

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INGENIERÍA AGRONÓMICA



TESIS DE GRADO

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO Y TIEMPO DE
TINCIÓN CON SOLUCIÓN BUFFER PARA EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD EN
SEMILLAS DE TARWI (*Lupinus mutabilis*).**

PRESENTADO POR:

DAVID BENJAMIN CUTILI CHOQUE

LA PAZ – BOLIVIA
2024

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO Y TIEMPO DE
TINCIÓN CON SOLUCIÓN BUFFER PARA EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD EN
SEMILLAS DE TARWI (*Lupinus mutabilis*).**

*Tesis de grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

DAVID BENJAMIN CUTILI CHOQUE

ASESORES:

Ing. M.Sc. Hugo Daniel Bosque Sanchez

Ing. Rodrigo Quispe Pérez

COMITÉ REVISOR:

Ing. Ph.D. Alberto Leandro Figueroa Soliz

Ing. M.Sc. Ruben Jacobo Trigo Riveros

Ing. M.Sc. Rafael Adolfo Murillo Garcia

APROBADA



DEDICATORIA

A Dios padre todo poderoso por su divino amor y vida

A toda mi familia, a mis padres Feliciano Luis Cutili Charca y Pelagia Teodora Choque Mamani por su gran apoyo, el esfuerzo y sacrificio que me brindaron. A mis hermanos Jhonatan Cutili y Mariana Cutili por todo el apoyo y cariño que me brindaron

Durante mi estadía en la universidad.

AGRADECIMIENTO

A Dios por el privilegio de darme la vida y haber permitido que termine este trabajo.

A toda mi familia por creer en mí, Feliciano, Pelagia, Jhonatan, Mariana; a mis tíos Jesús, Elizabeth, Judit y Martha.

A la Universidad Mayor de San Andrés, especialmente a la Facultad de Agronomía por todo el conocimiento que me entregó, a sus autoridades, docentes que fueron parte de mi formación académica y personal administrativo.

A mis asesores: Ing. M.Sc. Hugo Daniel Bosque Sánchez e Ing. Agr. Rodrigo Quispe Pérez, por toda la colaboración que me brindaron asesorando y orientándome, durante toda la etapa de investigación, un agradecimiento muy especial.

Al tribunal examinador: Ing. Ph.D. Alberto Leandro Figueroa Soliz, Ing. M. Sc. Rubén Trigo Riveros e Ing. M.Sc. Rafael Adolfo Murillo Garcia, por las correcciones y observaciones realizadas en la elaboración del documento de tesis.

Un agradecimiento especial al auxiliar de docencia Brandon Mendoza por cederme un espacio en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, por el apoyo y colaboración en el proceso de trabajo de laboratorio y por el tiempo que me brindo muchas gracias.

A mi hermano Jhonathan Cutili por brindarme su cariño y apoyo en los momentos buenos y malos que pase en los años de estudio de la Universidad, por brindarme su colaboración en distintos trabajos que realice en mi faceta de estudiante de la Carrera de Ingeniería agronómica.

A mis padres Feliciano Luis Cutili Charca y Pelagia Teodora Choque Mamani por su constante apoyo, cariño y comprensión a lo largo de mis estudios y a mi queridísima hermana Mariana Cutili por darme ánimos a seguir con los estudios estoy eternamente agradecido.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	2
1.2. Justificación	3
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
2.3. Hipótesis	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Generalidades del Tarwi	4
3.1.1. Taxonomía del Tarwi	4
3.1.2. Morfología de la Planta	4
3.2. Normas de Calidad en Semillas	5
3.2.1. Prueba de Germinación	6
3.2.2. Germinación	6
3.2.3. Porcentaje de Germinación.....	6
3.2.4. Estructuras Esenciales	7
3.3. Concepto y Estructura de la Semilla.....	8
3.4. Viabilidad y Vigor de la Semilla	8
3.4.1. Viabilidad de la Semilla.....	8
3.4.2. Viabilidad	9
3.4.3. Germinación de la semilla.....	9
3.5. Pruebas de Viabilidad y Vigor	10
3.5.1. Prueba de Viabilidad.....	10
3.5.1.1. Germinación en rollos.....	10
3.5.1.2. Prueba de viabilidad	11
3.5.1.3. Prueba topográfica por tetrazolio.....	12
3.5.1.4. Prueba de viabilidad con tetrazolio	13
3.5.2. Vigor de la Semilla	14
3.5.2.1. Pruebas de vigor	16
3.5.2.2. Pruebas directas	16
3.6. Soluciones buffer	18
4. LOCALIZACIÓN	19
4.1. Ubicación	19

4.2. Características del Lugar	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1. Materiales	20
5.1.1. Material Vegetal.....	20
5.1.2. Material de Laboratorio	20
5.1.3. Material Químico o Reactivos	20
5.1.4. Material de Gabinete.....	21
5.2. Metodología	21
5.2.1. Tipo de Investigación	21
5.2.2. Diseño Experimental.....	21
5.2.3. Factores de Estudio	22
5.2.4. Croquis y distribución de tratamientos del experimento	22
5.3. Variables de Respuesta	23
5.3.1. Porcentaje de Viabilidad	23
5.3.2. Porcentaje de Germinación.....	24
5.3.3. Análisis Estadístico	24
5.3.4. Media aritmética	25
5.4. Procedimiento Experimental	25
5.4.1. Para la Prueba de Viabilidad.....	25
5.4.1.1. Preparación del área de trabajo y desinfección	25
5.4.1.2. Preparación de las semillas.....	25
5.4.1.3. Preparación de la solución buffer	26
5.4.1.4. Preparación de soluciones al 0,1%, 0,2%, 0,4% de tetrazolio con solución buffer	26
5.4.1.5. Inmersión de semillas de Tarwi en las soluciones de tetrazolio con buffer	27
5.4.1.6. Coloración	27
5.4.1.7. Lavado de las semillas	27
5.4.1.8. Lectura de semillas	27
5.4.2. Para la prueba de germinación	28
5.4.2.1. Tamaño de la muestra.....	28
5.4.2.2. Preparación de las cajas Petri para sembrar las semillas de Tarwi	29
5.4.2.3. Siembra.....	29
5.4.2.4. Observación	29
5.4.2.5. Evaluación.....	29

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1. Porcentaje de Germinación Directa de Semillas de Tarwi	30
6.1.1. Demostración del Porcentaje de Germinación	31
6.2. Análisis de Variables Independientes Tiempo de Tinción y Concentración de Tetrazolio.	33
6.2.1. Tiempo de Tinción de acuerdo a la Concentración de Tetrazolio.	33
6.2.2. Identificación del Color de la reacción a la sal de tetrazolio con tres diferentes Concentraciones.	34
6.3. Identificación de las Semillas Viables y no Viables	36
6.3.1. Identificación de Semillas Viables	36
6.3.2. Identificación de Semillas no Viables.	38
6.4. Primera prueba: Concentración al 0,1 % de Sal Tetrazolio con Buffer	40
6.5. Segunda prueba: Concentración al 0,2 % de Sal de Tetrazolio con Buffer.....	42
6.6. Tercera prueba: Concentración al 0,4 % de Sal de Tetrazolio con Buffer.....	44
6.7. Tabla General del Porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones	46
6.8. Gráfico General del Porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones	47
6.9. Evaluación de las tres Concentraciones de la Sal de Tetrazolio con Buffer en tres diferentes Tiempos en Semillas de Tarwi	48
6.9.1. Tabla ANVA para calcular si existe diferencias entre las tres Concentraciones de Tetrazolio y Tiempos respectivos de Tinción.	48
6.10. Prueba de DUNCAN para determinar el mejor Tratamiento para la Viabilidad de las Semillas de Tarwi con Tetrazolio.	50
6.10.1. Prueba Duncan para determinar la concentración de Tetrazolio y Tiempo de Tinción	50
6.10.2. Prueba Duncan para determinar la mejor relación de Concentración y Tiempo de Tinción.....	51
6.11. Relación entre Porcentaje de Viabilidad y Porcentaje de Germinación	52
7. CONCLUSIONES	54
8. RECOMENDACIONES	56
9. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadros</u>	Pág.
Cuadro 1. Porcentaje de Germinación de Semillas de Tarwi.....	30
Cuadro 2. Tiempo de Tinción.....	33
Cuadro 3. Identificación de la Coloración de Sal de Tetrazolio.....	34
Cuadro 4. Identificación de Semillas Viables.....	36
Cuadro 5. Identificación de las Semillas no Viables.....	38
Cuadro 6. Concentración al 0,1 % de Sal Tetrazolio con Buffer.....	40
Cuadro 7. Concentración al 0,2 % de Sal de Tetrazolio con Buffer.....	42
Cuadro 8. Concentración al 0,4 % de Sal de Tetrazolio con Buffer.....	44
Cuadro 9. Porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones....	46
Cuadro 10. Análisis de varianza de los factores de estudio.....	48
Cuadro 11. Prueba Duncan para determinar la mejor Concentración.....	50
Cuadro 12. Prueba Duncan para determinar el mejor Tiempo de Tinción.....	50
Cuadro 13. Prueba Duncan relación de Concentración y Tiempo de Tinción.....	51
Cuadro 14. Relación entre Viabilidad y Germinación.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figuras</u>	Pág.
Figura 1. Imagen satelital de la ubicación del experimento.....	19
Figura 2. Distribución de las unidades experimentales.....	23
Figura 3. Corte o pinchazo de la semilla de tarwi.....	26
Figura 4. Demostración del porcentaje de la Germinación entre algodón.....	31
Figura 5. Porcentaje de germinación total.....	32
figura 6. Porcentaje de viabilidad al 0,1 % de sal de Tetrazolio con Buffer.....	40
Figura 7. Porcentaje de viabilidad al 0,2 % de sal de Tetrazolio con Buffer.....	42
Figura 8. Porcentaje de viabilidad al 0,4 % de sal de Tetrazolio con Buffer.....	44
Figura 9. Comparación del porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones.....	47
Figura 10. Relación entre Viabilidad y Germinación.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Anexos</u>	Pág.
Anexo 1. Registro del porcentaje de germinación de semillas de tarwi.....	63
Anexo 2. Reporte para el análisis de concentración de tetrazolio y tiempo de tinción...	63
Anexo 3. Evaluación de germinación.....	64
Anexo 4. Coloración se semillas de tarwi con tetrazolio.....	65
Anexo 5. Procedimiento Experimental prueba de germinación.....	67
Anexo 6. Procedimiento Experimental prueba de viabilidad.....	67

RESUMEN

La tecnología de producción de semillas de calidad se presenta como un desafío para el sector agrícola donde productores, empresas privadas, instituciones públicas y privadas de investigación y de enseñanza, son las que vienen trabajando con especies vegetales en diferentes agroecosistemas.

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio Fisiología Vegetal que son instalaciones de la Carrera de Ingeniería agronómica La Paz, dependiente de la Facultad de Agronomía y Universidad Mayor De San Andrés, teniendo como objetivo obtener una concentración de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado para el análisis de viabilidad de semillas de Tarwi. Este análisis corresponde a una de varias pruebas que se realizan para certificar un tipo de semilla.

El estudio se realizó en base a las Normas Específicas de Certificación de Semillas del INIAF, que permitió verificar inicialmente el estado de semillas de Tarwi antes de realizar la prueba de viabilidad con tetrazolio y la prueba de germinación.

En la prueba de viabilidad, se analizaron 3 concentraciones de tetrazolio amortiguadas con una solución buffer y 3 tiempos de tinción como factores independientes, la variable de respuesta para ambos fue el número de embriones viables. Donde se observó que ambos factores dependían una de otra para obtener mejores resultados. Posteriormente, se realizó análisis a los dos factores de estudio de manera relacionada, se hizo un Análisis de Varianza Bifactorial.

De la relación de los factores de estudio, se pudo determinar que los factores como concentración de tetrazolio con buffer, tiempo de tinción y la interacción de concentración de tetrazolio con buffer y tiempo de tinción presentaba alta significancia. Con este resultado, se logró identificar a tratamientos que podrían ser adecuados para la prueba de tetrazolio.

Para validar los resultados encontrados, se hizo una comparación del porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación a las semillas del mismo lote, mediante el análisis de comparación de medias se identificó a los tratamientos más adecuados para

la prueba de viabilidad, que corresponden al 0,4% de concentración de tetrazolio con 1 hora de tinción.

SUMMARY

The technology for the production of quality seeds is presented as a challenge for the agricultural sector where producers, private companies, public and private research and teaching institutions are the ones that have been working with plant species in different agroecosystems.

The research work was carried out in the Plant Physiology Laboratory, which are facilities of the Agronomic Engineering Career La Paz, dependent on the Faculty of Agronomy and Universidad Mayor De San Andrés, with the objective of obtaining a concentration of tetrazolium and staining time adequate for the viability analysis of Tarwi seeds. This analysis corresponds to one of several tests that are performed to certify a type of seed.

The study was carried out based on the INIAF Specific Seed Certification Standards, which allowed the initial verification of the state of Tarwi seeds before performing the tetrazolium viability test and the germination test.

In the feasibility test, 3 concentrations of tetrazolium buffered with a buffer solution and 3 staining times were analyzed as independent factors, the response variable for both was the number of viable embryos. Where it was observed that both factors depended on each other for better results. Subsequently, analysis was performed on the two study factors in a related way, a Bifactorial Analysis of Variance was made.

From the relationship of the study factors, it was possible to determine that factors such as buffered tetrazolium concentration, staining time, and the interaction of buffered tetrazolium concentration and staining time were highly significant. With this result, it was possible to identify treatments that could be suitable for the tetrazolium test.

To validate the results found, a comparison of the percentage of viability and the percentage of germination was made to the seeds of the same batch, through the analysis of comparison of means, the most suitable treatments for the viability test were identified, which correspond to the 0.4% concentration of tetrazolium with 1 hour of staining.

1. INTRODUCCIÓN

La producción agrícola depende, en su gran mayoría, de las semillas como uno de los insumos más importantes, por lo que es importante el desarrollo continuo y progresivo de esta área con la investigación y apropiación de conocimientos sobre la gran diversidad de especies cultivadas. Algo importante que se debe enfatizar es que las investigaciones se han enfocado en pocos cultivos importantes económicamente. Con el desarrollo de pruebas para evaluar la calidad de las semillas, como es el caso de la determinación de viabilidad por el método del Tetrazolio (TZ). Las pruebas requieren adaptación para semillas de otras especies vegetales cultivadas a menor escala y que paulatinamente han venido adquiriendo mayor importancia. Entre las leguminosas han tomado bastante importancia el tarwi (*Lupinus mutabilis*)

El diagnóstico estimado de vitalidad de una semilla, evaluado con la técnica de Tetrazolio, fue denominada por Lakon como "vitalidad de la semilla", y por lo tanto fue asimilada para el término "poder de germinación" (ISTA, Working Sheets, 2003). Este término se refiere al hecho de que las semillas podrían ser evaluadas con una tinción de tetrazolio para verificar su potencial germinativo.

La Prueba de Tetrazolio está basada en la actividad de ciertas enzimas llamadas deshidrogenasas, las cuáles participan en las reacciones de respiración que se producen en la mitocondria de las células vivas. Estas enzimas están presentes en los tejidos vivos de las semillas, y reducen la solución incolora de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en un color rojo/rosa genéricamente llamado formazan. Cuando las semillas están sumergidas en una solución de tetrazolio, las células vivas de los tejidos sufren una reacción química de óxido reducción donde están presentes las enzimas participantes (Glenner, 1990).

En ese sentido la presente investigación pretende obtener la solución y concentraciones adecuadas de tetrazolio para la determinación de viabilidad de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*).

1.1. Antecedentes

La Prueba de Tetrazolio también provee una rápida evaluación del vigor de semillas viables (Moore, 1985) y fue rápidamente aceptada en Estados Unidos, América del Sur y Europa, donde se aplicó para numerosas especies comerciales. Muchas investigaciones fueron realizadas para explicar el fenómeno de "cuán vivas están las semillas vivas". Esto condujo al uso del análisis de la viabilidad no sólo para encontrar una correspondencia con el poder de germinación de un lote de semillas, sino también a la creación de una herramienta capaz de clarificar aspectos esenciales relacionados al vigor de las simientes. Por lo tanto, la Prueba de Tetrazolio como un método de vigor fue descrito para cereales en general por Lakon (1950) y presentado para semillas de trigo por Perry (1987). Además, esta técnica ha sido usada en maíz (Dias and Barros, 1995), algodón (Santos et al., 1992; Vieira & Von Pinho, 1999), maní (Gelmond, 1962; Moore, 1972; Bittencourt, 1995), soja (França-Neto et al., 1988; Craviotto et al., 1995; Costa et al., 1998; Craviotto et al., 2009), arveja, pino y trébol (AOSA, 1983).

La confiabilidad y la precisión de la prueba de tetrazolio fue revelada por el trabajo de 41 laboratorios que analizaron varias muestras de semillas de soja mediante las pruebas de germinación estándar, envejecimiento acelerado y tetrazolio, y emergencia en arena (França-Neto et al., 1986). La prueba de tetrazolio fue determinada como la segunda prueba más precisa con respecto a la repetibilidad después de la prueba de germinación estándar.

Subsecuentemente, França-Neto et al. (2001, 2002) realizó un referee test involucrando 27 laboratorios de semillas. Ellos concluyeron que la prueba de Tetrazolio fue tan precisa como la prueba de germinación estándar para determinar la viabilidad y fue más precisa que la prueba de envejecimiento acelerado para determinar el vigor. En 2004, França-Neto et al. (2004), concluyeron, sobre una base de 1117 lotes de semillas de soja evaluados entre 1997 y 2002 en Brasil, que el valor de vigor determinado por la prueba de tetrazolio puede ser confiablemente usada para estimar la emergencia potencial de plántulas en condiciones de campo (EPP) cuando la prueba es realizada tres o cuatro semanas antes de la siembra. Se desarrolló una ecuación para predecir la emergencia potencial a campo sobre la base del vigor de las semillas analizadas usando la prueba

de Tetrazolio ($EPP = 0.6165 * \text{Vigor TZ} + 35.716$). Cuando esta ecuación fue analizada para 100 lotes de semillas en 2002, el coeficiente de regresión de 0,79 fue altamente significativo ($P < 0,001$).

1.2. Justificación

Debido a que la información existente para las pruebas de viabilidad por el método topográfico del tetrazolio está enfocada solo en cultivos económicamente importantes, como cereales; se pretende realizar una investigación de pruebas de viabilidad por el método topográfico del tetrazolio en cultivos como las leguminosas tarwi (*Lupinus mutabilis*).

En ese sentido la presente investigación pretende obtener información sobre las soluciones de tetrazolio con buffer acorde a la concentración y tiempo ideal para poder determinar la viabilidad de las semillas de Tarwi.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Obtener la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado con solución buffer para el análisis de viabilidad en semillas de tarwi.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de tetrazolio con solución buffer al 0,1%, 0,2% y 0,4% para el análisis de viabilidad en semillas de tarwi.
- Determinar el tiempo de inmersión adecuado a 1, 2 y 3 horas para el efecto de tinción y análisis de viabilidad en semillas de tarwi.
- Validar el porcentaje de viabilidad obtenido de la concentración y tiempo de tinción adecuado, con el porcentaje de germinación en semillas de tarwi.

2.3. Hipótesis

H_a Existe diferencia en las tres concentraciones de tetrazolio y los tres tiempos de tinción para el análisis de viabilidad de semillas de tarwi.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades del Tarwi

El origen de tarwi proviene de dos culturas antiguas, la egipcia y la andina, hace por lo menos cuatro mil años, fueron las que por primera vez llegaron a domesticar y utilizar en su alimentación dos especies de Lupinus: el Lupinus luteos en Egipto y el Lupinus mutabilis en los Andes. Estas especies fueron utilizadas con semejantes fines de alimentación. Curiosamente las dos culturas primeramente sometieron a estas especies a un proceso de maceración y lavado, para eliminar los alcaloides antes de utilizarlas como alimenticias (Carrillo, 1956). Estas especies de alto valor nutricional con más de 38% de proteína fueron, respectivamente, una de las bases de la alimentación de dichas poblaciones.

3.1.1. Taxonomía del Tarwi

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Sub familia:	Faboideae
Género:	Lupinus
Especie:	Mutabilis
Nombre científico:	Lupinus mutabilis
Nombre común:	Tarwi

3.1.2. Morfología de la Planta

- **La raíz**, que como en toda planta desempeña un rol de sostén y de conducción de la savia, orgánica o inorgánica, desde el suelo hasta los demás órganos, se caracteriza por ser de bastante grosor y pivotante.
- **El tallo** es el órgano aéreo y que en la mayoría de variedades, está constituido por un tallo único de forma cilíndrica a veces ligeramente aplanado. Existe una

alta variación en cuanto a la estructura de la planta sea con un tallo principal prominente o no; así como desde un tallo casi sin ramificación a uno con pocas ramas secundarias o con mucha ramificación.

- **Las hojas** están constituidas por una lámina de tipo digitada con un número variable de foliolos de 5 a 12 de forma oblonga con pequeñas hojas estipulares en la base del pecíolo. Los foliolos pueden ser elípticos o ensanchados hacia el extremo y variar de glabras a tenuemente pubescentes.
- **La flor.** La inflorescencia se considera es un racimo terminal, con las flores dispuestas verticiladamente. Cada flor mide alrededor de 1.2 cm. de longitud y es típicamente con la forma de las papiloneadas, es decir, la corola con cinco pétalos, uno el estandarte dos las quillas y dos las alas. La quilla envuelve al pistilo y a los 10 estambres monodelfos (León, 1964). En una sola planta se puede llegar a contar más de mil flores, cuyos pétalos varían desde el blanco, crema, azul, hasta el púrpura.
- **El fruto** está constituido por una vaina, algo dehiscente; las semillas se acomodan en la vaina en una hilera en un tamaño que varía de 4 hasta 15 mm. La forma de las semillas es elipsoidal, lenticular, algunas redondeadas y otras más bien con bordes más definidos en forma semi cuadrada.
El color de las semillas es muy variable, entre blanca, gris, baya, marrón, negra e incluso de color marmorizado. Algunas semillas blancas tienen una pinta de otro color que puede estar distribuida como una ceja, bigote, creciente o media luna, hasta punteada e incluso marmoleada.

3.2. Normas de Calidad en Semillas

Para la evaluación de calidad de semillas existen métodos y reglas establecidas, publicadas como Normas Específicas de Certificación de Semillas. Estas reglas, adoptadas en Bolivia por la Dirección Nacional de Semillas del INIAF (Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal), fueron elaboradas en base a las reglas del "International Seed Testing Association - ISTA" (Asociación Internacional de Pruebas en Semillas) que representan el resultado de experiencias de investigadores y analistas de todo el mundo.

La Dirección Nacional de Semillas del INIAF, tiene el compromiso de garantizar la disposición de semillas, propagación, calidad genética, fisiológica, física y fitosanitaria (INIAF, 2014), para lo cual, el concepto de semilla certificada debe tener:

- Pureza física: libre de semillas de otros cultivos y malezas, limpia sin basura, rastrojos ni piedrecitas.
- Pureza varietal: que no presenta mezcla de otras variedades genéticamente.
- Respuesta fisiológica: buena germinación, viabilidad y vigor.
- Sanidad: libre de insectos y enfermedades, no debe tener manchas ni perforaciones.

El SEED NEWS (2015) indica que la tecnología de producción de semillas de alta calidad contempla lo genético, fisiológico, física o sanitario además de los principales desafíos para las empresas productoras de semillas de diferentes especies para condiciones de diferentes agroecosistemas y disponibles principalmente por empresas públicas e instituciones de investigación y enseñanza.

3.2.1. Prueba de Germinación

La prueba de germinación determina en una muestra, una proporción de semillas vivas y capaces de producir plantas normales sobre condiciones favorables (ISTA, 2007 y MAPA, 2009).

3.2.2. Germinación

La germinación en laboratorio es la emergencia y desenvolvimiento de las estructuras esenciales del embrión, demostrando su aptitud para producir una planta normal sobre condiciones favorables de campo (ISTA, 2007).

3.2.3. Porcentaje de Germinación

El porcentaje de germinación de semillas en laboratorio, es la proporción del número de semillas que producen plántulas clasificadas como normales, en condiciones y periodos específicos (ISTA, 2007).

3.2.4. Estructuras Esenciales

Para que una plántula llega a ser una planta normal debe presentar las siguientes estructuras esenciales: sistema radicular, parte aérea, yemas terminales y cotiledones; según los géneros serán necesarios otras partes (MAPA, 2009).

Las semillas sometidas a un periodo de germinación (INIAF, 2014; MAPA, 2009; ISTA, 2007), son analizadas de dos formas:

Como semillas que desarrollaron en plántulas pueden ser:

- Normales: Plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desenvueltas, completas, proporcionales y sanas. Es decir, con desarrollo del tallo recto y la raíz presente, raíces secundarias desarrolladas con pelos absorbentes, cotiledones notorios y sanos.
- Anormales: Aquellas que no muestran potencial para continuar su desenvolvimiento y dar origen a plantas normales, pueden ser deformes, desproporcionales y deterioradas. Es decir, no se distingue la raíz, emergieron con tallo y raíz sin proporción, el grosor del tallo que sujeta a los cotiledones es delgado.

Como semillas que no germinaron pueden ser:

- Muertas: Semillas que por lo general han sido atacadas por hongos, y que no han presentado señal de inicio de germinación.
- Duras: Semillas que no pudieron romper dormancia en la hidratación y mantuvieron su estructura endurecida.
- Latentes: Semillas que siendo viables no germinaron con las características necesarias para ser consideradas normales.

Otra categoría de semillas que no germinaron, como:

- Semillas vacías: Que apenas contienen un tejido residual.
- Semillas sin embrión: En las que no existe la cavidad embrionaria o no existe el embrión.
- Semillas dañadas por insectos: Son semillas que contienen larvas o evidencia de ataque de insectos afectando su capacidad germinativa.

3.3. Concepto y Estructura de la Semilla.

La semilla en sentido botánico es un óvulo fecundado, independiente de la planta madre que ha madurado hasta adquirir la diferenciación y capacidad fisiológica, para originar un nuevo vegetal.

Una semilla usualmente consta de un embrión y tejidos nutritivos y cubiertas. La forma, el tamaño, la textura, la consistencia y el color de estas partes son variables según las especies, variedades y aún entre lotes de semillas de la misma especie y variedad, tal como lo menciona Obando y Gomes (2004).

Azcon y Talon (1993), describen que las cubiertas derivan de los tegumentos internos y externo del ovulo. La cubierta externa, denominada testa, suele ser un recubrimiento duro y consistente. Estas características le confieren cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases pudiendo, por tanto, ejercer una función reguladora en la función reguladora del metabolismo de los órganos y de los tejidos internos de la semilla.

Obando y Gomes (2004), mencionan que el embrión posee un eje embrionario que es un tejido de forma alargada con un meristemo en cada punta, y según la especie presenta una o más hojas llamadas cotiledones. El extremo del embrión que da origen al tallo de la planta y que tiene el meristemo cubierto con primordios de hojas se conoce como el epicótilo o plúmula; la parte del embrión que está entre la unión de los cotiledones y con el eje y el meristemo que da origen a la raíz de la radícula se llama hipocótilo.

3.4. Viabilidad y Vigor de la Semilla

3.4.1. Viabilidad de la Semilla

La viabilidad de la semilla es uno de los principales atributos a considerarse en cualquier evaluación de calidad y, en ese sentido, la metodología para el análisis de germinación ha alcanzado un grado de refinamiento tal, que en la actualidad los resultados son altamente confiables y comprobables (FUNDEAGRO, 1989).

No solo el análisis de germinación ha alcanzado un alto grado de refinamiento, pruebas de viabilidad como la de tetrazolio se han venido trabajando en todos los laboratorios del mundo, aminorando el periodo de duración para el diagnóstico del estado en que se encuentra la semilla, con resultados muy convincentes.

3.4.2. Viabilidad

Cuando se habla de viabilidad de semillas en laboratorio se refiere a la estimación de la capacidad germinativa de un lote de semillas, sin importar que sean débiles o que no germinaran en condiciones de campo, así Rodríguez et al. (2008) presenta la relación entre viabilidad, germinación y latencia de la siguiente manera:

$$\text{Semillas viables} = \text{semillas germinadas} + \text{semillas latentes}$$

3.4.3. Germinación de la semilla

La germinación es el proceso mediante el que el embrión adquiere el metabolismo necesario para reiniciar el crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que lo convertirán en una planta adulta. (Obando y Gomes, 2004)

Otro concepto de germinación se da como la etapa que va desde la emergencia y desarrollo de una plántula hasta que el aspecto de sus estructuras esenciales refleje su capacidad para originar una planta normal, bajo condiciones favorables de temperatura, humedad relativa y luz (Barros, 2003).

Peretti (1994), denomina a la germinación como la reanudación de las actividades de crecimiento del embrión, suspendidas o disminuidas al momento de alcanzar la semilla su madurez fisiológica.

Aunque se sabe que la germinación termina cuando la plántula no depende ya, para su existencia de los tejidos nutritivos. No todas las semillas que emiten la radícula, u otro órgano, a través de las cubiertas son capaces de producir una planta con posibilidades de llegar a ser adulta; por ello, en el laboratorio no se consideran como semillas

germinadas aquellas que originan plántulas normales, es decir, que presentan defectos que les impedirán su desarrollo posterior.

La germinación de un lote de semillas se realiza dentro de un intervalo que puede abarcar desde un determinado número de horas, hasta varias semanas, según sean las condiciones ambientales y la especie (Obando y Gomes, 2004).

3.5. Pruebas de Viabilidad y Vigor

3.5.1. Prueba de Viabilidad

Barros (2003), menciona que las pruebas germinación evalúan que las semillas estén vivas y posean el potencial de germinar, generando plántulas normales, cuando son expuestas a condiciones favorables.

3.5.1.1. Germinación en rollos

El ensayo de germinación es el criterio principal y el más aceptado para estudiar la viabilidad de la semilla (Peretti, 1994). La germinación nos da a conocer el valor del lote de semillas para la siembra ya que determina el máximo potencial de germinación del lote de semillas (Gallo, 2006). El potencial máximo de germinación puede usarse para comparar la calidad de diferentes lotes y estimar el valor de siembra (Craviotto y Arango, 2004).

La prueba de germinación en rollos, prueba que se encuentra incluida dentro de las pruebas de germinación estándar ya que evalúa bajo condiciones estándares favorables y determina el máximo porcentaje germinativo.

Barros (2003), hace mención que en la prueba de germinación estándar se realiza un primer conteo preliminar de plantas germinadas y otro final, que otorga el tiempo suficiente a las semillas para que hasta las más débiles puedan germinar. Ambos conteos se llevan a cabo según las recomendaciones hechas por la (ISTA, 1999) en relación al tiempo de evaluación necesario para cada especie.

Las condiciones ambientales en el campo rara vez son óptimas, por lo que las semillas no están sujetas al efecto de condiciones adversas como temperaturas extremas, exceso o deficiencia de agua, obstrucción mecánica en el suelo y microorganismos e insectos que pueden dañarla o destruirla (Alizaga, 1987).

Barros (2003), menciona que la prueba de germinación es realizada bajo condiciones favorables, la relación que muestre con campo donde existen factores adversos, no se muestra suficiente ya que la prueba de germinación esta atribuida de limitantes como:

- Bajo condiciones controladas favorables, puede predecir bien la emergencia en el campo cuando las condiciones en él son cercanas al óptimo. Esta relación generalmente nunca se da. Esto puede concluir en errores en el potencial de la semilla.
- Dependiendo del tiempo de almacenamiento la semilla puede sufrir disminución en la calidad, el primer componente que se muestra es el vigor la cual no es detectada por la prueba de germinación.
- Finalmente, esta prueba no mide la rapidez y uniformidad con la que germina las semillas.

3.5.1.2. Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad nos revela una serie de aspectos esenciales que nos permite conocer la cantidad de semillas que están vivas o latentes (ISTA, 2007). Existen diferentes pruebas que son independientes a la viabilidad de las semillas, entre ellas están la prueba de tetrazolio, prueba con fenolftaleína, prueba con rayos x, pruebas colorimétricas, etc.

En la actualidad hay modernos métodos que permiten determinar el valor de la viabilidad y el vigor, entre ellas, la prueba topográfica por tetrazolio, Esta prueba brinda la posibilidad de obtener los resultados en 24 horas o menos.

3.5.1.3. Prueba topográfica por tetrazolio

Se trata de un instrumento de diagnóstico que muestra detalles importantes como la obtención rápida de valores de potencial de germinación, vigor e identificación de daños mecánicos, del ambiente, de chinches, por calor y por heladas. Su aplicación muestra la diferencia entre tejidos vivos y sanos, débiles, deteriorados y muertos por distinta coloración (Arango y Craviotto, 2006).

Esta prueba se fundamenta en una reacción bioquímica de coloración mediante la cual los tejidos vivos se tiñen de color rojo y los tejidos muertos permanecen sin tinción. Se puede realizar un diagnóstico acerca de la naturaleza de los daños que existen en la semilla y a la vez se puede establecer su nivel de viabilidad y vigor (Craviotto y Arango, 2006). Se utiliza en todas las especies, tanto para determinar viabilidad como vigor (Gallo, 2006).

Peretti (1944), hace mención que esta técnica que no solo informa sobre la viabilidad y el vigor de las semillas, sino también sobre la naturaleza de las lesiones sufridas.

También nos permite visualizar los daños que presentan las semillas tanto en superficies como en tejidos internos (Gallo, 2006). El análisis de los tejidos del embrión permite no solamente indagar en su historia pasada, sino también sobre su performance futura (Peretti, 1994).

En el test de tetrazolio se utiliza una solución incolora de cloruro 2,3,5-trifenil tetrazolio como un indicador para revelar los procesos de reducción que se llevan a cabo en el interior de las células vivas. Después de la solución de tetrazolio es embebida por la semilla, los protones liberados desde las células se combinando el 2,3,5-trifenil tetrazolio y forma un compuesto estable, no difusible, de coloración roja denominada formazan. Esta sustancia hace posible distinguir las áreas vivas de la semilla (áreas de color rojo) y de las partes muertas (áreas blancas sin coloración) (Gallo, 2006).

Craviotto y Arango (2004), concluyen que la concentración de tetrazolio, la temperatura y tiempo de reacción utilizada en el método como así también otros factores como pH, luz pueden afectar la coloración de los tejidos, siendo muy importante indicar las condiciones en que se lleva a cabo la prueba. De la misma manera Delouche (1969), propone en razón a la velocidad de reacción, de la semilla.

3.5.1.4. Prueba de viabilidad con tetrazolio

Según el ISTA (2007) y el MAPA (2009), indican que esta prueba determina rápidamente la viabilidad de semillas, particularmente de aquellas que presentan dormancia, de especies recalcitrantes y las que germinan lentamente en pruebas de rutina. Se determina la viabilidad de las semillas en muestras o individualmente cuando al final de la prueba de germinación ocurre un alto porcentaje de semillas no germinadas.

Dias y Silva (1998), Rodriguez et al. (2008) y Ruiz (2009), indican que la sal de tetrazolio es un indicador oxidante y reductor, y la coloración rojiza difundida en el tejido vivo es el resultado de la reducción de la sal por la acción enzimática, principalmente de la deshidrogenación. La prueba está basada en la actividad de sistemas de enzimas, relacionadas con la actividad respiratoria de los sistemas biológicos, capaces de catalizar las reacciones durante la glicólisis y el ciclo de Krebs, tornándose inactivas con la pérdida de viabilidad de los tejidos.

Durante los procesos respiratorios, sustancias intermedias son producidas y sirven de substratos para las enzimas, iones de hidrógeno son transferidos al tetrazolio, que actúa como un receptor de hidrógeno.

El tetrazolio es reducido a una sustancia de color rojizo, insoluble y estable, denominado formazan. Como esa reacción ocurre en el interior de las células y el pigmento no es difundido, hay un delineamiento nítido entre el tejido vivo, que adquiere la coloración rojiza, y el tejido muerto que permanece sin alteración de color ya que no hay respiración. La distribución de las áreas vivas y muertas en las semillas puede ser vista y conforme a su localización, permite evaluar la viabilidad de las semillas.

3.5.2. Vigor de la Semilla

En 1977 la ISTA definió vigor como "la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel potencial de actividad y desarrollo de esta o de un lote, durante la germinación y emergencia de las plántulas". Dos años más tarde, la Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983) definió como vigor "aquellas propiedades de las semillas que determinan la rapidez, uniformidad potencial de emergencia y desarrollo de plántulas normales, bajo un amplio rango de condiciones de campo (Barros, 2003).

Moreira (1988), define al vigor como, el resultado de la conjunción de todos aquellos atributos de la semilla que permiten la obtención rápida y uniforme de la población en el campo.

Quiros y Carrillo (1998), también lo define como el potencial biológico de la semilla que favorece un establecimiento rápido y uniforme bajo condiciones incluso desfavorables de campo.

Lanusse (1998), denomina al vigor como propiedad fisiológica determinada por el genotipo y modificada por el ambiente, que gobierna la habilidad de una semilla de producir rápidamente una plántula en el campo, y el límite hasta el que la semilla tolera una serie de factores ambientales. También se denomina vigor a la suma total de aquellas propiedades de las semillas que determinan su nivel de actividad y capacidad de germinación (Barboza, 1990). Estos conceptos se han venido formando a través del periodo de trabajo que se realizan para la identificación del vigor.

Los requerimientos necesarios para ser cumplidos por las pruebas de vigor se pueden resumir en cuatro. Las cuales estuvieron dadas por Salinas y Yoldjian (2001).

- Tener una buena base teórica, más que estar basado en una relación empírica.
- Ser relativamente simple y barato, para poder ser utilizado, requiriendo un mínimo de equipamiento técnico sofisticado que permita ser adaptado.

- Tiene que haber una buena relación entre los resultados de la prueba y el resultado práctico de la prueba de vigor.
- Mostrar un comportamiento semejante entre lotes de semillas en relación a su comportamiento potencial y repetitividad de los resultados, tanto dentro, como entre laboratorios.

Ciertos lotes de semillas que presentan porcentajes de germinación elevados y similares pueden presentar comportamientos diferenciados cuando son sembrados en condiciones idénticas sin estrés en el campo, en este caso es importante evaluar el vigor (Salinas y Yoldjian, 2001).

Así, el vigor de una semilla será un indicador de su rapidez de germinación y emergencia, lo que, en gran medida, determinará el éxito de establecimiento de un cultivo. Mientras más vigorosa sea ésta, más rápida, uniforme y con mayor número de plántulas normales podrá ser su germinación y emergencia.

Las pruebas de vigor son más sensibles a la pérdida de calidad de las semillas que las pruebas de germinación estándar, porque hacen que se manifiesten las diferencias potenciales de los lotes. La primera señal del deterioro de la calidad de una muestra de semilla es la disminución del vigor, seguido por una reducción en la germinación y terminando con la muerte de las mismas, tal como lo señala Giachino y Gall Y (2004).

Sin embargo, sus resultados no necesariamente entregan un pronóstico de la emergencia, sino que dan oportunidad al consumidor de determinar si un lote de semillas es superior a otro. El grado de esta superioridad estará dado por la constitución genética del lote de semillas, las condiciones ambientales que hubo durante su período de desarrollo en la planta madre, las características del almacenamiento y, finalmente, por las condiciones de estrés ambiental que ocurran en el campo, en el año en que las semillas son sembradas. Dichas condiciones pueden ser tan severas que impidan la emergencia, incluso para los lotes de semillas más vigorosas (Barros, 2003).

El primer componente de la calidad que muestra señales de deterioro es el vigor de las semillas, seguido por una reducción en la germinación o de la producción de plántulas normales, y finalmente la muerte de las semillas (Salinas y Yoldjian, 2001).

Finalmente, como las Pruebas de Vigor son más sensibles para determinar la calidad de las semillas, pierden validez rápidamente y por lo tanto los intervalos de retesteo con respecto a la germinación deben ser más cortos (Barros, 2003). Esto significa que hay que repetirlos con mayor frecuencia que una prueba de germinación estándar.

De acuerdo con Peretti (1994), una manera de clasificar las pruebas de vigor es en directas e indirectas.

3.5.2.1. Pruebas de vigor

Las pruebas de vigor se dividen en directas e indirectas que son mostradas a continuación.

3.5.2.2. Pruebas directas

Se expone a las semillas, bajo condiciones controladas en el laboratorio, a los factores adversos (estrés) que se esperan reduzca la emergencia en campo.

Como ejemplo la prueba de frío (Col Test), las pruebas directas, son difíciles de estandarizar entre laboratorios y tienden a dar resultados más variables que las pruebas de germinación (UNALM, 2004).

Peretti (1994), menciona que las pruebas de vigor directas reproducen en el laboratorio las condiciones a campo. Los factores de estrés que se supone reducen la emergencia a campo son impuestos bajo condiciones controladas en el laboratorio (test de frío).

Sin embargo, estas pruebas han sido criticadas porque no detectan diferencias de calidad cuando las semillas son expuestas a condiciones de suelo favorables (Barros, 2003).

a) Prueba de frío

El fundamento teórico de esta prueba es que la condición fría y húmeda del suelo retarda la actividad tanto de la semilla como de los microorganismos del suelo (FUNDEAGRO, 1989).

Sin embargo, como las semillas están es desventaja relativamente mayor, serán más susceptibles al ataque de microorganismos causantes de la pudrición. Las semillas vigorosas producirán plantas capaces de resistir el ataque de estos microorganismos mayor grado de semillas débiles (UNALM, 2004).

Peretti (1994), señala que los resultados entregados por esta prueba, en especies como maíz y soya, han mostrado una buena correlación con la emergencia en el campo.

Esta prueba fue inicialmente desarrollada para maíz, en la actualidad ha sido adaptada para poroto, soya, sorgo, zanahoria, remolacha, cebolla y maravilla (Peretti, 1994), donde las condiciones de trabajo varían en el número de semillas evaluadas, la temperatura utilizada y los días de evaluación.

Barros (2003), señala que, bajo ciertas condiciones ambientales, puede existir mejor correlación entre los resultados de esta prueba y la emergencia de campo, que entre la prueba de germinación estándar y la emergencia, lo que, por ejemplo, la ha transformado en una prueba obligatoria para certificar semillas de maíz en Austria.

b) Pruebas indirectas

Son aquellas en las que se evalúan o miden una determinada característica de las semillas, que posteriormente se correlacionan con su performance en el campo.

La prueba de conductividad eléctrica es otra prueba indirecta, que se emplea comúnmente para arveja (*Pisum sativum*). En ella se mide el contenido de electrolitos lixiviados en agua desionizada en la cual se ha remojado las semillas por 24 horas a 20° C.

Otra de las pruebas es la del envejecimiento acelerado, en la cual se somete a la semilla a condiciones de alta temperatura y humedad relativa por un tiempo que varía según la especie. Estas condiciones inducen a un aumento en el ritmo de deterioro fisiológico de la semilla, y por lo general existe una buena correlación entre el porcentaje de semillas que sobreviven al tratamiento y el porcentaje de emergencia en campo (UNALM, 2004).

3.6. Soluciones buffer

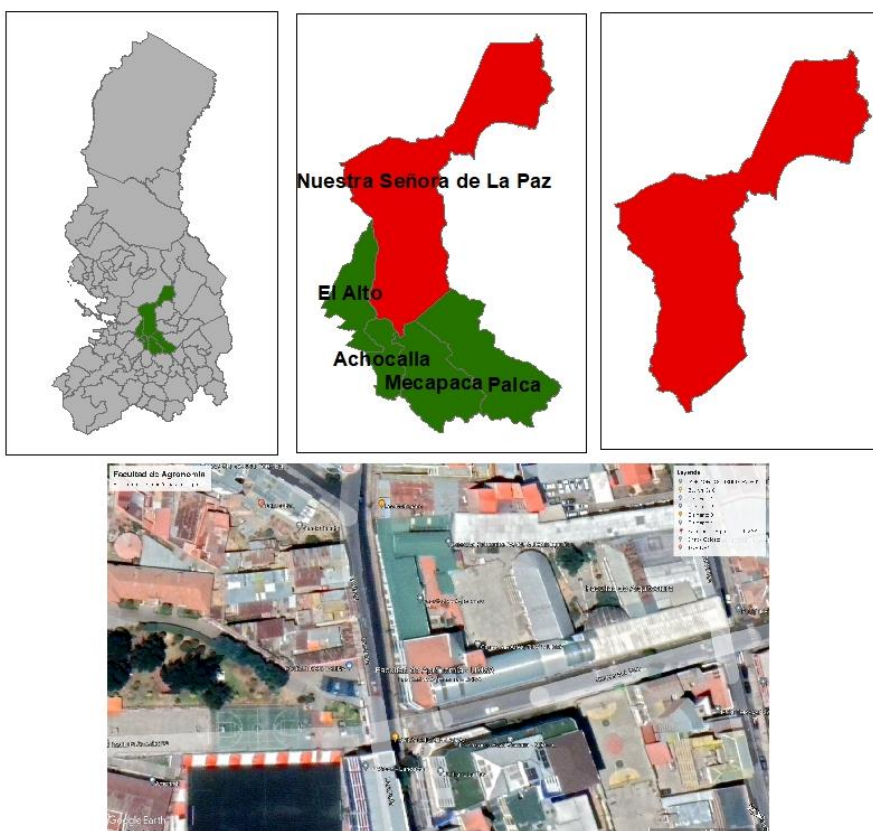
Las soluciones buffer son soluciones acuosas que contienen una combinación de un ácido débil y su base conjugada. Estas soluciones se utilizan para mantener el pH de una solución dentro de un rango específico, evitando cambios bruscos en la acidez o alcalinidad. Los tampones se utilizan ampliamente en diversos campos científicos, como la bioquímica, la biología molecular y la química analítica.

Según Michael Thompson y Paul De Bièvre, autores del artículo "Principles and Applications of Buffer Solutions in the Analytical Laboratory" (2002), los buffers son esenciales para mantener el pH constante en reacciones bioquímicas y en experimentos de laboratorio, ya que muchas enzimas y Las biomoléculas son sensibles a los cambios en el pH. Los tampones también se utilizan para regular el pH en técnicas de electroforesis, cromatografía y espectrofotometría.

Además, en el libro "Principles of Biochemistry" (2017) de Albert L. Lehninger, David L. Nelson y Michael M. Cox, se destaca la importancia de los buffers en la regulación del pH intracelular y en la estabilidad de las biomoléculas. Estos autores explican cómo los tampones biológicos, como el sistema fosfato o el sistema bicarbonato, son esenciales para mantener el pH adecuado en procesos fisiológicos y en el funcionamiento de enzimas específicas.

4. LOCALIZACIÓN

4.1. Ubicación



FUENTE: *Google Earth (2023)*

Figura 1. Imagen satelital de la ubicación del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía; que está ubicada en la Av. Landaeta esquina Héroes del Acre La Paz, Bolivia a una altitud de 3600 msnm y 16°30' 0" latitud Sur y 68°9' 0" de longitud Oeste.

4.2. Características del Lugar

La Facultad de Agronomía tiene por misión la formación de profesionales de alto nivel académico, la generación y difusión de tecnología, sobre la base de una actividad de investigación y el desarrollo de labores de integración social.

El objetivo central de la Facultad de Agronomía es la formación de profesionales en el campo agrícola y ganadero y, mediante la investigación que fomenta, difundir los conocimientos generados hacia la población, dependiente de la agropecuaria. Teniendo en sus instalaciones el laboratorio de Fisiología Vegetal que es uno de los muchos laboratorios que alberga esta casa de estudios superior, en el cual se realizó la presente investigación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Material Vegetal

- Semillas de Tarwi

5.1.2. Material de Laboratorio

- Cajas Petri (36 unidades)
- Vasos precipitados (6 unidades)
- Varillas de vidrio (2 unidades)
- Matraz aforado (1 unidad)
- Pipetas (2 unidades)
- Pissetas (1 unidad)
- Algodón (800 g)
- Goteros
- Papel secante
- Bisturí, estilete juego de pinzas
- Balanza analítica (600 g)

5.1.3. Material Químico o Reactivos

- Tetrazolio (15 g)
- Ácido acético (50 ml)
- Acetato de sodio (40 g)
- Agua destilada (5 L)
- Alcohol al 70 %

5.1.4. Material de Gabinete

- Ordenador Pc o laptop (Microsoft OFFICE, INFO STAT)
- Flash memory 16G
- Cámara fotográfica
- Lápices, bolígrafos, marcadores, cuadernos, tableros, etc.
- Impresora, papel tamaño carta

5.2. Metodología

La metodología empleada se basa en Hernández et al., (1991) para considerar la aplicación de normas de calidad y principios de laboratorio en la prueba de viabilidad con tetrazolio y germinación, identificación de variables de respuesta y análisis estadístico.

5.2.1. Tipo de Investigación

La investigación tiene un inicio descriptivo en el procedimiento experimental, más adelante, para el análisis de resultados en función a los factores de investigación y variables de respuesta se torna correlacional, por tanto, la investigación tiene un estudio mixto.

5.2.2. Diseño Experimental

Para la relación de tetrazolio con solución buffer, concentración y tiempo se utilizó un diseño estadístico completamente al azar bifactorial con cuatro tratamientos. En contexto se definió en función a los factores de estudio concentración de tetrazolio con solución buffer y tiempo de inmersión.

El modelo estadístico:

$$y_{ijk} = u + \alpha + \beta + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Una observación cualquiera

u = Media general

α = Efecto de i-ésimo tratamiento factor A

β = Efecto de j-ésimo tratamiento factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel del (factor A) y el j-ésimo nivel del (factor B)

ε_{ijk} = Error experimental

5.2.3. Factores de Estudio

Los factores de estudio fueron estructurados de la siguiente manera:

Factor A: concentración de tetrazolio con solución buffer

A1: Concentración de tetrazolio con solución buffer a 0,1%

A2: Concentración de tetrazolio con solución buffer a 0,2%

A3: Concentración de tetrazolio con solución buffer a 0,4%

Factor B: tiempo de inmersión

B1: tiempo 1 hora

B2: tiempo 2 horas

B3: tiempo 3 horas

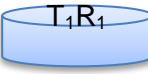
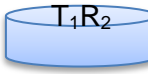

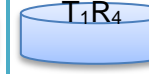
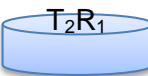

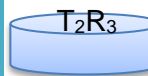

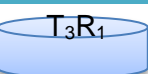
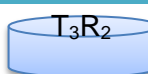


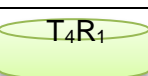
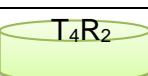
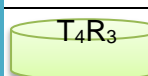
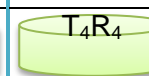
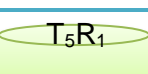
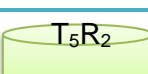
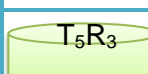

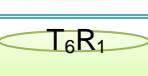
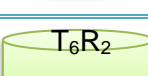






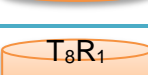
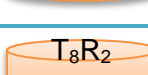






5.2.4. Croquis y distribución de tratamientos del experimento

Fueron planteados 9 tratamientos que se presenta a continuación:

Unidades experimentales: 36 unidades

Semillas: 10 semillas/caja Petri

Figura 2. Distribución de las unidades experimentales

Croquis y distribución de tratamientos en semillas de Tarwi						
Factor (A)	Factor (B)		Repetición I	Repetición II	Repetición III	Repetición IV
Concentración de Tetrazolio con Solución Buffer al 0,1%	Tiempo 1 hora	T ₁				
	Tiempo 2 horas	T ₂				
	Tiempo 3 horas	T ₃				
Concentración de Tetrazolio con Solución Buffer al 0,2%	Tiempo 1 hora	T ₄				
	Tiempo 2 horas	T ₅				
	Tiempo 3 horas	T ₆				
Concentración de Tetrazolio con Solución Buffer al 0,4%	Tiempo 1 hora	T ₇				
	Tiempo 2 horas	T ₈				
	Tiempo 3 horas	T ₉				

5.3. Variables de Respuesta

5.3.1. Porcentaje de Viabilidad

MAPA (2009) indica que el resultado de viabilidad puede ser presentado en números enteros y en porcentaje.

Se consideraron 10 semillas de cada unidad experimental, se contaron los embriones viables de las cuatro repeticiones para hallar el valor promedio, luego se dividió por la cantidad de embriones de la unidad experimental y se multiplicó por 100 para hallar el porcentaje, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{valor promedio de embriones viables}}{10} * 100$$

Se realizó el conteo y la verificación de semillas teñidas de Tarwi después de haber sido sumergidas en las soluciones de tetrazolio con buffer de cada tratamiento.

5.3.2. Porcentaje de Germinación

MAPA (2009) menciona que el resultado de la prueba de germinación es la media de las repeticiones de las plántulas normales, se presenta en número entero y en porcentaje; la suma de los porcentajes de las plántulas normales, plántulas anormales, semillas duras, durmientes y muertas debe dar un total del 100%.

Se consideraron 10 semillas de cada unidad experimental, se contaron las plántulas normales de las cuatro repeticiones para hallar el valor promedio, luego se dividió por la cantidad de semillas de la unidad experimental y se multiplicó por 100 para hallar el porcentaje, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\%Germinacion = \frac{\text{valor promedio de plantulas normales}}{10} * 100$$

El porcentaje de germinación valida el porcentaje de viabilidad que demuestran nuestras soluciones de tetrazolio con buffer, validando el nivel óptimo de concentración y tiempo de tinción de las soluciones.

5.3.3. Análisis Estadístico

Para la evaluación independiente y comparativa de la concentración de Tetrazolio con buffer (tz), y Tiempo (t) de tinción se utilizó el ANVA para analizar los efectos de cada uno de los factores de estudio como también de la relación de los mismos, el paquete computacional estadístico que permitió este análisis fue el INFO STAT.

5.3.4. Media aritmética

Para promediar los datos registrados, se utilizó la media aritmética

$$\left(\bar{m} = \frac{\sum x_i}{n}\right); x_i = i \text{ datos}; n = \text{cantidad total de datos}$$

5.4. Procedimiento Experimental

El procedimiento consistió en evaluar la viabilidad de semillas de tarwi con tetrazolio, combinadas con una solución buffer (solución amortiguadora de pH); preparándolas en tres distintas concentraciones y tres tiempos de tinción. Se hizo un análisis independiente de cada factor de estudio, luego se analizó a los factores de manera relacional. Los resultados encontrados tuvieron que ser validados mediante la comparación del porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación.

5.4.1. Para la Prueba de Viabilidad

5.4.1.1. Preparación del área de trabajo y desinfección

Se adecuaron las instalaciones donde se llevó a cabo las pruebas experimentales, para ello se realizó la desinfección del área de trabajo, en este caso se realizó la desinfección del laboratorio de fisiología vegetal con una total limpieza del piso y mesas, con detergente y lavandina; por último, se desinfecto el ambiente con soluciones de hipoclorito de sodio al 70%, para evitar que existan agentes patógenos que pudieran haber afectado al desarrollo de la investigación.

Por último, concluimos con la limpieza correcta de las cajas Petri, vasos de precipitado, matraces, probetas, pipetas y varillas, lavándolas con detergente y lavandina. Finalmente, se las seco con papel absorbente y así dejar limpio el material de laboratorio con los cuales se trabajó en el experimento.

5.4.1.2. Preparación de las semillas

– Hidratación

las semillas fueron colocadas en recipientes con agua destilada para ser embebidas e hidratarse durante 48 horas, para así iniciar la actividad de las

enzimas deshidrogenasas; además de ablandar los tejidos, y más fácil de cortarlos o pincharlos.

– **Corte o pinchazo**

Permite el contacto del TZ con los tejidos del embrión. En algunas especies, por ejemplo, en el caso del tarwi, el corte no fue necesario ya que el embrión de esta semilla es visible, y es así que se le realizó un pinchazo a cada semilla cerca al embrión y el TZ es adicionado a la semilla intacta. Como se observa en la Figura 3.



Figura 3. Corte o pinchazo de la semilla de café (Días y Silva 1998)

5.4.1.3. Preparación de la solución buffer

Se midió 10,6 ml de ácido acético y se la aforo a 225 ml con agua destilada, luego se pesó 11,23 g de acetato de sodio y se la aforo a 274 ml con agua destilada. Posteriormente se tomó 225 ml de ácido acético disuelto y se la mezcló con 274 ml de acetato de sodio disuelto. Posteriormente se aforo la solución buffer hasta llegar a 500 ml.

5.4.1.4. Preparación de soluciones al 0,1%, 0,2%, 0,4% de tetrazolio con solución buffer

- Se peso 0,5 g de tetrazolio y se mezcló con 500 ml de la solución buffer.
- Se peso 1 g de tetrazolio y se mezcló con 500 ml de la solución buffer.
- Se peso 2 g de tetrazolio y se mezcló con 500 ml de la solución buffer.

5.4.1.5. Inmersión de semillas de Tarwi en las soluciones de tetrazolio con buffer

Después del acondicionamiento previo de las semillas de tarwi, se incorporó la solución de tetrazolio con buffer a las cajas Petri ya acondicionadas, para inmediatamente sumergir diez semillas de Tarwi en tres distintos niveles de concentración de tetrazolio con solución buffer (0,1%, 0,2%, 0,4%) respectivamente, en este procedimiento se realizó el control y cronometraje de los tres distintos tiempos de estudio (1, 2 y 3 horas.) respectivamente para cada tratamiento a una temperatura de 8°C.

5.4.1.6. Coloración

Una vez ya sumergidas las semillas en la solución de tetrazolio con buffer, la células vivas y metabólicamente activas dentro de las semillas comienzan a interactuar con el tetrazolio. La reacción química que se genera con las deshidrogenasas lleva a la reducción del tetrazolio y producen un producto final coloreado. El cambio de color resultante es un indicador de la actividad metabólica y la viabilidad de las semillas.

Las semillas vivas o viables en buen estado y metabólicamente activas a través de la reacción química redujeron el tetrazolio dando el lugar a un producto coloreado que se acumuló en las células del embrión de las semillas en forma de cristales o pigmentos. Por otro lado, las semillas muertas o no viables no dieron el producto coloreado por la falta de actividad metabólica que impidió la reducción del tetrazolio.

5.4.1.7. Lavado de las semillas

Después de la coloración según el tiempo establecido, las muestras fueron retiradas de los vasos de precipitado y lavadas en agua corriente con ayuda de un tamizador para devolverla al vaso de precipitado conteniendo también agua corriente.

5.4.1.8. Lectura de semillas

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

Se Clasifico las semillas en viables y no viables.

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

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

Posteriormente los mesones del laboratorio sirvieron de base para extender papel toalla asegurando los extremos con mazquin, luego se colocó en la superficie las semillas que fueron sometidos a la coloración, separándolos uno de otros con ayuda de una pinza; se utilizó un lente de aumento para observar las semillas coloreadas por la reacción química, que al entrar en contacto con la solución de tetrazolio se redujeron las enzimas presentes en las células viables y metabólicamente activas de las semillas, y finalmente se realizó el conteo del número de semillas que colorearon a dicho efecto de la reacción química, para determinar el porcentaje de viabilidad de una pequeña población de semillas de Tarwi. (ver Anexo 4 y 6).

El número de embriones viables de cada muestra, fue registrado en la Hoja de Registro de Coloración (Anexo 2).

Las muestras fueron aprobadas cuando el porcentaje de viabilidad fue mayor al 80% como recomienda INIAF (2014).

5.4.2. Para la prueba de germinación

Para esta prueba, se prepararon cajas petri esterilizadas con hipoclorito de sodio. La base elegida fue algodón para simular el sustrato (ver Anexo 5).

5.4.2.1. Tamaño de la muestra

Fueron evaluadas 360 semillas de tarwi, divididas en tres sub muestras de 120 semillas, cada sub muestra fue equivalente a una unidad experimental.

5.4.2.2. Preparación de las cajas Petri para sembrar las semillas de Tarwi

Se preparó 36 cajas Petri con una base de algodón en forma de cama acolchonada, para una vez ya realizado la prueba de viabilidad, sembrar las semillas de tarwi y validar la concentración y tiempo necesarios del experimento con el porcentaje de germinación.

5.4.2.3. Siembra

Una vez ya preparadas las 36 cajas petri con una base de algodón que simulan el sustrato para las semillas de tarwi, en cada una se sembraron 10 semillas, el sustrato simulado (algodón) fue humedecido con agua destilada. Después de asegurar las cajas petri con sus tapas, se los llevó a los mesones del laboratorio donde se esperó la germinación de las semillas.

5.4.2.4. Observación

Se observó el desarrollo de las plántulas a los 3, 6 y 9 días.

5.4.2.5. Evaluación

Se hizo el conteo del número de semillas que desarrollaron como plántulas normales (ver Anexo 3).

El INIAF (2014), determina que una muestra es aprobada cuando el porcentaje de germinación es mayor al 70%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Porcentaje de Germinación Directa de Semillas de Tarwi

En el Cuadro 1 se muestra el análisis de la prueba germinación de la accesión de semillas de tarwi, fue realizado en el Laboratorio de fisiología vegetal de la carrera de Ingeniería Agronómica que se encuentra en la Facultad de Agronomía-UMSA. Dichas semillas fueron adquiridas del laboratorio de INIAF para posteriormente trasladarlas a los ambientes de aclimatación.

Cuadro 1. Porcentaje de germinación de semillas de tarwi

PRUEBA DE GERMINACION DIRECTA						
N°	PORCENTAJE DE GERMINACION (%)					MEDIA
	I	II	III	IV	\bar{x}	
1	90	90	100	100	95	91
	80	100	80	90	88	
	90	90	90	90	90	
2	90	90	100	90	93	93
	80	80	90	100	88	
	100	100	90	100	98	
3	90	90	90	100	93	94
	90	100	90	90	93	
	100	90	100	90	95	
MEDIA GENERAL						93

Porcentaje de germinación basado en el resultado obtenido de germinación directa entre algodón, de las semillas de tarwi certificados por el Laboratorio de INIAF.

En este cuadro se muestra el porcentaje de germinación de las tres sub grupos de semillas de tarwi, obteniendo el primer grupo un 91% de germinación y 93% el segundo grupo, por último, el grupo 3 obteniendo un mayor porcentaje de germinación que equivale al 94% de viabilidad. Promediando el porcentaje de germinación de los tres grupos nos da un 93% de germinación.

Según ISTA (2004); La germinación de una semilla es la emergencia y desarrollo de las plántulas, hasta un estado en el cual el aspecto de sus estructuras esenciales indica si

será posible que se desarrollen como plantas normales, bajo condiciones favorables de suelo.

6.1.1. Demostración del Porcentaje de Germinación

Análisis del de porcentaje de germinación de las semillas de tarwi, donde se evaluaron tres grupos de la misma semilla con cuatro replicas para tener mayor precisión en la toma de datos, se evaluaron mediante el número de semillas germinadas las cuales serán piloto a la prueba de viabilidad. Se observa los resultados en las Figuras 4 y 5.

Figura 4. Demostración del porcentaje de la germinación entre algodón

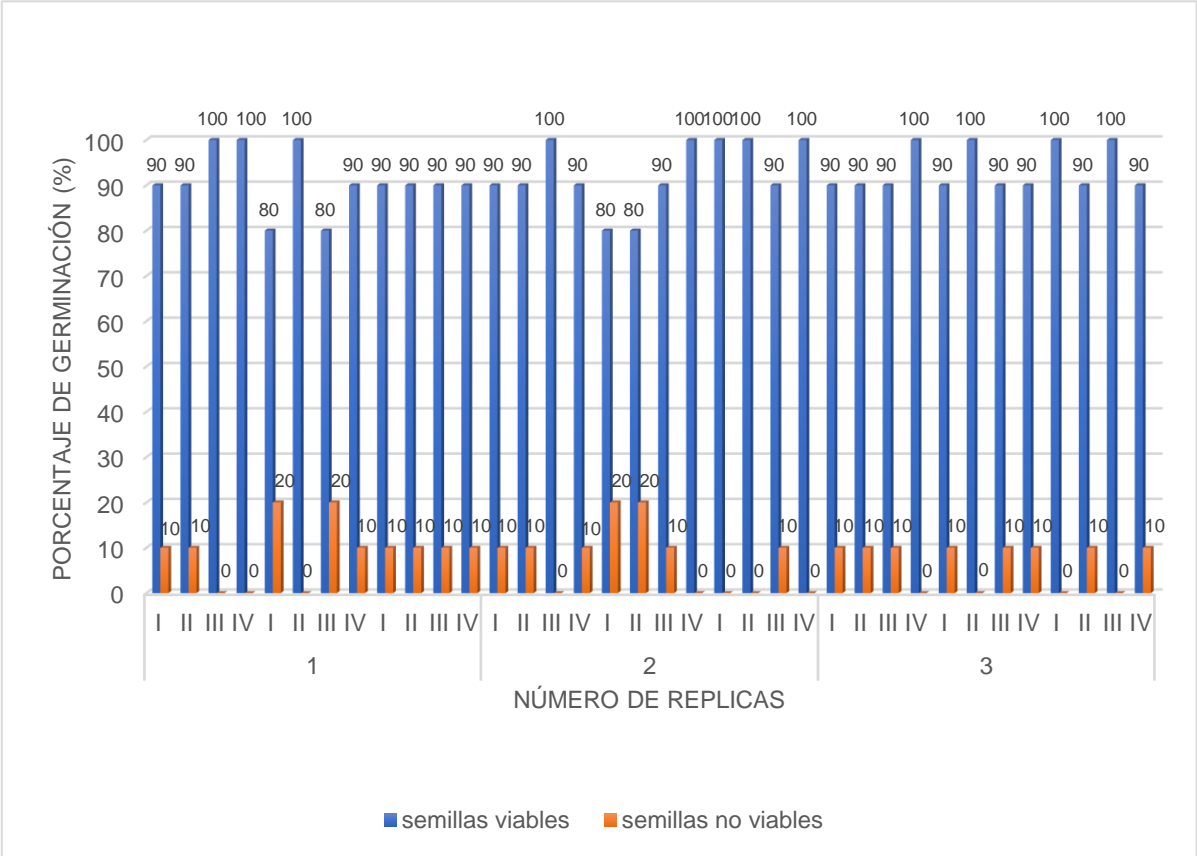
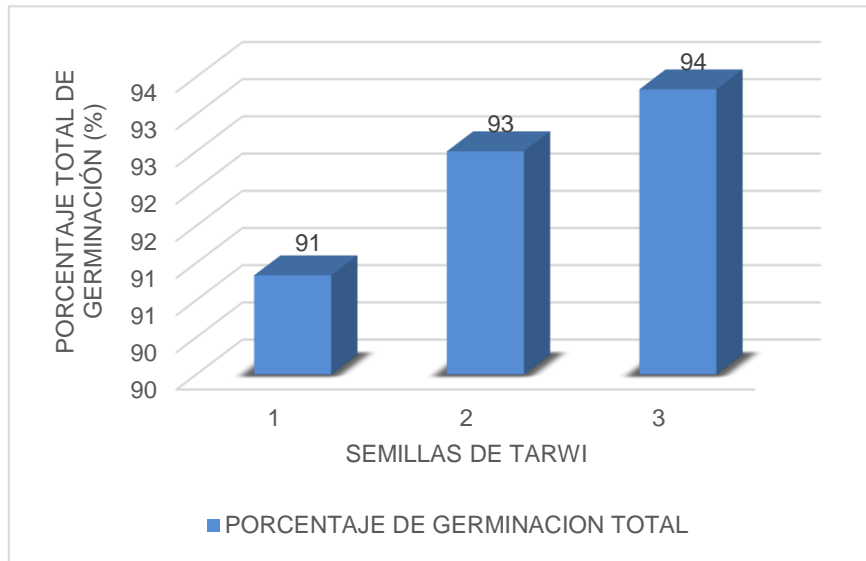


Figura 5. Promedios de Porcentaje de germinación total



En la Figura 4 se puede observar el porcentaje de germinación que obtuvo cada caja Petri donde se sembraron las semillas de tarwi, que en su mayoría obtuvieron un porcentaje entre 80% a 100% de germinación.

En la Figura 5 se puede observar los promedios de germinación totales de los tres grupos de semillas de tarwi que fueron sembrados en cajas Petri con una base de algodón. Donde se observa que se obtuvo un alto porcentaje de germinación en los tres grupos los cuales fueron de 91%, 93% y 94% respectivamente, esto se debe a que las semillas son certificadas por el laboratorio del INIAF.

6.2. Análisis de Variables Independientes Tiempo de Tinción y Concentración de Tetrazolio.

6.2.1. Tiempo de Tinción de acuerdo a la Concentración de Tetrazolio.

Los diferentes tiempos de tinción (1, 2 y 3 horas) que se utilizaron para determinar el tiempo más adecuado de acuerdo a la concentración de tetrazolio, se consiguió mediante el número de embriones viables que respondieron a los tiempos utilizados.

Cuadro 2. Tiempo de tinción

CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO	TIEMPO DE TINCION	TEMPERATURA
0,1%	3 horas	8°C
0,2%	2 horas	8°C
0,4%	1 hora	8°C

En el Cuadro 2 se muestra los tiempos de tinción que fueron necesarios para cada concentración de sal de tetrazolio.

Con la concentración al 0,1 % se necesitó 3 horas de reposo en la solución de tetrazolio con buffer a una temperatura de 8°C.

Con la concentración al 0,2 % se necesitó 2 horas de reposo en la solución de tetrazolio con buffer a una temperatura de 8°C.

Con la concentración al 0,4 % se necesitó 1 hora de reposo en la solución de tetrazolio con buffer a una temperatura de 8°C.

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

En las semillas de tarwi se pudo observar que con la concentración al 0,4 % se pudo observar mejor los tejidos de la semilla y por lo tanto se debe esperar 1 hora para la tinción y para obtener mejores resultados en la lectura de viabilidad.

Con los tiempos de 2 y 3 horas se tuvo inconvenientes para la lectura, ya que las semillas se tornaban guindas oscuras lo que dificultaba diferenciar los embriones teñidos.

6.2.2. Identificación del Color de la reacción a la sal de tetrazolio con tres diferentes Concentraciones.

El Cuadro 3, presenta los datos descriptivos de tinción en el análisis de viabilidad considerando la concentración de tetrazolio. El cuadro presenta la descripción de las semillas y embriones teñidos de acuerdo a la concentración de tetrazolio para determinar los parámetros de viabilidad de la semilla de tarwi.

Cuadro 3. Identificación de la coloración de sal de tetrazolio

CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO	SEMILLA	EMBRIÓN Y COTILEDOS
0,1%	Se muestra teñido de color rosado pálido	Teñidos de color rosado pálido
0,2%	Se muestra teñido de color rosado vivo (se puede observar con mayor claridad)	Teñidos de color rosado vivo
0,4%	Se muestra teñido de color rosado intenso y rojo vivo (con mayor dificultad de observación)	Teñidos de color rosado intenso y rojo vivo

En el Cuadro 3 se muestra las diferencias de coloración de las semillas de tarwi con la reacción a la sal de tetrazolio con buffer.

– **Concentración al 0,1 %**

Utilizando una concentración de 0,1 % se pudo observar los tejidos de las semillas tanto como el embrión como los cotiledones, que son los órganos principales para determinar la viabilidad de la semilla, no obstante, no se pudo observar con la suficiente claridad que se requiere visualmente.

Con esta concentración hubo dificultad para la observación del embrión ya que presento una tinción de color rosado pálido que dificulto la lectura.

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

Concentración al 0,2 %

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

La semilla obtuvo una tinción de color rosado vivo y con ayuda de una lupa se pudo realizar la lectura de los lotes de semilla de tarwi.

– Concentración al 0,4 %

Claramente se observó una tinción de color rosado intenso a rojo vivo, lo cual facilito al momento de realizar la lectura de las semillas, ya que con esa coloración fue mucho más fácil poder diferenciar con claridad tanto a las semillas viables como a las no viables; a excepción de las semillas que se tiñeron de color rojo vivo a guindo ya que al estar más tiempo sumergidas en esta concentración sufrieron daños en los tejidos.

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

6.3. Identificación de las Semillas Viables y no Viables

6.3.1. Identificación de Semillas Viables

Las diferentes concentraciones de tetrazolio (0,1%, 0,2% y 0,4%) se utilizaron para determinar cuál o cuáles serían las más adecuada para determinar la viabilidad de semillas de tarwi. En el Cuadro 4 se resume la descripción de las semillas viables de acuerdo a la concentración de tetrazolio.

Cuadro 4. Identificación de semillas viables

CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO	SEMILLA	EMBRION
0,1%	Sin teñir	Teñido de color rosado pálido, en el cual se puede observar, pero con mayor dificultad que está vivo
0,2%	Sin teñir, por lo que se observa que es viable	Teñido de color rosado vivo, en el cual se puede observar que está vivo
0,4%	Completamente sin teñir, el cual muestra ser viable	Teñido de color rosado intenso, en el cual se puede observar claramente los tejidos vivos

En el Cuadro 2 se muestra la coloración que obtuvieron las semillas viables:

Con la concentración de 0,1 % obtuvo una tinción de color rosado pálido, el embrión quedo teñido, pero no con claridad; lo cual indica que la semilla es viable.

Con la concentración de 0,2 % el embrión se tiño de color rosado vivo y mostro el resto de la semilla completamente sin teñir el cual nos indicó que la semilla es viable.

Con la concentración de 0,4 % la semilla se tiñó y con ayuda de una lupa se observó que el embrión se tiñó de color rosado intenso a rojo vivo el cual también indicó que la semilla es viable.

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

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

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

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

6.3.2. Identificación de Semillas no Viables.

En el Cuadro 5 se resume la descripción de las semillas no viables de acuerdo a la concentración de tetrazolio.

Cuadro 5. Identificación de las semillas no viables

CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO	SEMILLA	EMBRION
0,1%	Teñido de color rojo, en el cual se puede observar claramente los tejidos muertos	Completamente teñido de color rojo, el cual muestra ser no viable
0,2%	Teñido de color rojo vivo, en el cual se puede observar los tejidos muertos	Completamente teñido de color rojo vivo, el cual muestra ser no viable
0,4%	Teñido de color guindo, en el cual se puede observar con mayor dificultad los tejidos muertos	Teñidos de color guindo, de igual manera se observa, pero con mayor dificultad que son tejidos muertos

En el cuadro 5 se muestra la coloración que obtuvieron las semillas no viables:

Con la concentración al 0,1 % se observó que las semillas se tiñeron de color rosado intenso, quedando el embrión teñido de color rojo el cual muestra que es una semilla no viable.

De igual manera con la concentración de 0,2 % el embrión quedo teñido de color rojo el cual se lo identifico como no viable.

Con la concentración de 0,4 % y un tiempo de 2 a 3 horas, tanto la semilla como el embrión quedaron teñidos de color guindo, y con ayuda de una lupa se pudo observar que el embrión tomo un color guindo oscuro, el cual determino ser no viable.

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

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

Según Hampton y Tekrony (1995), En la Prueba Topográfica por Tetrazolio se pone especial atención en todas las partes de cada semilla, particularmente en las características internas del embrión.

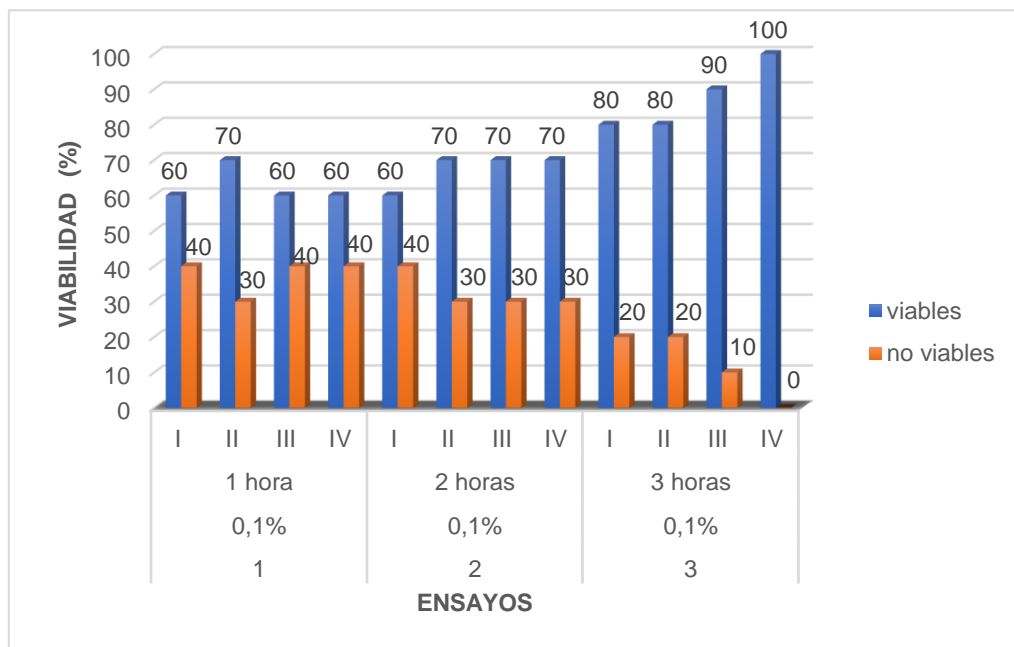
6.4. Primera prueba: Concentración al 0,1 % de Sal Tetrazolio con Buffer

En el Cuadro 6 se muestra la concentración de tetrazolio al 0,1% y tiempos de tinción que se utilizaron para determinar cuál o que tiempo es más adecuado. se evaluaron mediante el número de embriones viables que responden a la concentración utilizada.

Cuadro 6. Concentración al 0,1 % de tetrazolio con solución buffer

N°	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE TINCIÓN	REPETICIÓN	VIABLES	NO VIABLES
1	0,1%	1 hora	I	60	40
			II	70	30
			III	60	40
			IV	60	40
2	0,1%	2 horas	I	60	40
			II	70	30
			III	70	30
			IV	70	30
3	0,1%	3 horas	I	80	20
			II	80	20
			III	90	10
			IV	100	0

Figura 6. Porcentaje de viabilidad al 0,1 % de tetrazolio



En el Cuadro 6 y Figura 6 se muestra la comparación de las semillas viables y no viables con la concentración al 0,1 % de sal de tetrazolio

Obteniendo un resultado no muy optimo al momento de realizar la lectura de las semillas ya que con esta concentración se observa con poca claridad tanto los tejidos vivos como los muertos.

El tiempo de tinción que se necesitó para el remojo en la concentración de 0,1 % de tetrazolio fue de 3 horas a temperatura de 8°C.

De los 3 ensayos analizadas se observó que en el ensayo 3 presento mayor viabilidad que se observó 87,5 % de semillas viables y un 12,5 % de semillas no viables.

En el ensayo 1 se observa un 62,5 % de semillas viables y un 37,5 % de semillas no viables.

En el ensayo 2 se observa un 67,5 % de semillas viables y 32,5 % de semillas no viables.

Teniendo en cuenta que se realizaron 3 ensayos para la concentración 0,1 % de tetrazolio con solución buffer en semillas de tarwi con porcentajes de viabilidad diferentes, de acuerdo al lote de semillas de tarwi la prueba de germinación nos dio un porcentaje de 91% de germinación, con la prueba de tetrazolio el porcentaje de viabilidad es un 87,5 % con la concentración de 0,1% se puede decir que se no se obtuvo un buen resultado en la lectura de semillas viables y no viables.

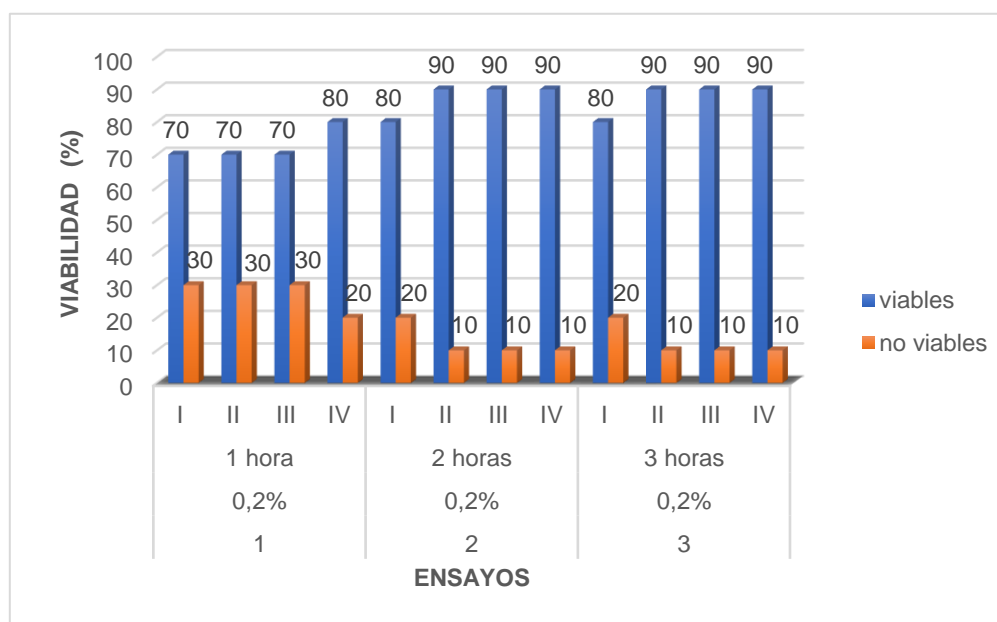
6.5. Segunda prueba: Concentración al 0,2 % de Sal de Tetrazolio con Buffer

En el Cuadro 7 se muestra la concentración de tetrazolio al 0,2% y tiempos de tinción que se utilizaron para determinar cuál o que tiempo es más adecuado. se evaluaron mediante el número de embriones viables que responden a la concentración utilizada.

Cuadro 7. Concentración al 0,2 % de sal de tetrazolio

N°	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE TINCIÓN	REPETICIÓN	VIABLES	NO VIABLES
1	0,2%	1 hora	I	70	30
			II	70	30
			III	70	30
			IV	80	20
2	0,2%	2 horas	I	80	20
			II	90	10
			III	90	10
			IV	90	10
3	0,2%	3 horas	I	80	20
			II	90	10
			III	90	10
			IV	90	10

Figura 7. Porcentaje de viabilidad al 0,2 % de tetrazolio



En el Cuadro 7 y Figura 7 se observa de igual manera la comparación de las semillas viables y no viables en los 3 ensayos de semillas de tarwi utilizando la concentración de sal de tetrazolio al 0,2 %.

Aquí se pudo observar una coloración rosado vivo en las semillas con el cual se distinguió las semillas vivas de las muertas.

El tiempo de tinción para esta concentración al 0,2 % de sal de tetrazolio fueron 2 horas a temperatura de 8°C.

De los tres ensayos analizados se observó que el ensayo dos y tres presentaron mayor viabilidad, se observó en ambos casos un 87,5 % de semillas viables y un 12,5 % de semillas no viables teniendo en cuenta que una vez ya llegado a las 3 horas se mantuvo el número de semillas teñidas por la reacción química que al entrar en contacto con la solución de tetrazolio se redujeron las enzimas presentes en las células viables y metabólicamente activas de las semillas.

En el ensayo 1 se observa un 72,5 % de semillas viables y un 27,5 % de semillas no viables.

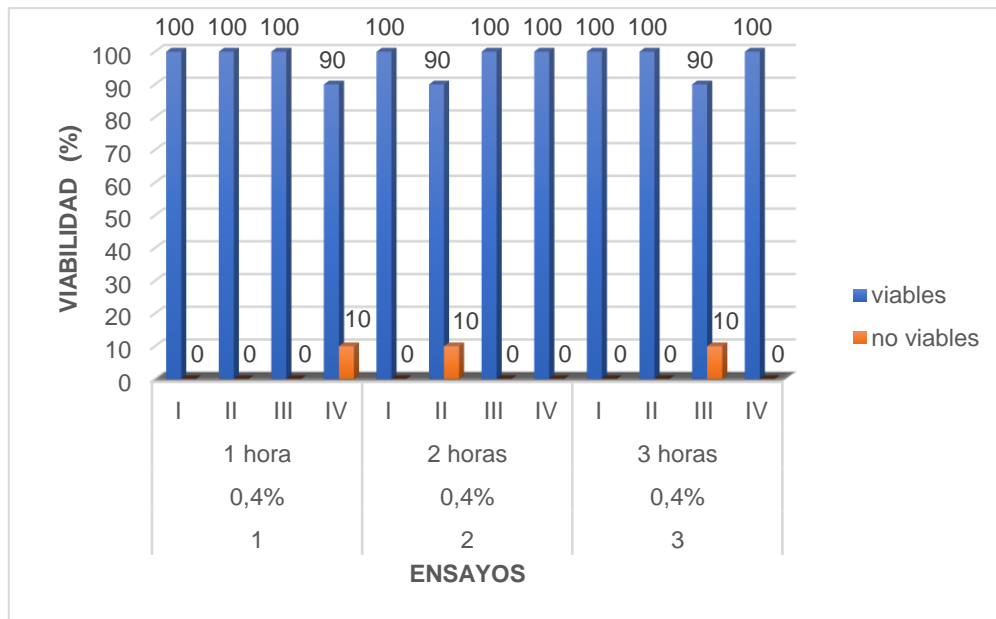
6.6. Tercera prueba: Concentración al 0,4 % de Sal de Tetrazolio con Buffer

En el Cuadro 8 se muestra la concentración de tetrazolio al 0,4% y tiempos de tinción que se utilizaron para determinar cuál o que tiempo es más adecuado. se evaluaron mediante el número de embriones viables que responden a la concentración utilizada.

Cuadro 8. Concentración al 0,4 % de sal de tetrazolio

N°	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE TINCIÓN	REPETICIÓN	VIABLES	NO VIABLES
1	0,4 %	1 hora	I	100	0
			II	100	0
			III	100	0
			IV	90	10
2	0,4 %	2 horas	I	100	0
			II	90	10
			III	100	0
			IV	100	0
3	0,4 %	3 horas	I	100	0
			II	100	0
			III	90	10
			IV	100	0

Figura 8. Porcentaje de viabilidad al 0,4 % de tetrazolio



En el Cuadro 8 y Figura 8 se observa de igual manera la comparación de las semillas viables y no viables en los 3 ensayos de semillas de tarwi utilizando la concentración de sal de tetrazolio al 0,4 %.

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

El tiempo de tinción necesario para esta concentración al 0,4 % fue de 1 hora a una temperatura de 8°C.

De los tres ensayos analizados se observó que el ensayo uno presentó mayor viabilidad observando un 97,5 % de semillas viables y un 2,5 % de semillas no viables.

En los ensayos dos y tres nos muestran el mismo porcentaje de viabilidad, pero con la dificultad de realizar la lectura correcta de las semillas ya que estas obtuvieron una tinción de color rojo muy intenso a guindo, el cual dificulto mucho en la lectura de los embriones.

Ya dicho anteriormente se utilizaron tres ensayos de semillas de diferentes porcentajes de germinación en el cual se observa que en el ensayo uno de la prueba de viabilidad, no se relacionó con el porcentaje de germinación directa que tuvo la semilla anteriormente.

Pudiendo decir que la concentración al 0,1 % de sal de tetrazolio no es aconsejable para la determinación de viabilidad de las semillas de tarwi.

6.7. Tabla General del Porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones

El Cuadro 9, presenta los datos registrados en el análisis de viabilidad considerando la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción. El cuadro presenta el porcentaje de embriones viables y no viables.

Cuadro 9. Porcentaje de semillas viables y no viables con las tres concentraciones

N°	CONCENTRACIÓN DE TETRAZOLIO	TIEMPO DE TINCIÓN	REPETICIÓN	VIABLES	NO VIABLES
1	0,1%	1 hora	I	60	40
			II	70	30
			III	60	40
			IV	60	40
2	0,1%	2 horas	I	60	40
			II	70	30
			III	70	30
			IV	70	30
3	0,1%	3 horas	I	80	20
			II	80	20
			III	90	10
			IV	100	0
1	0,2%	1 hora	I	70	30
			II	70	30
			III	70	30
			IV	80	20
2	0,2%	2 horas	I	80	20
			II	90	10
			III	90	10
			IV	90	10
3	0,2%	3 horas	I	80	20
			II	90	10
			III	90	10
			IV	90	10
1	0,4%	1 hora	I	100	0
			II	100	0
			III	100	0
			IV	90	10
2	0,4%	2 horas	I	100	0
			II	90	10
			III	100	0
			IV	100	0
3	0,4%	3 horas	I	100	0
			II	100	0
			III	90	10
			IV	100	0

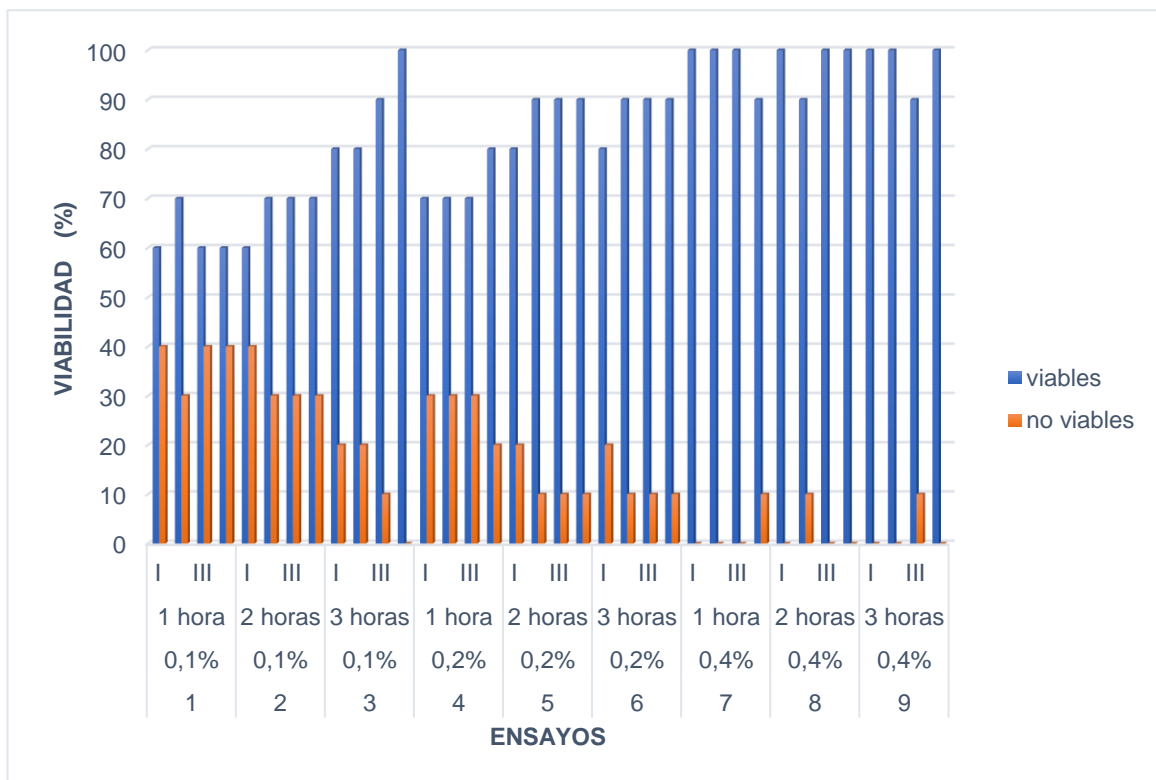
En el Cuadro 9 se muestra el porcentaje general de las tres concentraciones de sal de tetrazolio con buffer y tiempos respectivos, cada una ellas en combinación realizadas como tratamientos en las semillas de tarwi con cuatro repeticiones de cada ensayo. Ya que las semillas que se utilizaron fueron adquiridas del laboratorio de INIAF las cuales contaban con un rendimiento mayor a 90 % de germinación.

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

6.8. Gráfico General del Porcentaje de Semillas Viables y no Viables con las tres Concentraciones

En la Figura 9 se puede observar la comparación de semillas viables y no viables de las tres concentraciones (0,1%, 0,2% y 0,4%) tiempos (1, 2 y 3 horas) de tinción, que se utilizaron para determinar cuál sería la más adecuada para determinar la viabilidad de semillas de tarwi.

Figura 9. Comparación del porcentaje de semillas viables y no viables con las tres concentraciones



En el Cuadro 9 y figura 9 se muestra el porcentaje general de las tres concentraciones de sal de tetrazolio con buffer realizada en las semillas de tarwi con cuatro repeticiones de cada tratamiento. Ya que las semillas que se utilizaron fueron del laboratorio de INIAF y contaban con rendimiento mayor a 90% de germinación.

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

Teniendo en cuenta que el grupo tres contaba con mayor rendimiento de germinación.

6.9. Evaluación de las tres Concentraciones de la Sal de Tetrazolio con Buffer en tres diferentes Tiempos en Semillas de Tarwi

6.9.1. Tabla ANVA para calcular si existe diferencias entre las tres Concentraciones de Tetrazolio y Tiempos respectivos de Tinción.

El ANVA con dos factores de estudio (concentración de tetrazolio y tiempo de tinción) permitió conocer la relación de dependencia en la interacción “Tetrazolio x Tiempo”, como se observa en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Análisis de varianza de los factores de estudio

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Ft		Sig.
					0,05	0,01	
SOL. TT. con BUFFER	2	3800	1900	58,63	3,35	5,49	**
TIEMPO	2	1066,67	533,33	16,46	3,35	5,49	**
SOL. TT. Con BUFFER * TIEMPO	4	933,33	233,33	7,2	2,73	4,11	**
ERROR EXP.	27	875	32,41				
TOTAL	35	6675					

$$CV = 6,76 \% \text{ Media} = 8,4$$

De este análisis se obtiene CV (%) = 6,76 %, como este valor es menor al 8 % para investigaciones en laboratorio (Arteaga, 2023), indica que existió un buen manejo y los datos son confiables y cuantificables.

A su vez, la media $\bar{x} = 8,4$ representa al promedio de la cantidad de embriones coloreados del total de semillas que fueron analizadas.

Los resultados del Cuadro 10 indican que hubo significancia en los efectos principales (concentración de tetrazolio con buffer y tiempo) lo que permite deducir que cada factor analizado por separado presenta una diferencia; por otro lado, se observa de igual forma que hubo significancia en la interacción de “**tetrazolio con buffer * tiempo**”, esta relación indica que ambos factores si presentan valores significativos cuando se los combina.

Cuando la concentración de tetrazolio es 0,1% y 0,2% su comportamiento se ajusta a un modelo lineal positivo que indica a que a mayor tiempo mayor cantidad de embriones viables.

Por otro lado, para la concentración de tetrazolio al 0,4 %, la mayor cantidad de embriones viables se consiguió en tres tiempos, a 1, 2 y 3 horas con cantidades iguales.

Sin embargo, la cantidad de embriones viables es igual (8,75) cuando la concentración de tetrazolio interactúa con el tiempo, como ser: a 0,1% en 3 horas, a 0,2% en 2 y 3 horas y por último a 0,4 % en 1 hora el promedio de cantidad de embriones viables es 9,75.

Con lo anterior, podemos indicar que la reacción del tetrazolio depende de la cantidad de tetrazolio y un tiempo limitado.

Con 2 de las 3 interacciones, se deduce que a mayor concentración de tetrazolio menor tiempo empleado. Esta conclusión fue practicada por algunos investigadores que obtuvieron buenos resultados, entre ellos: Dias y Silva (1998) que realizaron la prueba de tetrazolio en semillas de café con la solución de tetrazolio al 1% de concentración durante 14 y 16 horas de tinción; Zonta et al., (2009) que trabajo con una concentración de tetrazolio a 0,1% durante 16 horas; Clemente et al., (2011) y Freitas (2013) que trabajaron a una concentración de tetrazolio al 0,5% durante 2 y 3 horas de tinción.

No obstante, la tercera interacción indica que la mayor concentración de tetrazolio no requiere mayor tiempo del que se emplea en las anteriores, porque la cantidad de embriones viables será semejante al de los otros tratamientos debido a que tienen la misma edad de almacenamiento. Así Dias y Silva (1998) mencionan que, según el tiempo de almacenamiento o post cosecha de las semillas, puede requerir diferentes tiempos de permanencia en la solución de tetrazolio para la coloración de los embriones.

6.10. Prueba de DUNCAN para determinar el mejor Tratamiento para la Viabilidad de las Semillas de Tarwi con Tetrazolio.

6.10.1. Prueba Duncan para determinar la concentración de Tetrazolio y Tiempo de Tinción

Cuadro 11. Prueba Duncan para determinar la mejor Concentración

SOL. TZ. Con BUFFER	MEDIAS	DUNCAN $\alpha= 0,05$
C3	97.5	A
C2	82.5	B
C1	72.5	C

Como bien se puede observar en el Cuadro 11 de las tres concentraciones analizadas la concentración tres (C₃) a 0,4 % de sal de tetrazolio con buffer fue el que dio mejores resultados al momento de interactuar con las semillas de tarwi, con un promedio de 97,5 % de viabilidad.

Por otro lado, con la concentración 2 (C₂) a 0,2 %, obtuvo un promedio de 82,5 % de semillas viables y la concentración 1 (C₁) a 0,1 % un 72,5 %. Por tanto, mientras mayor sea la concentración de sal de tetrazolio mayor será el porcentaje de viabilidad.

Cuadro 12. Prueba Duncan para determinar el mejor tiempo de tinción

TIEMPO	MEDIAS	DUNCAN $\alpha= 0,05$
T3	90.83	A
T2	84.17	B
T1	77.5	C

En el Cuadro 12 se puede observar los tres tiempos de estudio, el tercer tiempo (T_3) a 3 horas de inmersión en la sal de tetrazolio con buffer fue el que dio mejores resultados al momento de interactuar con las semillas de tarwi, con un promedio de 90,83 % de viabilidad.

Por otro lado, el segundo tiempo (T_2) a 2 horas de inmersión en la sal de tetrazolio con buffer, obtuvo un promedio de 84,17 % de semillas viables y el primer tiempo (T_1) a 1 hora un 77,5 %. Por tanto, mientras mayor sea el tiempo de inmersión de las semillas en la sal de tetrazolio mayor será el porcentaje de viabilidad.

6.10.2. Prueba Duncan para determinar la mejor relación de Concentración y Tiempo de Tinción

Cuadro 13. Prueba Duncan relación de concentración y tiempo de tinción

TRATAMIENTOS	MEDIAS	DUNCAN $\alpha= 0,05$
T-7	97.5	A
T-8	97.5	A
T-9	97.5	A
T-6	87.5	B
T-5	87.5	B
T-3	87.5	B
T-4	72.5	C
T-2	67.5	C - D
T-1	62.5	D

En el Cuadro 13, se puede observar la prueba DUNCAN, se observa con las letras las diferencias que existen en los tratamientos, donde se obtuvo mayor rendimiento en los T-7, T-8 Y T-9, los demás tratamientos no muestran diferencias significativas. sin embargo, los tratamientos 8 y 9 desde un análisis visual se las califica como no factibles por el motivo de que teñían en exceso los embriones de las semillas de tarwi, lo que dificultó en el momento de realizar la lectura, por lo cual se descartan estos tratamientos. Mencionado lo anterior podemos concluir que los tratamientos que difieren según la prueba de DUNCAN son, T-7 (C_3T_1); T-8 (C_3T_2) y T-9 (C_3T_3) con 97,5 % respectivamente, mientras que los demás tratamientos no difieren entre ellos.

6.11. Relación entre Porcentaje de Viabilidad y Porcentaje de Germinación

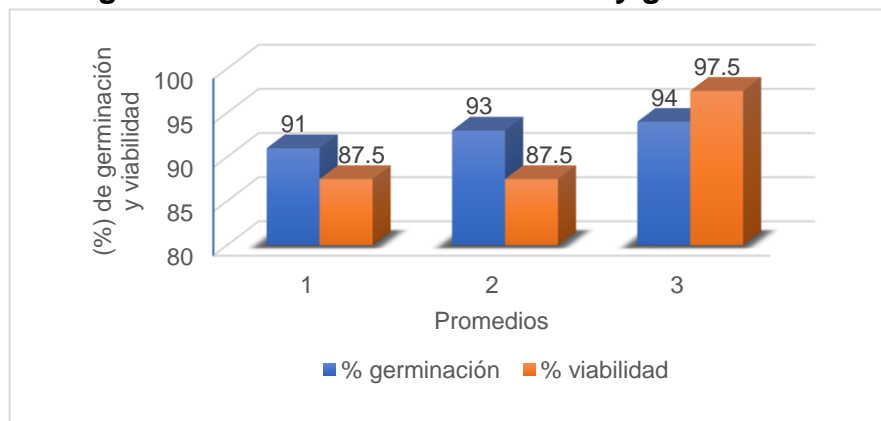
La relación entre el porcentaje de viabilidad con el porcentaje de germinación, indica la coherencia de los resultados encontrados en relación al comportamiento de las semillas de tarwi, resultados que pueden ser aceptados o rechazados, se muestran el en Cuadro 14.

Cuadro 14. Relación entre Viabilidad y Germinación

grupo de semillas	Prueba de germinación		Prueba de tetrazolio al (0,1; 0,2 y 0,4 %)		Tratamiento
	(%) germinación	promedio	medias	C y T	
1	95	91	62.5	C ₁ T ₁	T-1
	88		67.5	C ₁ T ₂	T-2
	90		87.5	C ₁ T ₃	T-3
2	93	93	72.5	C ₂ T ₁	T-4
	88		87.5	C ₂ T ₂	T-5
	98		87.5	C ₂ T ₃	T-6
3	93	94	97.5	C ₃ T ₁	T-7
	93		97.5	C ₃ T ₂	T-8
	95		97.5	C ₃ T ₃	T-9

En la Figura 10 se observa la existencia de relación en la prueba de germinación directa y la prueba de tetrazolio en semillas de tarwi. Se utilizó los resultados de los porcentajes obtenidos en la germinación directa y los porcentajes obtenidos de la prueba de tetrazolio.

Figura 10. Relación entre viabilidad y germinación



Los resultados obtenidos muestran que, en la prueba de germinación directa, en el grupo 3 de semillas de tarwi obtuvo el 94 % de germinación directa, mientras que en la prueba de sal de tetrazolio al 0,4%, se obtuvo un 97,5 % de viabilidad, existiendo una diferencia de 3,5 % de viabilidad en ambas pruebas. Mientras que en el grupo 2 de semillas, se obtuvo un mayor porcentaje con la prueba de germinación directa con 93%, siendo superior a la prueba de tetrazolio con un 87,5 %. Finalmente, en el grupo 1 de semillas obtuvieron resultados de igual manera con un porcentaje de germinación de 91 %, siendo igual superior al porcentaje de viabilidad con 87,5 %. por lo cual queda demostrado que al utilizar una concentración de 0,4% de sal de tetrazolio en semillas de tarwi, se obtienen lecturas más precisas para determinar la viabilidad.

Por lo cual se demuestra que existe una asociación entre la prueba de germinación directa y la prueba de sal de tetrazolio al 0,4 %. Ya que existe una diferencia menor al 10% entre ambas pruebas, el mismo que está dentro del parámetro de aceptación, según el Laboratorio de semillas INIAF.

Rodriguez et al., (2008), indica que es importante la relación entre viabilidad y germinación por lo que una prueba de tetrazolio que no se combine con una prueba de germinación, solo permitirá definir el porcentaje de semillas viables, es decir, la tasa máxima de germinación que se puede obtener, sin tener en cuenta las semillas débiles o latentes que no germinarán en condiciones de campo.

7. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación permiten establecer las siguientes conclusiones.

- Los niveles de concentración de tetrazolio analizados como un factor independiente tienen una diferencia altamente significativa, lo cual nos deja la siguiente conclusión; a mayor concentración de la solución de tetrazolio con buffer habrá una mayor reacción en las células vivas y metabólicamente activas de las semillas; llegando reducirse la sal de tetrazolio con mayor antelación, y colorear con más claridad los embriones de las semillas de tarwi.
- Los tiempos de tinción analizados como un factor independiente presenta de igual manera una diferencia altamente significativa; ya que en el experimento se pudo observar lo siguiente, mientras más tiempo permanezcan sumergidas las semillas en la solución de tetrazolio con buffer, las células vivas y metabólicamente activas de los embriones llegaron a una reacción química donde se redujeron a un punto de dañar el tejido vivo de las semillas, dificultando la lectura de los embriones coloreados donde se observó que llegaron a colorear de un rosado intenso pasando a un rojo intenso y por último a guindo. Todo lo anteriormente mencionado respecto a la concentración y tiempo, lo cual nos lleva a lo siguiente conclusión.
- Se pudo observar la diferencia altamente significativa en la interacción de **“Tetrazolio x Tiempo”**, esta reacción indica que ambos factores presentan dependencia de correspondencia.
- La cantidad de embriones viables es igual a 8,75 cuando la concentración de tetrazolio interactúa con el tiempo, fue comprobado para tres interacciones: al 0,1% en 3 horas, al 0,2% en 2 y 3 horas. Para una cuarta interacción donde la concentración es a 0,4% en 1 hora los embriones viables fueron igual a 9,75. La cuarta interacción indica que la mayor concentración de tetrazolio no requiere

mayor tiempo del que se emplea en las anteriores, porque la cantidad de embriones viables será igual o mayor al de los otros tratamientos debido a que tienen la misma edad de almacenamiento.

- La validación de los resultados de viabilidad y germinación permitió confirmar que el porcentaje de viabilidad siempre será mayor al porcentaje de germinación. Los niveles de concentración de tetrazolio relacionados con los tiempos de tinción que fueron analizados y aceptados corresponden al tratamiento en el que interactuó la concentración de 0,4% de tetrazolio con buffer x 1 hora de tinción llegando a alcanzar el mejor resultado que de las otras interacciones.

Se comprobó que con la prueba de tetrazolio a una concentración de 0,4 % de sal de tetrazolio facilita la lectura, obteniendo mejores resultados para determinar la viabilidad en semillas de tarwi.

Con las pruebas de tetrazolio en semillas de tarwi se demostró que es posible utilizar, para obtener resultados más rápidos ya que es una prueba confiable con respecto a la prueba de germinación directa. Con una concentración de 0,4 % con 2 y 3 horas sumergidas en la solución de sal de tetrazolio no se obtiene buenos resultados al momento de realizar la lectura, ya que toma una coloración muy oscura dificultando la lectura y dañando las células del embrión.

8. RECOMENDACIONES

Aún es escasa la información en nuestro país sobre investigaciones de pruebas de viabilidad con tetrazolio en semillas de tarwi por eso se recomienda:

- Tener cuidado cuando se prepara la muestra, la hidratación de las semillas deberá facilitar la disección de la semilla para la observación del embrión, debido a que los tejidos de la semilla necesitan estar ablandados para no dañar partes importantes del embrión.
- Probar la determinación de viabilidad en diferentes tiempos de almacenamiento de semillas de tarwi ya que éstas disminuyen su viabilidad con el tiempo, para tener un análisis de viabilidad en función a la edad de la semilla.
- Usar otro tipo de tipo de sustratos en la prueba de germinación fuera de laboratorio ya que el que se utilizó en el presente trabajo fue una base de algodón humectado con agua.
- Probar el análisis de viabilidad con tetrazolio en distintas variedades de tarwi que se encuentren en nuestro país.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alizaga, G. y Allzaga, R. 1987. Evaluación del vigor de la semilla de soya (*Glycine max* (L.) merr.) y su relación con la emergencia y el rendimiento. Costa Rica. 203 p.
- AOSA. 1983. Seed Vigour Testing Handbook. Contribution N° 23 to the Handbook on Seed Testing, Association of Official Seed Analysts, NE, USA.
- Azcon-B, J. y Talon, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal, impreso en edígrafos e/ Edison, 23 Polígono Industrial San Marcos 28906 Getafe Madrid, España. 581 p.
- Barboza, R., J. 1990. El vigor en la semilla de café y su relación con la ' temperatura de secado, el contenido de humedad y las condiciones de almacenamiento. Costa Rica. 8 p.
- Barros, W. M. 2003. Pruebas de Vigor en Semillas de Lechuga y su Correlación con Emergencia, artículo de investigación, Pontificia Universidad Católica de Chile Casilla 306-22, Santiago, Chile. 53 p.
- Bittencourt, S.R.M. 1995. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim a través do teste de tetrazólio. Dissertação (mestrado em agronomia) - Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 111p.
- Carrillo, Efraín (1956). Revisión del Género *Lupinus* en el Perú. Tesis Doctor en Biología. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- Clemente, AC; Carvalho, M.L.M.; Guimarães, R.M.; Zeviani, M.W. 2011. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. Rev.bras. sementes vol. 33(1) Londrina. Consultado en agosto, 2015. Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222011000100004>
- Costa, N.P.; França-Neto, J.B.; Krzyzanowski, F.C.; Henning, A.A.; Oliveira, M.C.N. 1998. Procedimiento alternativo no teste de tetrazólio em sementes de soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.33, n.6, 869-877.
- Craviotto, R. y Arango, M. 2005. Simiente de soja: nuevos patrones en gestión de calidad por tetrazolio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, artículo de investigación. Estación Experimental Oliveros Santa Fe, Argentina. 5 p.

- Craviotto, R.M.; Arango, M.R.; Gallo, C. 2008. Topographic Tetrazolium Test for Soybean. Suplemento Especial N° 1 Revista Análisis de Semillas. Argentina. ISSN 1851-9415. 96 p.
- Craviotto, R.M.; Fared, M.; Montero, M.S. 1995. Prueba Topográfica por Tetrazolio. Patrones para la especie soja. Publicación Miscelánea Laboratorio de Semillas EEA Oliveros. Centro Regional Santa Fe. INTA. ISSN 0327 - 3377.
- Dias, M.C.; Barros, A.S. 1995. Evaluation of corn seeds quality. Londrina: IAPAR, N°88. 43 p.
- Dias, M.C.L.; Silva, W.R. 1998. Teste de tetrazólio em sementes de café. Instituto Agronômico do Paraná - Londrina. Brasil. 13 p.
- França-Neto, J.B.; Krzyzanowski, F.C.; Pereira, L.A.G.; Costa, N.P. 1998. El Test de Tetrazolio em Sementes de Soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 117. 72 p.
- Freitas, M.N. 2013. Métodos Fisiológicos, Bioquímicos e Análise de imagen para avaliar a Qualidade do café. Universidade Federal de Lavras. 167 p.
- FUNDACION PARA EL DESARROLLO DEL AGRO (FUNDEAGRO). 1989. Manual para el control de calidad de semillas. Lima, Perú. 210 p.
- Gallo, C. 2006. Calidad de semillas de soya versus ambiente y chinches. Publicación cuatrimestral de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR. Agro entrevista a una graduada. 6 p.
- Gelmond, G.H. 1962. A review of problems associated with testing of peanut seed (*Arachis hypogaea*). Proc. Int. Seed Test. Assoc. Zurich, v.27, n.2, 357-372.
- Giachino, V. y Gally, T. 2004. Evaluación de ensayos de vigor en semillas de soja de distinta calidad y su correlación con la emergencia a campo, trabajo de investigación, Departamento de tecnología. (www.unlu.edu.ar/jorcyt2004/tecnologia/hoja10.html).
- Glenner, G.G. 1990. Formazans and Tetrazolium Salts. In: Biological Stains. Edited by R.D. Lillie, M.D. Sigma Chemical Company. ISBN 0-941633-29-2. 225-235.
- Hampton, J.G.; Tekrony, D.M. 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. 3° ed. Zurich. 117 p.

- Hernández, S.R.; Fernández, C.C.; Baptista, L.P. 1998. Metodología de la investigación. Segunda Edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. México, D.F. 500 p.

- INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGROPECUARIA Y FORESTAL (INIAF). 2014. Normas específicas de certificación de semillas. Bolivia. 5, 164 p.

- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 2003-2004-207. Evaluación de Plántulas.

- International Seed Testing Association. 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing. Vol. I. Agricultural, Vegetable & Horticultural Species. Edited by Leist, N.; Kramer, S.; Jonitz, A. Bassersdorf, Switzerland. 200 p.

- Lakon, G. 1950. Die "Triebkraft" von Samen und ihre Feststellung nach dem topographischen Tetrazolium-Verfahren. Saatgutwirtschaft, 2, 37-41.

- Lanusse, M. 1998. Cuaderno de actualización técnica (www.oni.escuelas.edu.ar/olim98/SupSoja/La%20semillatexo.htm-35k).

- Lehninger, AL, Nelson, DL y Cox, MM (2017). Principios de Bioquímica. WH Freeman.

- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMIENTO, BR (MAPA). 2009. Regras para Análise de Sementes (RAS). Secretaria de Defesa Agropecuaria. Brasília – Brasil.

- Moore, R.P. (1985-2003). Handbook on tetrazolium testing. (International Seed Testing Association, Zurich).

- Moore, R.P. 1972. Tetrazolium testing of seed peanuts. Oléagineux, Montpellier, v.27, n. (8- 9), 433-437.

- MOREIRA DE C. Nelson. 1988. Semillas ciencia, tecnología y producción. Artículo de investigación. Joao Nakagawa. Edit. Agropecuaria hemisferio sur SRL. Uruguay. 20 p.

- Obando, A. y Gomes, J. 2000. Fenología y propagación de plántulas de Plukenetia volúbilis, Oenocarpus bataua, Eschweilera sp. y otras especies de interés como productos forestales no maderables. CORPOICA. Regional Caquetá. 57 p.

- Peretti, Ana. 1994. Manual para el análisis de semillas. 1° Edic. Buenos Aires, Perú. Edit. hemisferio sur. 282 p.
- Perry, D.A. 1987. Topographical tetrazolium test. In: Handbook of Vigour Test Methods, 2nd Edition, International Seed Testing Association, Zurich, 57-60.
- QUIROS, O. W. y CARRILLO, A. O. 1996. La importancia del insumo semilla de buena calidad, artículo de investigación. Oficina Nacional de Semillas. 8 p.
- Rodriguez, I.; Adam, G.; Durán, J.M. 2008. Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. Revista digitalizada: Agricultura revista agropecuaria, ISSN: 0002-1334 Universidad Politécnica de Madrid. España. pp.7
- Ruiz, MA. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: Cebadilla chaqueña. E.E.A. INTA Anguil. Publicación Técnica N° 77. Argentina.
- SALINAS, A. R; YOLDJIAN, A. M. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. Pesq. Agropec. Brás., Brasilia, v. 36, n. 2, p. 371-379: (<http://www.scielo.br/pdf/a/v36n2/a22v36n2.pdfDocum>).
- Santos, V.L.M.; Banci, C.A.; Calil, A.C.; Mendoza, R.M.; Silva, R.F.; Santos, C.M. 1992. Utilizaçao dos testes de tetrazólio na avaliação da germinação e vigor de sementes de algodao (Gossypium hirsutum L.). Revista Brasileira de Sementes. Brasília, v.14, n.2, 155-159
- SEED NEWS (Revista internacional de sementes). 2015. Desafíos e oportunidades na produção de sementes de hortaliças no Brasil. Nacsimento, WM; Melo, TPC. Rep.may/jun (3). Consultado en agosto, 2015. Disponible en: http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/imprimir.php
- Tapia, M. (2015). Financia. <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>
- Thompson, M. y De Bièvre, P. (2002). Principios y Aplicaciones de las Soluciones Tampón en el Laboratorio Analítico. Analytica Chimica Acta, 461(1), 1-27.
- UNALM, 2004. Boletín informativo sobre investigación de hidroponía y nutrición mineral (<http://www.lamolina.edu.pe/hidropolboleti12document>) publicado el 29 oct. 2006.

- Vieira, M.C.; Von Pinho, E.V. 1999. Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Algodão. Vigor de sementes: conceitos e testes. Editores Francisco Carlos Krzyzanowski; Roberval Daiton Vieira; José de Barros França-Neto; Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES. 218 p.

- Zonta, J. B; Souza, L.T.; Dias, D.C. FS; Alvarenga, E.M. 2009. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. Idesia vol. 27(2). Consultado em agosto, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000200002>

ANEXOS

Anexo 1. Registro del porcentaje de germinación de semillas de tarwi

PRUEBA DE GERMINACION DIRECTA						
N°	Semillas Germinadas				Germinación	
	I	II	III	IV	Prom.	%
1	9	9	10	10	9.5	9.1
	8	10	8	9	8.8	
	9	9	9	9	9.0	
2	9	9	10	9	9.3	9.3
	8	8	9	10	8.8	
	10	10	9	10	9.8	
3	9	9	9	10	9.3	9.4
	9	10	9	9	9.3	
	10	9	10	9	9.5	
					media general	9.3

Anexo 2. Reporte para el análisis de concentración de tetrazolio y tiempo de tinción

PRUEBA DE VIABILIDAD EN SEMILLAS DE TARWI							
% Tz	T(hr.)	Semillas Viabiles				Viabilidad	
		I	II	III	IV	prom.	%
0,1	1	6	7	6	6	6.250	
0,1	2	6	7	7	7	6.750	
0,1	3	8	8	9	10	8.750	8.7
0,2	1	7	7	7	9	7.500	8.7
0,2	2	8	9	9	9	8.750	
0,2	3	8	9	9	9	8.750	
0,4	1	10	10	10	9	9.750	9.7
0,4	2	10	9	10	10	9.750	
0,4	3	10	10	9	10	9.750	

Anexo 3. Evaluación de germinación

Semillas que no germinaron

otra categoría de semilla que no germinaron



Semilla muerta
color característico
(negro)



Semilla vacía,
apenas contiene
tejido residual.



Semilla dura,
no presenta
daños



Semilla sin
embrión



Semilla latente, no
presenta
características
esenciales



Semilla dañada
por insecto

Semillas germinadas

plántulas normales



Anexo 4. Coloración se semillas de tarwi con tetrazolio

Tonalidad de coloración



a) Rosado pálido



b) rosado vivo



c) rosado intenso - rojo

Coloración al 0,1 % de concentración de tetrazolio



1 hora



2 horas



3 horas

Coloración al 0,2 % de concentración de tetrazolio



1 hora



2 horas



3 horas

Coloración al 0,4 % de concentración de tetrazolio



1 hora

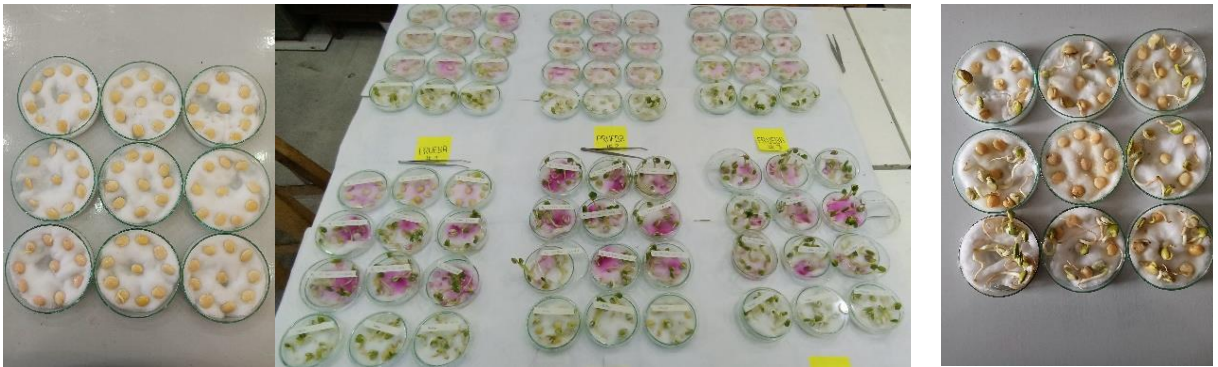


2 horas



3 horas

Anexo 5. Procedimiento Experimental prueba de germinación

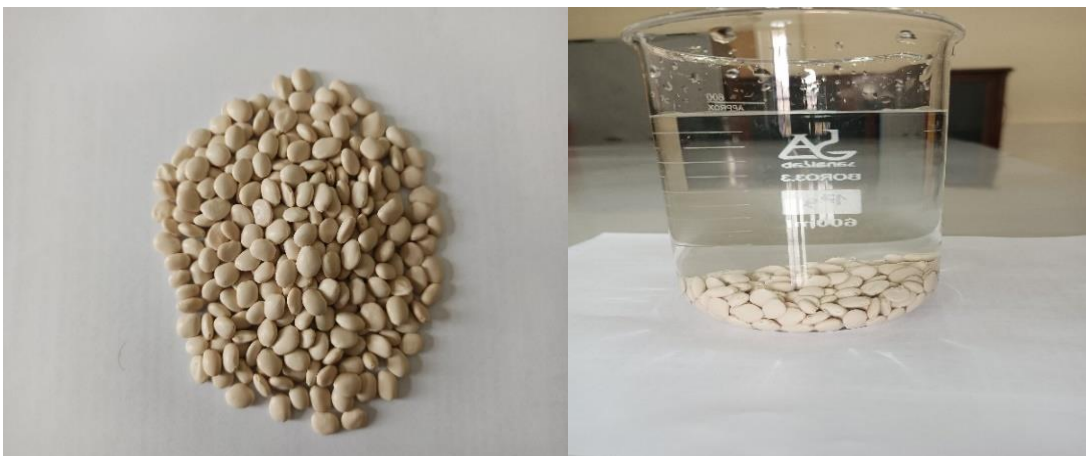


Semillas germinadas de tarwi



Plántulas normales de tarwi

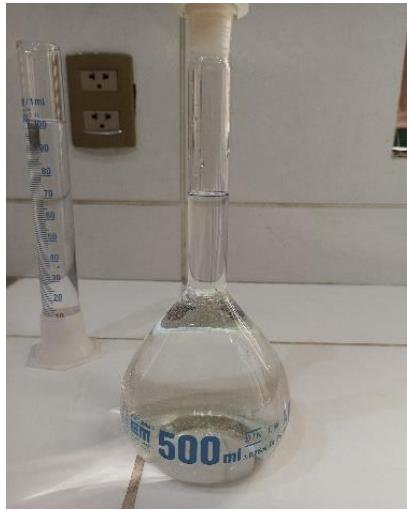
Anexo 6. Procedimiento Experimental prueba de viabilidad



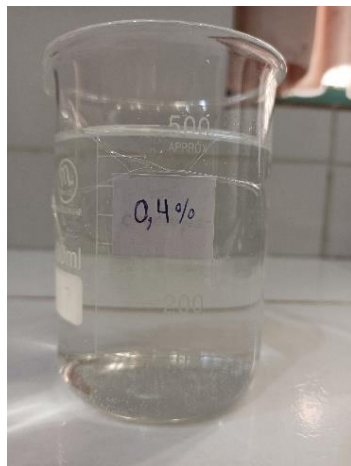
Hidratación de las semillas durante 48 horas



Preparación de la solución buffer



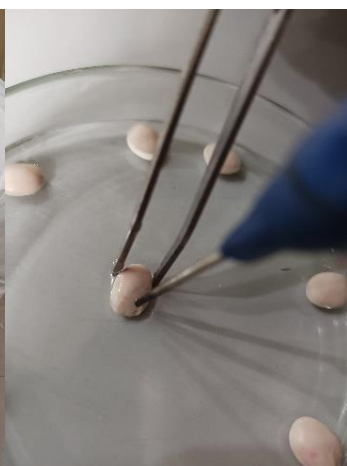
pesaje de la sal de tetrazolio



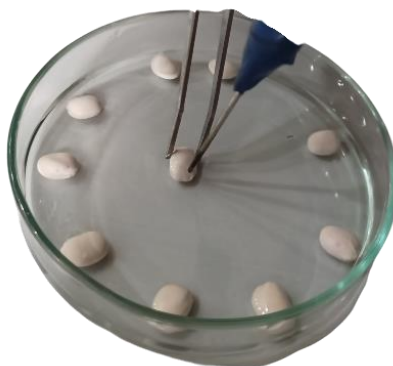
Solución de tetrazolio con buffer



inmersión de semillas en cajas Petri con tetrazolio



Tratamientos, interacción de concentración y tiempo



semillas viables