

Prueba colorimétrica de pH de exudados para la evaluación de la calidad de semillas de arveja (*Pisum sativum*) de la zona hortícola de Mar del Plata

Murcia, Mónica L.^{1,2}; Verónica E. Crovo¹; Natalia L. Clemente¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias UNMDP- Ruta Nacional 226. Km 73, 5. Balcarce (7620);
²mmurcia@mdp.edu.ar; murcia.monica@inta.gob

Murcia, Mónica L.; Verónica E. Crovo; Natalia L. Clemente (2018) Prueba colorimétrica de pH de exudados para la evaluación de la calidad de semillas de arveja (*Pisum sativum*) de la zona hortícola de Mar del Plata. Rev. Fac. Agron. Vol 117 (1): 171-174.

Para verificar la utilidad de la prueba colorimétrica de pH de exudados en la determinación de calidad de semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) se trabajó con 5 lotes utilizados en la zona hortícola de Mar del Plata. La prueba de germinación estándar se efectuó en rollos de papel absorbente (entre papel), incubando a 23°C. A los ocho días se contaron plántulas normales (PG), anormales y semillas muertas. El ensayo a campo se efectuó según un diseño en bloques completos aleatorizados, registrándose la emergencia a los 28 días (E). Para la prueba colorimétrica las semillas se colocaron en celdas individuales con 3 ml de agua destilada, se incubaron por 30 minutos a 23°C, se colocaron cuatro gotas de solución indicadora (fenolftaleína - Na₂CO₃) y se observó el color en cada celda. Coloración rosa fuerte correspondió a semillas viables (pH), rosadas e incoloras a no viables. Estas semillas se sembraron en celdas individuales con arena para evaluar su germinación (G). La unidad experimental fue de 50 semillas con cuatro repeticiones. Los porcentajes de PG, E y pH se compararon por análisis de varianza y comparaciones múltiples. G y pH se compararon con el test exacto de Fisher (p < 0,0001). PG, E y pH permitieron clasificar los lotes en forma similar. Para cada lote pH arrojó resultados coincidentes con G, según el test de Fisher, indicando asociación entre ambas variables. Esta prueba resultó útil y rápida para estimar la calidad de semillas de arveja en condiciones locales.

Palabras Clave: arveja; calidad de semillas; análisis de pH de exudados; Mar del Plata-Buenos Aires.

Murcia, Mónica L.; Verónica E. Crovo; Natalia L. Clemente (2018) Colorimetric pH exudate test to evaluate the quality of pea seeds (*Pisum sativum*) from the horticultural zone of Mar del Plata. Rev. Fac. Agron. Vol 117 (1): 171-174.

The aim of this work was to verify the usefulness of the colorimetric test of pH to determine the quality of 5 lots of pea seeds (*Pisum sativum* L.) se trabajó con 5 lotes utilizados en la zona hortícola de Mar del Plata. La prueba de germinación estándar used in the horticultural area of Mar del Plata. The experimental unit was of 50 seeds with four replications. The standard germination (SG) test was carried out between papers, and was incubated at 23°C. Normal seedlings, abnormal and seeds dead were counted at eight days. The field trial was conducted according to a complete randomized block design, emergence was recorded at 28 days (E). For the colorimetric test, seeds were placed in individual cells with 3 ml of distilled water, incubated for 30 minutes at 23 ° C, four drops of phenolphthalein - Na₂CO₃ were added and the colour in each cell was observed. Strong pink colour corresponded to viable seed, pink and colourless to non-viable seeds. Each seed was placed in individual cells in sand to determine viability. The percentages of SG, pH and field emergence (E) were compared by analysis of variance and multiple comparisons. The results of the colorimetric test and viability of each seed were compared with Fisher's exact test (p < 0.0001). The results of SG, pH and E showed the different quality of lots. In all cases, the colorimetric test showed coincident results with germination for each seed, according to the Fisher test. The results indicate that, if they require adjustments, this test is useful for rapid estimation of seed quality in an area in which it has not been tested.

Keywords: pea; seed quality; pH analysis of exudates; Mar del Plata-Buenos Aires.

Recibido: 10/03/2018

Aceptado: 22/05/2018

Disponible on line: 10/09/2018

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

El cultivo de arveja (*Pisum sativum* L) está siendo implantado desde hace unos años en diversas áreas y cada vez en mayor medida, ya que constituye, para los productores, una alternativa al trigo como cultivo invernal (Prieto, 2012). Existe una amplia variación en cuanto a la calidad de las semillas utilizadas, sean comercializadas o de producción propia, por lo cual no todas cumplen con los estándares de calidad establecidos en el país (INASE, 1997; Bazzigalupi et al., 2009; Murcia et al., 2009). La zona hortícola de Mar del Plata no es una excepción, las semillas de arveja disponibles para los productores son escasas y en muchos casos de dudosa calidad.

La evaluación de la calidad fisiológica de semillas en laboratorio es de suma importancia para la toma de decisiones respecto de la siembra y manejo de la producción.

El ensayo de germinación estándar (GE) o poder germinativo (PG) es considerado el principal criterio para evaluar la calidad de las semillas (ISTA, 1995a). Indica el porcentaje de semillas puras que pueden producir plántulas normales. Este porcentaje representa el máximo potencial del lote para la implantación del cultivo en condiciones ideales de siembra ya que el ensayo es realizado bajo condiciones ambientales óptimas y controladas (Peretti, 1994; ISTA, 1995a). Este análisis no es suficientemente sensible para detectar diferencias de calidad entre lotes con elevados o similares valores de PG, por lo cual se considera importante considerar otro componente de la calidad de las semillas como es el vigor (ISTA, 1995b), que permite detectar diferencias más sutiles en el deterioro de las mismas a través de diversos ensayos. Por otra parte, frecuentemente los productores o semilleros requieren resultados inmediatos que le permitan comparar la calidad de los lotes de semillas y decidir el destino de los mismos. Dado que el ensayo de GE requiere de varios días para efectuar el recuento, dependiendo de las especies, se utilizan algunas variables que indican el vigor, como son el primer recuento o energía germinativa, o la prueba topográfica de viabilidad por tetrazolio (ISTA, 2012), que permiten obtener información sobre la calidad de las semillas en menor tiempo. Asimismo los llamados “test rápidos” como por ejemplo la prueba de verde rápido (*Fast green*) utilizada en maíz (Arango & Craviotto, 2007), la prueba de inmersión, en soja (Arango et al., 2010), la prueba de hipoclorito de sodio, en soja (Craviotto & Arango, 2007), el test de aleurona, en maíz (Craviotto, 2009), el test de conductividad eléctrica (ISTA, 1995b) y la prueba colorimétrica de pH de exudados en soja (Peske & Amaral, 1986; Peretti et al., 1995), en maíz (Cabrera & Peske, 2002) y en arveja (Rech, et al., 1999; Gallo et al., 2012).

La prueba colorimétrica de pH de exudados permite evaluar, indirectamente, el grado de deterioro de las membranas celulares que pierden, en ese proceso, su permeabilidad selectiva. La medición del pH de los exudados se efectúa utilizando una solución indicadora (Na_2CO_3 -fenolftaleína) que es incolora en medio ácido o neutro, pero en soluciones básicas presenta color rosa intenso. Dado que muchos de los electrolitos liberados son ácidos orgánicos o iones, incluyendo el

H^+ , la acidez del agua en que están sumergidas las semillas aumenta a la medida en que ellas se encuentran más deterioradas (Peretti, 1994). Este ensayo se ha propuesto como una prueba rápida para informar sobre la calidad fisiológica de semillas de varias especies, como soja (Peretti et al., 1995), maíz (Cabrera & Peske, 2002) y poroto (Fernandes et al., 1987). También ha sido utilizada en arveja, como medida de la viabilidad o el vigor con buenos resultados. Rech et al. (1999) determinaron el pH de semillas individuales de dos cultivares, conservadas en tres condiciones diferentes, encontrando una buena estimación de la viabilidad de semillas de arveja. Por otra parte Gallo et al., (2012) determinaron la calidad de ocho lotes de un cultivar de arveja, que mostraron un ordenamiento similar al de la emergencia de plántulas en el campo en la zona de Oliveros (Santa Fe). Sin embargo estos autores concluyeron que es necesario continuar con la investigación en un amplio rango de condiciones ambientales en el campo. Por lo tanto, ajustes metodológicos de la técnica, así como la evaluación por medio de ella de diferentes cultivares y bajo diferentes condiciones ambientales son necesarios para su estandarización.

El objetivo de este trabajo fue verificar la utilidad de la prueba colorimétrica de pH de exudados como un ensayo rápido para determinar la calidad de semillas de arveja disponibles en la zona hortícola de Mar del Plata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con cinco lotes de arveja (*Pisum sativum* L.) adquiridos a proveedores de la zona, cuatro de la variedad Sacharatum: (Lote 1) “Utrillo”, Origen EEUU. PG declarado 94%; (Lote 3) origen San Juan, cultivar y PG no declarados; (Lote 4) cultivar “Falchetto”, origen Italia, PG declarado 90% y (Lote 5) cultivar “Tarma”, PG declarado 88%; y un cultivar (Lote 2) de la variedad Vulgare, “lisa”, de la cual se desconocía el nombre, el origen y el PG.

La unidad experimental fue de 50 semillas, y se efectuaron 4 repeticiones por tratamiento.

La prueba de poder germinativo (PG), de referencia, se efectuó en rollos de papel absorbente de la siguiente manera: se distribuyeron las semillas sobre papel humedecido, se cubrieron papel húmedo y se formaron rollos. Las bolsas con los rollos se cerraron, se ubicaron en posición vertical y se llevaron a cámara de germinación a 23 °C. El recuento de plántulas normales, anormales y semillas muertas se efectuó a los 8 días. El porcentaje de plántulas normales corresponde a PG (ISTA, 2012).

El ensayo a campo efectuó en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP)- EEA INTA Balcarce, según un diseño completamente aleatorizado. El recuento de las plántulas emergidas se realizó 28 días después de la siembra.

La prueba colorimétrica de pH se realizó en celdas individuales conteniendo 3 ml de agua destilada, en las cuales se incubó una semilla por celda, durante 30 minutos a 23°C (Peske & Amaral, 1984). Luego se colocaron cuatro (4) gotas de solución indicadora, fenolftaleína – Na_2CO_3 . (Gallo et al, 2012, modificada) y se observó el cambio de color en cada celda.

Se efectuó el recuento de celdas en cada una de las siguientes categorías:

- Coloración rosa fuerte (semilla viable)
- Coloración rosa pálido (semilla no viable)
- Incoloro (semilla no viable)

Luego estas semillas se sembraron en celdas individuales con arena y se incubaron en las mismas condiciones que PG y se registró su porcentaje de plántulas normales (G), plántulas anormales y semillas muertas.

Los datos de porcentaje de plántulas normales en la prueba de poder germinativo (PG), celdas con coloración rosa fuerte en la prueba colorimétrica de pH (pH) y plántulas emergidas a campo (E) se sometieron a análisis de varianza y se compararon con la prueba de mínima diferencia significativa ($\alpha=0,05$). El resultado de la prueba de pH (número de celdas rosa fuerte, rosadas e incoloras) y el de las correspondientes semillas germinadas y no germinadas ($n=200$ semillas/cultivar), se volcaron en tablas de contingencia y se analizaron con la prueba de independencia (test exacto de Fisher) para determinar la asociación entre dichas variables. Se empleó el programa estadístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

RESULTADOS

Los porcentajes de PG, emergencia a campo (E) y celdas con coloración rosa fuerte (viables) en el ensayo de pH (pH) mostraron diferencias significativas entre los lotes, según la prueba de mínima diferencia significativa ($\alpha=0,05$). Todos los ensayos indicaron que el lote 2 fue el de mayor calidad, seguido de los lotes 4 y 5; si bien el PG del lote 4 fue levemente superior al del lote 2, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Siguió en orden el lote 1 y el 3, siendo éste último el de inferior calidad. La clasificación de los lotes por su calidad, establecida por las tres variables fue similar, como se muestra en la figura 1.

La prueba colorimétrica de pH permitió establecer un ranking de calidad coincidente con el del ensayo de PG y la emergencia a campo (E). Los lotes analizados son utilizados por los productores de la zona en condiciones similares a las que se reflejaron en el ensayo de

campo, estos resultados (E) reflejan diferente comportamiento de cada lote, estableciéndose un ranking similar al establecido en los ensayos de laboratorio (tanto PG como pH) pero, como es previsible, con valores inferiores (Figura 1)

La prueba de independencia (test de Fisher) indicó que los resultados de la prueba colorimétrica (pH) y de la germinación individual (G) de las mismas semillas estuvieron asociados ($p < 0,0001$), lo cual ratifica coincidencia en los resultados de la mayoría de las semillas evaluadas en forma individual (coloración rosa fuerte-plántulas normales) entre ambos ensayos para todos los lotes, como se observa en la tabla 1.

DISCUSIÓN

La prueba colorimétrica de pH permitió inferir los resultados en laboratorio y/o a campo, ya que mostró en forma rápida la diferente calidad de los lotes evaluados y permitió establecer un ranking de calidad de los mismos de modo anticipado, con respecto a los resultados de PG y emergencia a campo (E). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gallo *et al.* (2012) quienes pudieron establecer el comportamiento diferencial de ocho lotes de un único cultivar de arvejas, comparados a través de la prueba de pH, para su siembra a campo en una región agroecológica diferente a la del presente trabajo (Oliveros – Santa Fé). Los resultados de los lotes evaluados en este trabajo (de dos variedades y cinco orígenes diferentes), confirman la posibilidad de emplear la prueba colorimétrica de PH en semillas de arveja para estimar su desempeño en condiciones diferentes de cultivo. Asimismo permitió evaluar el comportamiento de la prueba colorimétrica de pH como un indicador rápido y confiable de la calidad de semillas de arveja con diferentes características y en condiciones de cultivo diversas respecto a los antecedentes (Rech *et al.* 1999; Gallo, *et al.* 2012).

Pese al bajo número de lotes disponibles esta comparación es un aporte para verificar la utilidad de la prueba colorimétrica de PH en muestras de semillas difundidas en la zona hortícola de Mar del Plata, ya que no había información al respecto hasta el presente.

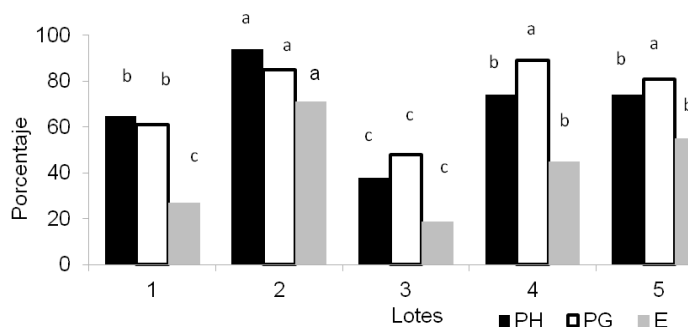


Figura 1. Porcentajes de semillas rosa fuerte (PH), plántulas normales (PG) y emergidas en el campo (E), en cada uno de los lotes de arveja evaluados. Letras iguales indican diferencia no significativa entre lotes para cada ensayo.

Tabla 1. Porcentaje de plántulas normales en el ensayo de germinación (G) de semillas individuales, desarrolladas dentro de la categoría "Rosa fuerte" de pH (viabiles), para cada lote de semillas de arveja. * indica dependencia (coincidencia) de ambas variables según el test de Fisher ($p < 0,0001$).

Lote	Porcentaje de plántulas normales (G)/ Rosa fuerte (pH)
1	69 *
2	79 *
3	84 *
4	76 *
5	32 *

Asimismo se verifica que la calidad de la semilla utilizada en la zona, no siempre responde a los estándares establecidos para su comercialización (INASE, 1997) como refiere Bazzigalupi et al. (2009) en diferentes especies y Murcia et al. (2009) en *Pisum sativum*.

CONCLUSIÓN

Efectuados los ajustes metodológicos necesarios indicados, la prueba colorimétrica de pH, fue útil para comparar la calidad de lotes de semillas de arveja, difundidos en la zona hortícola de Mar del Plata, en condiciones ambientales propias, donde esta prueba no había sido evaluada. Si bien, sería necesario experimentar con mayor número de muestras, estos resultados representan un aporte tendiente a lograr la generalización del uso de la técnica, como un estimador rápido de calidad de semillas de arveja, para los laboratorios de análisis de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

Arango, M.R & R.M. Craviotto. 2007. Determinación de daño mecánico en maíz. Prueba de verde rápido (fast green). Revista Técnica en Siembra Directa. Maíz. Aapresid. Septiembre. pp. 183-184.

Arango, M.R., C. Gallo & R.M. Craviotto. 2010. Prueba de inmersión como indicador de vigor en semilla de soja. Artículo Abstract del XXII Seminario Panamericano de Semillas, 4 al 6 de Agosto, Asunción del Paraguay.

Bazzigalupi, O., I.E. Paunero & A.E. Font. 2009. Diagnóstico preliminar sobre calidad de semillas de especies aromáticas en el mercado argentino. Disponible en: <http://inta.gov.ar/documentos/diagnostico-preliminar-sobre-calidad-de-semillas-de-especies-aromaticas-en-el-mercado-argentino>. Último acceso: febrero de 2018.

Cabrera, A. C. & S. T. Peske. 2002. Testes do PH exsudato para sementes de milho. Revista Brasileira de Sementes. 24(1): 134-140.

Craviotto, R.M. 2009. Actualización en evaluación de calidad de semente de maíz: Prueba de Viabilidad de Capa de Aleurona. Revista MAIZ: para mejorar la producción 41 – INTA EEA Oliveros. pp 103-106.

Craviotto, R.M. & M.R. Arango. 2007. Daño mecánico en soja. Una prueba rápida para identificarlo: Prueba de Hipoclorito. Revista Análisis de Semillas Año1. N° 2. pp 73-74.

Fernandes, E.J., R. Sader & N.M. Carvalho. 1987. Viabilidade de sementes de feijao (*Phaseolus vulgaris* L.) estimada pelo pH do exsudato. In: Congreso Brasileiro de Sementes, 5, Gramado. Anais. Brasília: ABRATES, 1987. p.80.

Gallo, C., M. Arango & R. Craviotto. 2012. Prueba colorimétrica de pH del exudado de semillas para la evaluación de vigor en sementes de arveja (*Pisum sativum* L.). INTA. 10 pp.

INASE (Instituto Nacional de Semillas) 1997. Tolerancias de germinación y de pureza físico botánica para las especies hortícolas, legumbres, aromáticas y medicinales. Resolución 306/97. Buenos Aires, 16 de octubre 1997. Disponible en:

http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_remository&Itemid=102&func=fileinfo&id=422. Último acceso: junio de 2015.

ISTA. 1995a. Understanding seed vigour. Zurich. 5pp.

ISTA. 1995b. Handbook on Seedling Evaluation. International Seed Testing Association, 150 pp.

ISTA. 2012. International Rule for Seed Testing. Zurich. 500pp.

Murcia, M. L., M. C. Mediavilla, F. Génova & J. Verón. 2009. Evaluación de las prácticas de producción y de la calidad fisiológica de la semilla de arveja (*Pisum sativum*) proveniente de una huerta agroecológica de Mar del Plata. Análisis de semillas 4 (12):77-80.

Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 287 p.

Peretti, A., M.R. Bianchini, G. Valinoti, R. Craviotto & S. San Martino. 1995. Estimación de la viabilidad de semillas de soja mediante el análisis del exudado. I Congreso Nacional de Soja y II Reunión Nacional de Oleaginosos. Pergamino. 1pp.

Peske, S.T. & A.D.S. Amaral. 1984. pH do exudato para estimar em 30 minutos, a veabilidade de sementes de soja. Revista Brasileira de Sementes 6 (3) 85-92.

Peske, S.T. & A.D.S. Amaral. 1986. Prediction of the germination of soybean seeds by measurement of the pH of seed exudates. Seed Science and Technology 14 (1) 151-156.

Prieto, G.M. 2012. Pautas para el manejo del cultivo de Arveja. Disponible en:

http://inta.gov.ar/documentos/pautas-para-el-manejo-del-cultivo-de-arveaat_multi_download/file/Pautas-para-el-manejo-del-cultivo-de-arveja-final.pdf. Último acceso: febrero de 2018

Rech, E.G, F. Amaral Villela & M.A.A. Tillman. 1999. Avaliação rápida da qualidade fisiologica de sementes de ervilha. Revista Brasileira de Sementes. 21 (2): 1-9.

R Development Core Team. 2012. A language and Environment for statistical computing. Versión 2.14 R Foundation for Statistical computing, Vienna. Disponible en: <http://www.R-project.org>. Último acceso: agosto de 2018.