

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

I. TÍTULO

Calidad fisiológica de semilla de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) por la prueba topográfica de tetrazolio y la prueba estándar de germinación.

NOMBRES Y APELLLIDOS DE LOS AUTORES:

Saturnino Marca Vilca

Félix Alonso Astete Maldonado

Valentin Arapa Huanca

II. RESUMEN

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la calidad fisiológica de semilla de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la prueba topográfica de tetrazolio y la prueba de germinación. La investigación se llevará a cabo en el laboratorio de análisis de semillas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA-Puno. Los materiales a usar para la prueba será la porción de semilla pura del análisis de pureza de la semilla de Tarwi, procedente del Instituto Nacional de Innovación Agraria-Puno de la campaña agrícola 2021/2022, y el cloruro 2, 3, 5 trifenil tetrazolio. La metodología para la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación se fundamentará acorde a las normas de la ISTA (2009). Para el primero, los factores en estudio serán: concentraciones de solución de tetrazolio (0.1%, 0.5%, 1.0%), tiempo de inmersión para la tinción (2, 4 y 6 horas) y temperaturas de exposición (20, 25 y 30 °C). Para el segundo, se seguirá el procedimiento establecido por el ISTA para el género *Lupinus* spp. Para la prueba de tetrazolio se utilizarán tres repeticiones de 50 semillas, y para la germinación cuatro repeticiones de 50 semillas, en ambas pruebas se utilizará el diseño completamente al azar, con tres repeticiones de 50 semillas para tetrazolio en factorial de 3^3 y la prueba de Tukey con una probabilidad de 95%; y con cuatro repeticiones de 100 semillas para la prueba de germinación. En la prueba de tetrazolio la evaluación se efectuará en base al patrón de tinción e intensidad de coloración de los tejidos, especialmente el embrión; para germinación se evaluará a los 21 días, las estructuras esenciales visibles del embrión. Los resultados esperados son la concentración de la solución, tiempo de inmersión y la temperatura óptima, para evaluar la calidad fisiológica de las semillas de Tarwi y comparar su eficiencia con la prueba estándar de germinación.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis* Sweet, tetrazolio, calidad fisiológica

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando los agricultores no conocen la procedencia y la calidad de semilla que usa para sus siembras, corren el alto riesgo de lograr poca población de plantas en el campo, el crecimiento y maduración desuniforme, consecuentemente bajo rendimiento y calidad del producto, que no solamente afecta a los productores sino repercute en la comercialización y en la agroindustria.

Además, los agricultores y empresas productoras de semillas, para agilizar las decisiones para la siembra, el manejo de semillas durante las etapas de poscosecha y sobre todo para la comercialización, requieren de métodos de análisis rápidos, precisos y confiables para conocer la viabilidad de las semillas.

Actualmente la prueba de germinación es el método más utilizado para determinar la calidad fisiológica de las semillas; sin embargo, la demora en la obtención de los resultados de germinación resulta en una seria limitación en el proceso de toma de decisiones en la industria de semillas. Además de la demora en su ejecución, esta prueba, en su forma de evaluación tradicional, no provee información en cuanto al vigor, no permite de manera precisa la identificación de los factores que afectan la calidad de las semillas, y sus resultados son frecuentemente enmascarados por la ocurrencia de daños de imbibición (França Neto et al, 1998).

En este contexto, la prueba de tetrazolio se convierte en una alternativa interesante por la calidad y rapidez en la determinación de la viabilidad y del vigor de la semilla, permitiendo obtener resultados, de modo general, en menos de 24 horas (França Neto et al., 1988).

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar la calidad fisiológica de la semilla de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la prueba topográfica de tetrazolio bajo los parámetros de concentración de solución de tetrazolio, temperatura y tiempos de sumersión, y la prueba estándar de germinación.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Para el análisis de la calidad de semilla existen diversos métodos, que requieren desde sofisticados infraestructuras, máquinas, equipos, insumos, materiales y personal calificado. Asimismo, los métodos pueden dar resultados desde horas, días y semanas, aspecto muy importante para el control de calidad de la semilla en las distintas etapas de la producción como: la siembra, cosecha, maduración fisiológica, procesamiento, almacenamiento; así como, en la inspección, certificación y comercialización de semillas donde se requiere de métodos que den resultados rápidos y confiables.

Por ello, es de fundamental importancia realizar un control de calidad a través de los diferentes métodos útiles y confiables para determinar las principales características de una semilla de alta calidad.

En los programas de control de calidad su uso contribuye permitiendo agilizar decisiones de compra, venta, beneficio, almacenamiento o descarte de semillas (Leme de Lima Días y Rego Barros, 1995).

La prueba de tetrazolio ha sido destacada, principalmente para la soja, debido a su rapidez, precisión y también por el gran número de informaciones proveídos por el mismo. La prueba además de evaluar la viabilidad y el vigor de los lotes de semillas, provee el diagnóstico de las posibles causas responsables por la reducción de su calidad: daños mecánicos, deterioración por humedad y daños de chinches, que son los problemas que más comúnmente afectan la calidad fisiológica de la semilla de

soya. Sin embargo, además de estos, los daños de secado, de estrés hídrico y de helada pueden también ser fácilmente visualizados por la prueba (França Neto et al, 1998).

Esta prueba es una herramienta importante por su rápida y certera estimación de la viabilidad y vigor en la semilla, permitiendo obtener resultados en corto tiempo (Días y Alves, 2008). Además, proporciona mayor información que la prueba de germinación.

Monroy et al. (2017), indican que la coloración roja intensa indica la presencia de actividad celular en el embrión y la no coloración indica que no hay presencia de actividad celular, por lo tanto, es una semilla no viable.

V. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

La prueba de tetrazolio es una práctica con mayor uso en semillas agrícolas como la soja, el trigo, el algodón y forrajeras del género *Brachiaria*. Su empleo permite una rápida estimación de la viabilidad de la semilla, desde que utilizado correctamente con base en procedimientos previamente definidos y comparados con la prueba de germinación (Márquez y Ferro, 1988).

El análisis de viabilidad por tetrazolio se presenta como una herramienta útil para estimar rápidamente la capacidad germinativa de las gramíneas forrajeras de lenta germinación y con dormición poscosecha (Leme de Lima Días y Rego Barros, 1995).

La prueba de tetrazolio puede ser utilizado con el objetivo de determinar la viabilidad de semillas de lenta germinación o de semillas que no germinan cuando son utilizados métodos previstos por las reglas para análisis de semillas (Márquez y Ferro, 1988).

La velocidad de reducción del tetrazolio es afectada por diversos factores, entre ellos: la concentración de la solución, la temperatura, la duración del pre acondicionamiento y la tinción, la presión atmosférica y el nivel de deterioro de las semillas (Da Costa y Marcos-Filho, 1994; Das y Sen-Mandi, 1992; Leme de Lima Dias y Rego Barros, 1995; Kruse, 1996).

La evaluación de la viabilidad de las semillas a través de la prueba topográfica de tetrazolio se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifeniltetrazolio. Esta prueba también puede ser utilizada para evaluar el vigor sobre la base de la identificación, localización, y observación de los tejidos de la semilla (Hampton y Tekrony, 1995).

VI. HIPÓTESIS GENERAL

La prueba topográfica de tetrazolio se constituirá en una metodología rápida, segura, reproducible y confiable para evaluar la calidad fisiológica de la semilla de Tarwi.

VII. OBJETIVOS GENERAL

Evaluar la calidad fisiológica de semilla de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) por la prueba topográfica de tetrazolio y la prueba estándar de germinación.

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de la solución de tetrazolio
- Ajustar el tiempo de tinción de tetrazolio en la semilla
- Establecer la temperatura óptima para la velocidad de reducción del tetrazolio
- Comparar los resultados de viabilidad entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Ubicación

La investigación se realizará en el laboratorio didáctico de análisis de semillas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica de la UNA. Puno, localizado en la región Puno, latitud sur 15°50' 15'', longitud oeste 70°01'18'' y a una altura de 3812 m.s.n.m.

10.2 Materiales

- La semilla de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) proviene del banco de germoplasma del Centro de Investigación Camacani de la Universidad Nacional de Altiplano-Puno, cosechados de la campaña agrícola 2017/2018.
- Sal de tetrazolio: cloruro 2, 3, 5-trifenil tetrazolio.
- Agua destilada
- Placas de Petri,
- Frasco de vidrio (Becker) con capacidad de 50 ml,
- Frasco de vidrio de color ámbar para almacenar la solución de tetrazolio, que es fotosensible y se reduce con la luz,
- Refrigeradora,
- Cámara germinadora, estufas de 30 a 40°C
- Sustrato de papel,
- Bisturí,
- Lupas y microscopio estereoscópico.
- Agujas de disección recta
- Vaso de precipitado de 100 ml

10.3 Metodología de la investigación

10.3.1. Variables a analizar (factores y niveles)

Factor	Niveles de factor
A. Concentraciones de la solución de tetrazolio	0.1%
	0.5%
	1.0%
B. Tiempo de tinción o coloración	2 horas
	4 horas
	6 horas
C. Temperatura óptima para	20°C

reducción de tetrazolio 30°C
 40°C

10.3.2. Tratamientos y diseño experimental

N° orden	Tratamientos	Coloración		
		Solución (%)	Tiempo (hora)	Temperatura (°C)
1	T1	0.1	2	20°C
2	T2	0.1	2	30°C
3	T3	0.1	2	40°C
4	T4	0.1	4	20°C
5	T5	0.1	4	30°C
6	T6	0.1	4	40°C
7	T7	0.1	6	20°C
8	T8	0.1	6	30°C
9	T9	0.1	6	40°C
10	T10	0.5	2	20°C
11	T11	0.5	2	30°C
12	T12	0.5	2	40°C
13	T13	0.5	4	20°C
14	T14	0.5	4	30°C
15	T15	0.5	4	40°C
16	T16	0.5	6	20°C
17	T17	0.5	6	30°C
18	T18	0.5	6	40°C
19	T19	1.0	2	20°C
20	T20	1.0	2	30°C
21	T21	1.0	2	40°C
22	T22	1.0	4	20°C
23	T23	1.0	4	30°C
24	T24	1.0	4	40°C
25	T25	1.0	6	20°C
26	T26	1.0	6	30°C
27	T27	1.0	6	40°C

Para el análisis de los resultados de la prueba topográfica de tetrazolio, se utilizará el Diseño Completamente al Azar, con tres repeticiones en un arreglo factorial de 3x3x3,

en cada repetición se evaluará 25 semillas. Para las comparaciones se utilizará la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$), de acuerdo a Montgomery (2017).

Para una adecuada conducción, evaluación e interpretación de los resultados, se seguirá los procedimientos establecidos por Brasil (2009), Franca Neto et al (1998) e ISTA (2016).

10.3.3. Preparación de soluciones de tetrazolio

Preparación de la solución al 0.1% p/v = 0.1 g en 100 ml de agua destilada

Preparación de la solución al 0.5% p/v = 0.5 g en 100 ml de agua destilada

Preparación de la solución al 1.0% p/v = 1.0 g en 100 ml de agua destilada o 10 g en 1.0 litro de agua destilada. El pH de la solución estará comprendido entre 6 y 8, para lograr una tinción óptima. Las soluciones se envasará en un frasco e vidrio color ámbar, en un sitio oscuro y fresco.

10.3.4. Preparación de la semilla para la prueba topográfica de tetrazolio

a) Muestra de la semilla para análisis

La muestra de trabajo será representativo de un lote de semillas debidamente identificadas.

b) Número de semillas

Para la prueba topográfica de tetrazolio, se utilizará 75 semillas con tres repeticiones de 25 semillas, procedentes de la porción de semilla pura del análisis de pureza.

Para la prueba de germinación se tomarán 400 semillas con cuatro repeticiones de 100 semillas conforme recomendado por la ISTA (2016).

c) Pre acondicionamiento de la semilla

El pre tratamiento consistirá en el ablandamiento de la semilla mediante la hidratación, a fin de retirar el tegumento y realizar el corte o punzada para facilitar la penetración de la solución y consecuentemente la interpretación. Para ello, 400 semillas de Tarwi serán sembradas con 8 repeticiones de 50 semillas en el sustrato papel toalla, se humedecerá con 2.5 veces el peso del sustrato, luego serán colocadas en la cámara germinadora a una temperatura de 35°C a 40°C por 3 a 4 horas.

d) Coloración o tinción de la semilla

Las semillas previamente tratadas serán removidas y seccionadas con un bisturí a lo largo del eje longitudinal una a una a fin de evitar que sequen y endurezcan. Una vez realizada el corte a 50 semillas/repetición, éstas serán colocadas uniformemente en placas petri en la solución de tetrazolio según las concentraciones; luego serán colocadas en cámara germinadora a las temperaturas y los tiempos establecidos según los tratamientos.

e) Lavado de las muestras para la evaluación

Una vez que las semillas han alcanzado la coloración ideal, serán retiradas de la cámara germinadora para luego ser lavada y mantenidas sumergidas al agua hasta el momento de la evaluación.

10.3.5. Evaluación e interpretación de la prueba

Es posible que muchos factores interfieran en la velocidad de infiltración de la solución de tetrazolio y en el grado de coloración de los tejidos. El conocimiento y la identificación de las estructuras esenciales de la semilla de Tarwi es fundamental, la misma que consta de un embrión, cotiledones y el tegumento. Para una adecuada interpretación de los resultados, se evaluará fundamentalmente los siguientes aspectos:

- Las mitades de las semillas serán evaluadas individualmente (una a una), en las cuatro repeticiones, observando la coloración del embrión (radícula-hipocótilo), los cotiledones y el tegumento; así como, la localización de daños causados por efectos mecánicos, por insectos, por el deterioro, y el aspecto de turgencia de los tejidos.
- Las semillas serán interpretadas como viables y no viables, según la coloración de los tejidos. Se considerarán semillas viables, aquellas que presenten una coloración rojo carmín (tejido vivo y vigoroso), especialmente en el embrión y que los tejidos muestren turgencia; las no viables, aquellas que no presenten coloración o coloración blanco lechoso (tejido muerto), o presenten coloración rojo carmín intenso (tejido en deterioro).

Se tomará muy en cuenta que el tejido embrionario sano absorbe el TZ lentamente y por lo tanto el color desarrollado es rojo pálido, los tejidos embrionarios afectados por envejecimiento, congelación o daño mecánico tiende a teñirse de rojo intenso. La presencia de tejido firme y sin tinción es reflejo de la no penetración de la solución de TZ y no necesariamente tejido muerto.

Cambios bruscos de color entre tejidos firmes, tejidos normales y tejidos flácidos no teñidos indican que éste último es tejido muerto. Además del color y sus tonos, se pondrá atención a otros factores, como la turgencia de los tejidos, presencia de fracturas y cavidades hechas por insectos.

10.3.6. Cálculo de los resultados

El resultado de la prueba de tetrazolio será el promedio de las semillas viables de las cuatro repeticiones de 100 semillas, expresado en porcentaje y en números enteros; las mismas que deben estar dentro de las tablas de tolerancias establecidas.

Los cálculos se realizarán según lo establecido en el Capítulo 6 de las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas de la ISTA (ISTA, 2013).

Los resultados de viabilidad obtenidos en la prueba topográfica de tetrazolio y la prueba de germinación deben ser semejantes, permitiendo diferencias hasta de 5%.

XI. REFERENCIAS

- Bewley, J.D. and M. Black. (2013). Seeds: Physiology of Development and Germination. 2 ed. New York. London.
<https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=6S75BwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Physiology+of+Development+and+Germination.+2+ed.+New+York.+London&ots=SGscnpEs17&sig=PLk4weTBGc58xUu8r7Cw2mhVgmg#v=onepage&q=Physiology%20of%20Development%20and%20Germination.%202%20ed.%20New%20York.%20London&f=false>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária y Abastecimento (2009) Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuaria-Brasília: Mapa/ACS. 399 p.
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf
- Da Costa, N.P. and J. Marcos-Filho. (1994). Alternative methodology for the Tetrazolium test soybean seeds. Seed Science and Technology 22: 9-17.
- Das, G. and Sen-Mandi, S. 1992. Triphenil tetrazolium chloride staining pattern of differentially aged wheat seed embryos. Seed Science and Technology 20: 367-373.
- Días, M., y Alves, S. (2008). Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes, 30(3), 152-158.
<https://www.scielo.br/j/rbs/a/LYKcqRNVkyQwbZ4G9s5npVj/abstract/?lang=pt>
- França Neto, J.B.; Krzyzanowski, F.C.; Costa, N.P. da. (1998). O teste de tetrazólio em semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 72p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).
<https://www.agrolink.com.br/downloads/TRETRAZ%C3%93LIO.pdf>
- ISTA (2016) Reglas Internacionales para Análisis de las Semillas. Zürichstr. 50, CH-8303 Bassersdorf, Suíza.
https://vri.umayor.cl/images/ISTA_Rules_2016_Spanish.pdf
- ISTA. (2007). Chapter 6: Tetrazolium test. In: International Rules for Seed testing. Seed Science and Technology. 6-10.
- Kruse, M. (1996). Embryo excision versus longitudinal cut in tetrazolium viability determination of cereal seeds. Seed Science and Technology 24: 171-183.
- Leme de Lima Dias, M.C. and A.S. Rego Barros. (1995). Avaliação da qualidade de sementes de milho. Circular N° 88. Instituto Agronômico de Paraná, Londrina – Paraná, Brasil. pp. 43.
<http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=ad&id=36884&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22Dias,%20M.C.%20Leme%20de%20Lima%22&qFacets=autoria:%22Dias,%20M.C.%20Leme%20de%20Lima%22&sort=&paginaActual=1>
- Márquez Piña Rodrigues, Fátima C, y Ferro dos Santos (1988). Manual de análise de sementes florestais. Campinas-São Paulo-Brasil, Fundação Cargill. 100 p.
<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=248366&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22RODRIGUES,%20F.%20C.%22&qFacets=>

[autoria:%22RODRIGUES,%20F.%20C.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1](#)

- Monroy-Vázquez, María E., Peña-Valdivia, Cecilia B., García-Nava, José R., Solano-Camacho, Eloy, Campos, Huitziméngari, & García-Villanueva, Eduardo. (2017). Imbibición, viabilidad y vigor de semillas de cuatro especies de *Opuntia* con grado distinto de domesticación. *Agrociencia*, 51(1), 27-42. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000100027&lng=es&tlng=es.
- Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. Ninth edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 748 p. <file:///C:/Users/Toshiba%20Satellite/Downloads/FGZ5pCgKrOc87v5toFzke1X7FVN8sBUcb03TFADU.pdf>
- Paiva, E., Torres, B., Almeida, J., Da Silva, F., y Torquato, R. (2017). Tetrazolium test for the viability of gherkin seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1), 118-124.
- Salazar, S., Quintero, J. y Rojas, J. (2020). Optimization of the tetrazolium test in three species of orchids of the Andean forest. *Australian Journal of Crop*, 14(05), 822-830.
- Salazar, S., Maldonado, H., y Quintero, J. (2018). Evaluación de la calidad fisiológica de las semillas de *Linum usitatissimum* L. con la prueba de tetrazolio. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(3), 25-35.
- Peske, Silmar Teichert; Villela, Francisco Amaral y Meneghello, Eduardo Geri (2012). *Sementes: fundamentos científicos y tecnológicos*. 3ed. rev. e ampl. Pelotas: Ed. Univ. Federal de Pelotas, 573pp. [https://www.seednews.com.br/edicoes/2-sementes-fundamentos-cientificos-e-tecnologicos-sementes-fundamentos-cientificos-e-tecnologicos-\(3-edicao\)-janeiro-2012](https://www.seednews.com.br/edicoes/2-sementes-fundamentos-cientificos-e-tecnologicos-sementes-fundamentos-cientificos-e-tecnologicos-(3-edicao)-janeiro-2012)

XII. USO DE LOS RESULTADOS Y CONTRIBUCIONES DEL PROYECTO

Los resultados de la presente investigación serán utilizados como una metodología en el control de calidad de la semilla de *Lupinus mutabilis* Sweet en los laboratorios de análisis de semillas públicas y privadas. El proyecto contribuirá directamente a los agricultores usuarios de semilla, a quienes se garantizará la calidad de la semilla para sus siembras y obtener mejores rendimientos y calidad del producto, consecuentemente mayores ingresos económicos y el bienestar de las familias rurales dedicadas al cultivo de Tarwi.

XIII. IMPACTOS ESPERADOS

i. Impactos en ciencia y tecnología

La prueba topográfica de tetrazolio se constituirá en una alternativa metodológica para el control de calidad de las semillas, en especial de las fabáceas. Su impacto en ciencia y tecnología de semillas se evidenciará por la rapidez y seguridad con que se realiza el análisis y la confiabilidad de los resultados.

[illegible]

Redacción del artículo científico										X	X	X	
Publicación del artículo												X	X

XVII. PRESUPUESTO

Descripción	Unidad de medida	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (s/.)
A. Material para desinfección				
Alcohol 70%	Litro	3	15	45
Agua destilada	Litro	5	10	50
Clorox 500 ml	Litro	2	23	46
Parcial				141
B. Material para prueba				
Semilla de Tarwi (muestra)	kg	2	10	20
Bandejas germinadoras	Unidad	20	50	1000
Cloruro 2, 3, 5 trifenil tetrazolio	Frasco	4	400	1600
Bisturí	Unidad	5	15	65
Papel filtro	Paquete	2	30	60
Papel aluminio	Rollo	1	74	74
Plumón indeleble	Unidad	10	3	30
Guantes quirúrgicos	Unidad	10	5	50
Mascarillas descartables	Docena	5	24	120
Cinta plástica	Rollo	2	5	10
Parcial				3029
C. Material para publicación				
Papel 4A	Millar	1	25	25
Lap top	Mes	1	250	250
Internet	Mes	1	70	70
Impresión del artículo	Varios	10	10	100
Parcial				445
Total (S/.)				3615