigor obtenidas mediante el test de tetrazolio no lograron explicar significativamente el valor de poder germinativo obtenido en postcosecha. Esto sucede tanto cuando fueron analizadas en forma individual, como el conjunto.

En vistas de estos resultados y en las condiciones en que Bayer utiliza la prueba topográfica por tetrazolio, no sería útil basar la decisión de considerar o no como apto a un lote para ser utilizado como semilla, en el valor de viabilidad como se plantea en el presente trabajo. Tampoco en la variante utilizada por Bayer Brasil, basada en el valor de vigor vía tetrazolio. Ambas conducirían a una toma de decisiones errónea, con posibles implicancias económicas negativas para las empresas semilleras.

Considerando las diferencias en las técnicas de laboratorio utilizadas, resulta evidente la necesidad de unificar criterios y estandarizar las metodologías para poder tomar decisiones de forma correcta. En ese sentido, y en vistas de las limitaciones de la técnica desarrollada por ISTA mencionadas durante este trabajo, resulta conveniente implementar una metodología más completa, específica y precisa a la hora de determinar los valores de viabilidad e inclusive vigor. Una posibilidad sería la de utilizar en forma masiva, aquella desarrollada por el EEA Oliveros de INTA.

Hoy en día, Bayer no incluye al tetrazolio dentro sus controles a través de muestras patrón o "Referee tests". En el caso de seguir solicitando este análisis a los laboratorios, debería ser incluido dentro de dichos controles.

Para próximos trabajos en esta línea de investigación, resultaría de suma utilidad poner a prueba la metodología de muestreo en precosecha y evaluar alternativas que brinden mayor certeza acerca de la representatividad del mismo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

AOSA. 2009. Seed Vigour Testing Handbook. Contribution N° 32 to the Handbook on Seed Testing, Association of Official Seed Analysts, NE, USA.

Bergadá, P., Rapela, M., Enriquez, R., Risso, D. y Mendizabal Frers, J. F. 2016. Generating value in the soybean chain through royalty collection: An international Study. International Seed Federation. Nyon, Switzerland. 64 pp.

Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W, Nonogaki H. 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. Springer, N.Y., N. Y. P 71-75.

Craviotto, R.M.; Arango, M.R. 2006. Simiente de soja: Nuevos patrones en gestión de calidad por tetrazolio. III Congreso de Soja del MERCOSUR, Rosario, Argentina, pp. 141-145.

Craviotto R.M., Arango Perearnau M.R., Gallo C. 2011. Novedades de la prueba de viabilidad por Tetrazolio en soja. Para mejorar la producción 46. INTA EEA Oliveros.

Craviotto R.M., Arango Perearnau M.R., Gallo C. 2008. Topographic tetrazolium test for Soybean. Suplemento especial N°1. Revista Análisis de Semillas. Argentina. ISSN 1851-9415. 96 pp.

Delouche J. C. 1974. Maintaining soybean seed quality. In Soybean production, marketing and use. Bull. P 46-61.

Ferguson J. 1995. An introduction to seed vigour testing. In Venter, HA van der (Ed.): Seed vigour testing seminar, Copenhagen, Zurich: International Seed Testing Association. pp. 1-10

França Neto J., Krzyzanowski F., Pereira da Costa N. 1998. El test de tetrazolio en Semillas de soja. EMBRAPA. Documentos, 117.P 1-12.

França Neto, J.B.; Pereira, L.A.G.; Costa, N.P.; Krzyzanowski, F.C.; Henning, A.A. 1988. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 58 pp.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2020. International Rules for Seed Testing. Basserdorf, CH-Switzerland. 300 pp.

Leist, N.; Krämer, S.; Pfäfflin, J. 2003. *ISTA working sheets on tetrazolium testing, 1st edn*. Bassersdorf, Switzerland: ISTA.

Mason, S.C., Vorst, J.J., Hankins, B.J. and Holt, D.A. 1982. Standard, Cold, and Tetrazolium Germination Tests as Estimators of Field Emergence of Mechanically Damaged Soybean Seed. *Agronomy Journal*. 74: 546-550.

Moore, R.P. 1985. Handbook on Tetrazolium Testing. International Seed Testing Association, Zurich. 99 pp.

Penna J.A., Lema D. 2003. Adoption of Herbicide Tolerant Soybeans in Argentina: An Economic Analysis. In: Kalaitzandonakes N. (eds) *The Economic and Environmental Impacts of Agbiotech*. Springer, Boston, MA. P 203-221.

Salinas A.R., Yoldjian A. M., Craviotto R. M. y Bisaro V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa agropecuaria brasileira*. V 36, N2. P 371-379.

TeKrony D. M., Egli D. B. and Phillips A. D. 1980. Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed. *Agronomy Journal*. Vol 72, No 5. P 749-753.

www.agroindustria.gob.ar

www.argentina.gob.ar/inase

www.fao.org/faostat/en

www.revistachacra.com.ar/nota/18137-la-argentina-en-el-top-ten-de-los-productores-de-semillas/

www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/06/Exports_2017Final.pdf