

Confiabilidad en ensayos de calidad física y fisiológica de semilla de soya en Venezuela

Manuel Avila^{1*}, Humberto Moratinos², Zulay Flores³, Pastora Querales⁴, Alexander Hernández⁴, Joad Jiménez⁵, Marlene Peñaloza², Marbella Romero¹, Alex González-Vera¹, Nailleth Méndez⁴, Olmarys Pérez³.

¹Fundación para la Investigación Agrícola Danac, San Felipe, Yaracuy

²Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua. ³Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIA-CENIAP, Maracay, Aragua.

⁴Posgrado de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Cabudare, Lara.

⁵Semillas Híbridas de Venezuela Compañía Anónima (SEHIVECA-Agropatria Semillas). Cagua, Aragua.

RESUMEN

Se evaluó la confiabilidad de resultados de ensayos de calidad física y fisiológica de semilla de soya en laboratorios venezolanos. Para ello se enviaron muestras de semilla de la variedad 'FP90-6103' a cinco laboratorios y fueron evaluadas para humedad, pureza, germinación y viabilidad por tetrazolio, siguiendo los métodos de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés). Los resultados de las pruebas de laboratorio fueron establecidos en diagramas de cajas y se evaluó su conformidad mediante diferentes estadísticos de repetibilidad y reproducibilidad. Se encontró que la confiabilidad fue variable según el método empleado, las condiciones específicas en las cuales se establecieron las pruebas, la calibración de los equipos, la experiencia de los analistas y el tipo de estadístico de confiabilidad aplicado. En germinación se encontró que las pruebas presentaron niveles de conformidad de 66,6% para las variables plántulas normales y anormales, 55,6% para semillas duras y 88,8% para semillas muertas. En pureza de semilla el 66,6% de los laboratorios fueron conformes, mientras que en humedad y viabilidad por tetrazolio los resultados de las pruebas fueron discrepantes. Para mejorar la confiabilidad de los resultados se recomendó seleccionar las condiciones más reproducibles, calibrar los equipos y entrenar a los analistas de manera periódica así como establecer interlaboratorio permanentes con el fin de demostrar continuamente la competencia de los laboratorios e identificar las posibles desviaciones y orientar los aspectos a mejorar.

Palabras clave: *Glycine max*, germinación, humedad, pureza, viabilidad, interlaboratorio

* Autor de correspondencia: Manuel Avila

E-mail: manuel.avila@danac.org.ve

Reliability tests of physical and physiological quality of soybean seed in Venezuela

ABSTRACT

The objective was to evaluate the reliability of physical and physiological quality test of soybean seed in Venezuelan laboratories. For this, seed samples of the variety 'FP90-6103' were sent to five laboratories and were evaluated for moisture, purity, germination and tetrazolium viability, following the methods of the International Seed Testing Association (ISTA). The results of laboratory tests were established in boxplots and compliance was assessed by different statistical of repeatability and reproducibility. It was found that reliability was variable depending on the method used, the specific conditions under which tests were performed, calibration of equipment, the experience of analysts and type of statistical of reliability applied. In germination, it was found compliance levels of 66,6 %, for the variables normal and abnormal seedlings, 55,6 % for hard seeds and 88,8% for dead seeds. In seed purity 66,6 % of the laboratories were in conformity; while moisture and viability by tetrazolium the results of the tests were discrepant. In order to improve the reliability of the results, it is recommended to select the most reproducible conditions, calibrate equipment and train analysts periodically and establish permanent interlaboratory tests to continually demonstrate competence of laboratories and to identify possible deviations and target areas for improvement

Keywords: *Glycine max*, germination, humidity, purity, viability, interlaboratory

INTRODUCCIÓN

En Venezuela la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) ha tenido una producción inferior a su demanda lo que ha conducido a la importación de más de un millón de toneladas de soya como harina desgrasada para alimentación animal, aceite comestible y grano para el procesamiento industrial (Solórzano, 2012). En un intento de cambiar este panorama en el país se han promovido proyectos de investigación para impulsar cadena agroproductiva de soya con énfasis en aumentar la calidad de semilla.

Los países requieren semilla de alta calidad para satisfacer las demandas de alimentos, fibras y combustibles. De allí su interés en trabajar con diferentes actores de la cadena agroproductiva para encontrar caminos que faciliten el movimiento seguro de semillas de conformidad con las regulaciones existentes (Risso, 2012). Una de las alternativas más aplicables consiste en el establecimiento sistemas de aseguramiento de la calidad, cuyo fin es proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos de la calidad especificados en los procesos de producción, certificación, e intercambio de semilla. Los laboratorios de semillas constituyen un actor importante para dichos sistemas debido a que su función es llevar a cabo evaluaciones de conformidad de lotes de semillas mediante ensayos físicos, fisiológicos y sanitarios. Los resultados de ensayo de laboratorio deben

ser confiables, ya que éstos pueden tener implicaciones legales y económicas y estar asociados al control de riegos y validez de estudios científicos (González de Núñez y Verde, 2010). La norma de acreditación de ensayos de laboratorio ISO/IEC 17025, indica que una de las formas de demostrar la confiabilidad de los resultados en términos de precisión (repetibilidad) y exactitud (reproducibilidad) es a través de la participación en ensayos interlaboratorio (ISO, 2005). Estos se basan en una comparación de resultados de ensayo de diferentes laboratorios sobre muestras homogéneas mediante un protocolo estándar.

En Venezuela se conocen experiencias de estudios interlaboratorio en ensayos microbiológico de alimentos durante más de 20 años (Ávila y Orozco, 2013) y en los últimos años se han realizado ensayos sobre calidad de granos de arroz pulido (Ávila *et al.*, 2012; Ávila *et al.*, 2013); sin embargo, estudios de esta naturaleza de ensayos sobre semillas de soya o de cualquier otro cultivo han sido limitados y no divulgados. Por lo anterior se propuso como objetivo evaluar la confiabilidad de resultados de ensayos de calidad física y fisiológica de semilla de soya en Venezuela mediante un estudio interlaboratorio y establecer un marco referencial para la medición del desempeño de laboratorios de ensayo de semilla y de los posibles aspectos a mejorar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento y experiencia de los laboratorios

El ensayo interlaboratorio se inició a partir del taller “Actualización de conocimientos en calidad de semilla de soya”, realizado a mediados del año 2015 en Fundación Danac, con la participación de cinco laboratorios nacionales provenientes de: empresas semilleras (1), universidades (2), institutos de investigación pública (1) y privados (1). Todos los participantes indicaron que contaban con la mayoría de equipos estándares para ensayos de semilla (balanzas, cámaras de germinación, diafanoscopio, homogeneizadores, cámaras de incubación y estufas) y se constató que las especificaciones de los mismos en cuanto marca, modelo y controles de calibración difería entre laboratorios. Por otra parte, se encontró que sólo el 60% de los laboratorios manifestaron que mantenían planes de calibración anual de los equipos de medición y control. Se evaluaron ensayos de calidad física (humedad y pureza) y fisiológica (germinación y viabilidad por tetrazolio) de semilla de soya, siguiendo los métodos de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA, 2013). Los laboratorios en ensayos de calidad de semilla de soya presentaron rangos de experiencia de 3-38 años para humedad, pureza y germinación y de <1-30 años para viabilidad por tetrazolio. Algunos laboratorios no participaron en todos los ensayos alegando limitaciones o problemas operativos de algunos equipos.

Descripción de las muestras y protocolo del interlaboratorio

Muestras obtenidas a partir de sacos de 20 kg de un lote de semilla certificada del cultivar de soya ‘FP90-6103’, con $12 \pm 1\%$ de humedad y 6

meses de almacenamiento a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, fueron destinadas para los ensayos de germinación y humedad; mientras que muestras obtenidas de sacos de 20 kg de semilla experimental y sin limpiar del mismo cultivar, con $12 \pm 1\%$ de humedad y 12 meses de almacenamiento a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, se destinaron para los ensayos de pureza y viabilidad. El muestreo se realizó de acuerdo a procedimientos descritos por ISTA (2013), luego las muestras se reposaron durante 24 horas a 25°C para equilibrar la temperatura y humedad de la semilla y fueron homogenizadas por lote con ayuda de un divisor Tipo Boerner; sus humedades se verificaron mediante un determinador de humedad SB 9000 (Steinlite, USA). Finalmente, a cada laboratorio se entregaron en bolsas de papel codificadas sub-muestras de 2,0 kg para los ensayos de germinación y humedad y de 1,5 kg para los ensayos de pureza y viabilidad. Las muestras remitidas se mantuvieron a las condiciones ambientales de cada laboratorio ($25\text{-}30^\circ\text{C}$), se acordó que los ensayos se realizaran en un tiempo no mayor de 30 días a partir de la fecha de entrega de las muestras, para evitar cambios por tiempo y condiciones de almacenamiento de los diferentes laboratorio. Los laboratorios emitieron los resultados en un formato de reporte de datos originales y en un formato de descripción de ensayos de semilla de soya detallaron las condiciones ambientales, materiales y equipos empleados en cada ensayo, esto en virtud de identificar las posibles fuentes de variación y sus efectos.

La descripción de los ensayos, variables evaluadas, fuentes de variación, números de laboratorios participantes, pruebas y observaciones se presentan en el Cuadro 1. El número de pruebas realizadas por ensayo se generó considerando la naturaleza de los métodos y de sus posibles fuentes de variación. Para los análisis de pureza y viabilidad los laboratorios fueron considerados como única fuente de variación, por ello el número de laboratorios y el número de pruebas fueron equivalentes. En contraste, para los ensayos de humedad y germinación el número de pruebas estuvo definido por las condiciones empleadas en cada laboratorio. Algunos laboratorios interesados en evaluar los cambios propios de su rutina real de trabajo realizaron más de una prueba por ensayo. Para asegurar la confidencialidad del origen de los resultados se realizó una codificación de las pruebas a partir de una tabla de números aleatorios de tres dígitos de Cochran y Cox (1957).

Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados de las pruebas por ensayo de semilla de soya fueron establecidos en diagramas de cajas (dispersión). La precisión o repetibilidad (intra-prueba) y exactitud o reproducibilidad (entre-prueba) se evaluaron mediante los estadísticos señalados en el Cuadro 2, estos fueron seleccionados considerando los métodos de ensayo, la naturaleza de las variables evaluadas y el número de pruebas realizadas. En los ensayos de humedad la repetibilidad se estimó a partir de un análisis de varianza F de una vía, tomando como fuente de variación las pruebas, mientras que la reproducibilidad se estimó mediante la prueba de comparación de medias de Tukey. En los ensayos de pureza, germinación y viabilidad por tetrazolio se excluyeron las pruebas de laboratorio

Cuadro 1. Descripción de ensayos según reglas ISTA realizados

Ensayo	Variables	Laboratorios participantes	Fuentes de variación	Nº de pruebas	Nº de observaciones / prueba
Humedad	Humedad (%)	5	Métodos (Desecación por convección forzada en estufa y conductividad eléctrica),	8	4
Pureza	Semilla pura (%), Otras semillas (%).material inerte (%)	5	Tipo de muestra (semilla entera, partida y molida). Laboratorio	5	2 ^a
Germinación	Germinación o Plántulas normales (%), Plántulas anormales (%), semillas muertas (%)	5	Ambiente (cámara e invernadero)	9	4
Viabilidad por tetrazolio	Semillas Viabiles (%)	4	Sustrato (arena cernida estéril, papel absorbente). Laboratorio	4	2 ^b

^aAlgunos laboratorios presentaron una observación

^bAlgunos laboratorios emitieron cuatro observaciones

Cuadro 2. Resumen de estadísticos aplicados a los análisis de semilla de soya.

Ensayo	Precisión (repetibilidad)	Exactitud (Reproducibilidad)	Referencia
Humedad	Prueba de F	Comparación de medias por Tukey	Fisher (1925); Tukey (1949)
Pureza , Germinación y Viabilidad por tetrazolio	k Mandel	h Mandel	COVENIN (1997)
	Cochran	Diferencias estandarizadas z	
	Varianza de la repetibilidad	Varianza de la Reproducibilidad	
	Repetibilidad	Reproducibilidad	
	Límite de la repetibilidad	Límite de la Reproducibilidad	
		Intervalo de confianza 95%	González de Nuñez y Verde (2010)
	Tolerancias por rango studentizado (q) de Tukey	Tolerancias por rango studentizado (q) de Tukey	Miles (1963); ISTA (2013)

que no resultaron conformes de acuerdo a los estadísticos repetibilidad y reproducibilidad descritos en la Norma COVENIN 2972-2 (COVENIN, 1997), en los cuales se incluyeron, adicionalmente, las tolerancias (q) de Tukey (ISTA, 2013) y los intervalos de confianza de 95% (González de Núñez y Verde, 2010). Para las pruebas conformes o no excluidas se calcularon diferentes indicadores de repetibilidad y reproducibilidad (r y R). Por acuerdo entre los laboratorios participantes, la reproducibilidad fue estimada tomando como valor de referencia el promedio de todas las pruebas. Finalmente, se calcularon las diferencias estandarizadas de z para establecer posiciones de mérito de las pruebas por su proximidad al valor de referencia de acuerdo a lo indicado por COVENIN (1997). Cuando los valores de z tienden a 0 se consideran más exactos (González de Núñez y Verde, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad

La Figura 1 presenta el diagrama de cajas de los resultados de humedad de las pruebas por tipo de muestra y método de ensayo. La semilla de soya exhibió una humedad promedio de 10,31% y todas las pruebas presentaron variaciones intra-prueba inferiores a 0,50% excepto la prueba 582 que alcanzó una variación máxima de 1,00%. Los rangos de humedad de todas las pruebas, salvo la 582, se enmarcaron dentro de los valores de tolerancias de 0,50% establecidos por ISTA (ISTA, 2013), indicativo de una adecuada repetibilidad general. Las cuatro pruebas más exactas o cercanas al valor de referencia (promedio general)

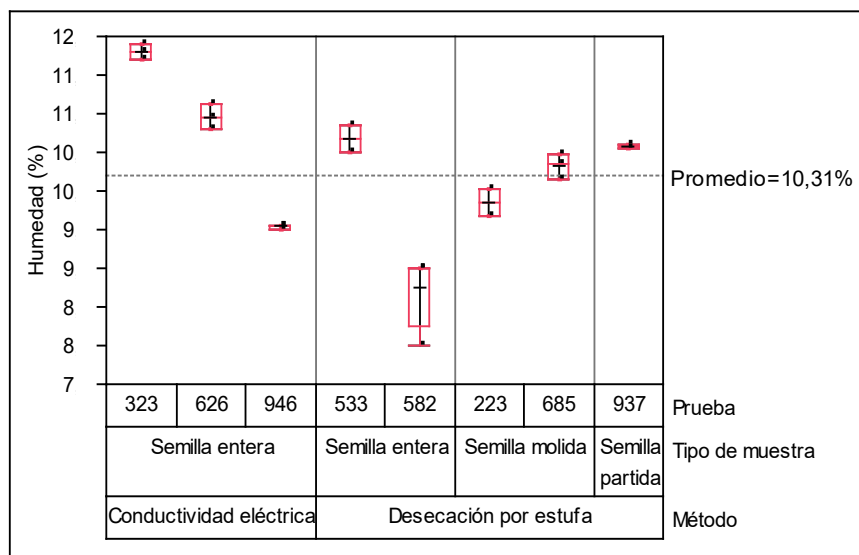


Figura 1. Diagrama de cajas de humedad en semilla de soya de diferentes pruebas de laboratorio.

procedieron del método de desecación por estufa, para dicho método se encontró que las pruebas realizadas con semilla molida y partida presentaron mayor exactitud que las de semilla entera. Todas las pruebas del método conductividad eléctrica y la prueba 582 del método de desecación por estufa fueron las más distantes al valor de referencia, indicativo de una menor exactitud.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre pruebas ($p < 0,01$) (Cuadro 3). El rango máximo de humedad entre prueba fue de 3,05% y los rangos de humedad entre prueba para conductividad eléctrica y desecación por estufa fueron de 2,26 % y 1,93%, respectivamente. Dichos valores superaron los valores de tolerancia entre prueba de 1,1% establecidos por ISTA (ISTA, 2013), indicativo de menor reproducibilidad general. La comparación de medias reveló el establecimiento de 6 grupos homogéneos cuya distribución fue independiente del tipo de métodos de ensayo utilizado (Cuadro 3). Los promedios de humedad de las pruebas 685 y 223 compartieron el mismo grupo homogéneo y fueron muy cercanos al valor de referencia, cabe destacar que dichas pruebas se realizaron bajo el mismo método y tipo de muestra pero en laboratorios diferentes lo cual indica una adecuada reproducibilidad para este caso.

Los resultados mostraron que las condiciones específicas de las pruebas afectaron de manera importante los valores de humedad. El método y tipo de muestra empleados en cada prueba afectaron en menor grado la precisión y en mayor grado la exactitud. Adicionalmente se constató diferencias en cuanto

Cuadro 3. Significación de los cuadrados medios y comparación de medias de ensayos de humedad de soja en diferentes pruebas de laboratorio

Prueba	Descripción	Humedad (%)*	
323	Conductividad eléctrica	11,80	A
626	Conductividad eléctrica	10,95	B
533	Estufa semilla entera	10,68	B C
937	Estufa semilla partida	10,57	B C
685	Estufa semilla molida	10,32	C D
223	Estufa semilla molida	9,84	D E
946	Conductividad eléctrica	9,54	E
582	Estufa semilla entera	8,75	F
Estadístico F	Cuadrado medio	2,93**	
Promedio de pruebas		10,31	
Rango		3,05	
Desviación estándar		0,93	

* Singnificativo Tukey ($p < 0,05$)

** Significativo ($p < 0,01$)

tipos de determinadores de humedad utilizados (marca y modelo) y vigencia de calibración de algunos equipos en las pruebas no conformes probablemente contribuyeron a su falta de exactitud.

Pureza

Los diagramas de cajas de los resultados de semilla pura se presentan en la Figura 2. Es importante señalar que tanto en los diagramas de dispersión como las diferencias de *z* se incluyeron adicionalmente las pruebas 574 y 955, las cuales no fueron consideradas para los estadísticos de *r*&*R* por disponer de una sola observación por ensayo.

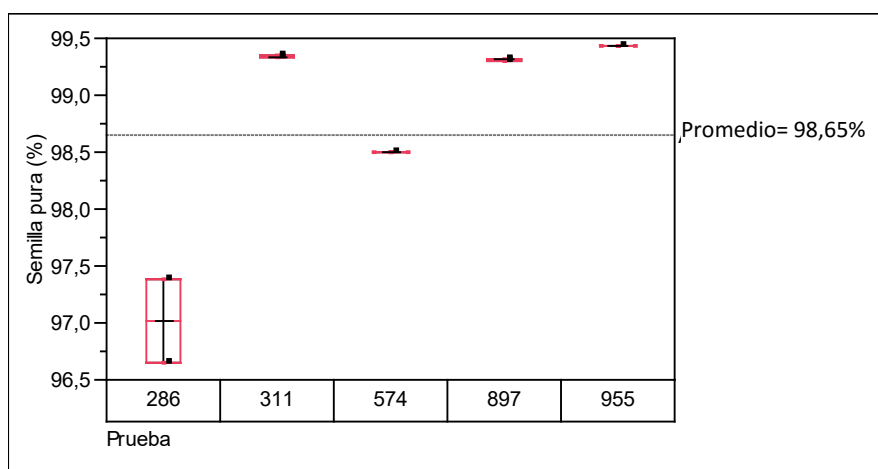


Figura 2. Diagrama de cajas de la semilla pura de soya en diferentes pruebas de laboratorio.

El promedio de semilla pura fue de 98,65%, este valor resultó inferior al exigido por la normativa nacional para la certificación de semilla de soya que exige un mínimo de 98,8% para categoría de semilla certificada y de 99% para categoría de semilla fundación y registrada (SENASA, 2009). Por otra parte, se observó que 4 de las 5 pruebas evaluadas convergieron al promedio general o valor de referencia. Las respuestas de la prueba 286 presentaron menores porcentajes de pureza, mayor amplitud intra-prueba, de todas las pruebas con replicas, y mayor distancia con respecto al valor de referencia. Los estadísticos excluyeron únicamente la prueba 286 por repetibilidad, resultando en un 66,66% de pruebas confiables con un promedio ajustado a 99,32%, una diferencia máxima intra-prueba o límite de repetibilidad de 0,03% y una diferencia máxima entre-prueba o límite de reproducibilidad de 0,06% (Cuadro 4). Las diferencias estandarizadas de *z* presentaron una variación comprendida entre 0,38 y 1,48 establecidas en cuatro posiciones de mérito correspondientes a las cuatro pruebas consideradas para este estadístico.

El promedio de otras semillas de maleza y otros cultivos fue de 0,67% y

Cuadro 4. Estadísticos de confiabilidad para variables de pureza de semilla de soya en diferentes pruebas de laboratorio

Descripción / Estadístico		Semilla Pura	Otras semillas	Materia inerte
		Pruebas excluidas (códigos)		
q de Tukey para repetibilidad		-	-	-
Consistencia intra-prueba k de Mandel		286	-	-
Cochran		286	-	286
q de Tukey para Reproducibilidad		-	286	-
Consistencia entre-pruebas h de Mandel		-	286	-
Intervalo de confianza 95%		*	*	*
N° de pruebas totales		3	3	3
N° pruebas excluidas		1	1	1
N° pruebas conformes		2	2	2
Pruebas conformes (%)		66,66	66,66	66,6
Parámetros para pruebas conformes	Media general (%)	99,32	0,36	0,1
	Varianza de la repetibilidad	0,00	0,00	0,00
	Varianza de la media de las pruebas	0,00	0,00	0,00
	Varianza entre prueba	0,00	0,00	0,00
	Desviación típica de repetibilidad	0,01	0,03	0,02
	Desviación típica de reproducibilidad	0,02	0,04	0,06
	Repetibilidad (%)	0,01	8,58	6,36
	Reproducibilidad (%)	0,02	13,39	20,45
	Límite de repetibilidad (%)	0,03	0,08	0,05
Límite de reproducibilidad (%)	0,06	0,13	0,18	

superó el 0,00% establecido como requisito para semillas certificadas de soya (SENASSEM, 2009). Los diagramas de dispersión revelaron que 4 de las 5 pruebas presentaron niveles de otras semillas consistentemente inferiores pero muy próximas al valor de referencia (Figura 3); mientras que de la prueba 286 alcanzó la mayor amplitud intra-prueba y el promedio más elevado y distante del valor de referencia. Los estadísticos excluyeron únicamente la prueba 286 por reproducibilidad, por ello 2 de las 3 pruebas resultaron conformes y presentaron promedio de otras semillas de 0,36% y límites de repetibilidad y reproducibilidad de 0,08% y 0,13%, respectivamente (Cuadro 4). Las diferencias estandarizadas de z variaron de 0,69 a 1,23 donde las pruebas presentaron cuatro órdenes de exactitud (Cuadro 5).

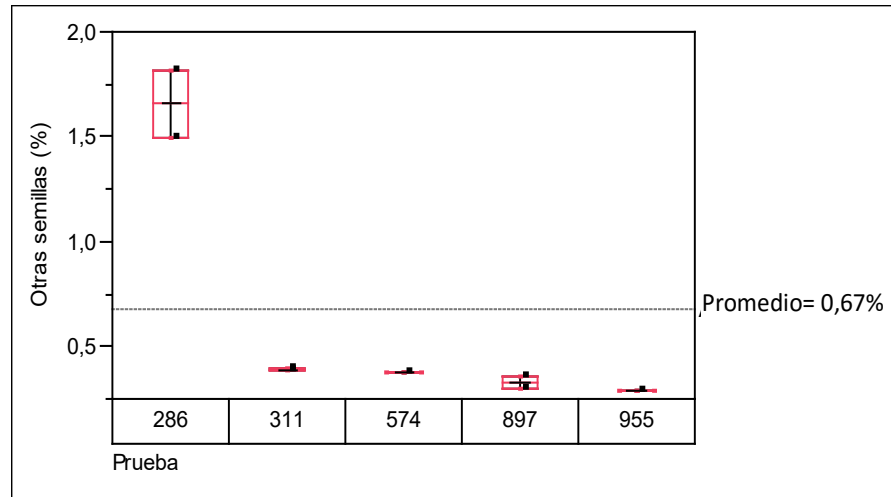


Figura 3. Diagrama de cajas de otras semillas (maleza y otros cultivos) en diferentes pruebas de laboratorio.

Cuadro 5. Diferencias estandarizadas de z para variables de pureza de semilla de soya en diferentes pruebas de laboratorio.

Prueba (Código)	Valores de z y posición de mérito		
	Semilla Pura	Otras semillas	Material inerte
311	0,44 (2)	0,92 (3)	0,78 (3)
574	1,48 (4)	0,69 (2)	0,83 (4)
897	0,38 (1)	0,37 (1)	0,60 (1)
955	0,66 (3)	1,23 (4)	0,76 (2)

La materia inerte presentó un promedio general de 0,65% que fue inferior al valor máximo de 1,00% exigido por el ente oficial nacional para certificación de semilla de soya. La distribución los niveles de materia inerte reveló que la prueba 286 mostró la mayor amplitud intra-prueba y mayor distancia con respecto al valor referencial (Figura 4). Un sólo estadístico confirmó la exclusión de la prueba 286 por repetibilidad y las dos pruebas conformes (66,66%) presentaron un promedio de 0,31%, un límite de repetibilidad de 0,05% y un límite de reproducibilidad de 0,81% (Cuadro 4). Los valores de z de materia inerte se enmarcaron entre 0,60 y 0,83 y las cuatro pruebas consideradas presentaron diferentes grados de exactitud (Cuadro 5).

Las pruebas indicaron que los laboratorios en general mostraron una adecuada consistencia para las diferentes variables de pureza. Sin embargo, los

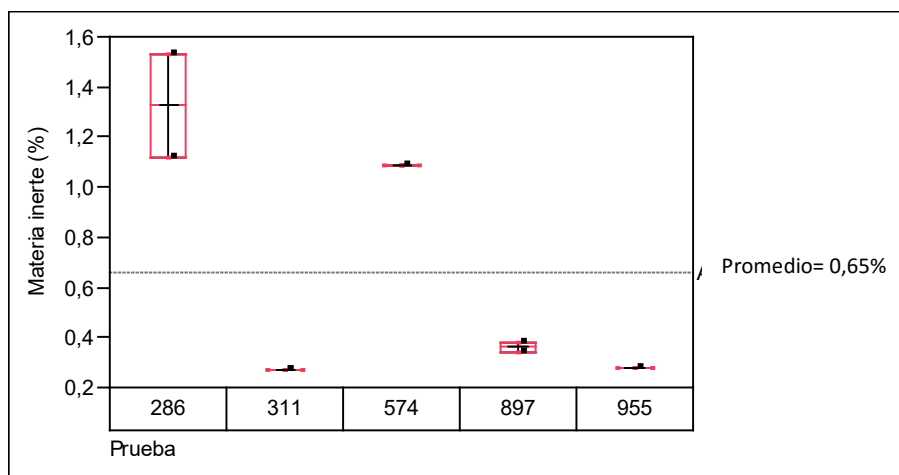


Figura 4. Diagrama de cajas de materia inerte presente en semilla de soya en diferentes pruebas de laboratorio.

resultados de un laboratorio produjeron cambios en la valoración de calidad de la semilla, conforme a los requisitos establecidos por la normativa nacional de certificación de semilla de soya. Esto puede ser atribuido a la falta de calibración de algunos equipos como la balanza y la experiencia del analista para clasificar los diferentes constituyentes físicos de la muestra que constituyen las variables de pureza que fueron determinadas. Una de las pruebas evaluadas presentó consistentemente la primera posición de mérito en todas las variables de pureza por ello el laboratorio asociado a esta prueba se considera el más exacto para ensayos de pureza de semilla de soya.

Germinación

El porcentaje de germinación o plántulas normales mostró promedio general de 84,4%, que califica como semilla de calidad estándar (>70%) conforme a la normativa nacional vigente (SENASEM, 2009). La amplitud de las cajas indican una baja dispersión general intra-prueba, a excepción de la prueba 123 (Figura 5). Al evaluar la distribución de cajas entre-prueba se encontró que, al utilizar el sustrato arena para todos los ambientes evaluados, la germinación resultó superior y se ubicó muy próxima al valor de referencia, excepto la prueba 618 que presentó un comportamiento totalmente inverso.

Los niveles de germinación de las pruebas que emplearon papel como sustrato se ubicaron muy por debajo del valor referencial. En repetibilidad todos los estadísticos indicaron consistentemente que la prueba 123 excedió los niveles de tolerancias debido a su alta dispersión intra prueba. En reproducibilidad, 2 de los 3 estadísticos aplicados indicaron falta exactitud con respecto al valor de referencia para las pruebas 618 y 863 (Cuadro 6).

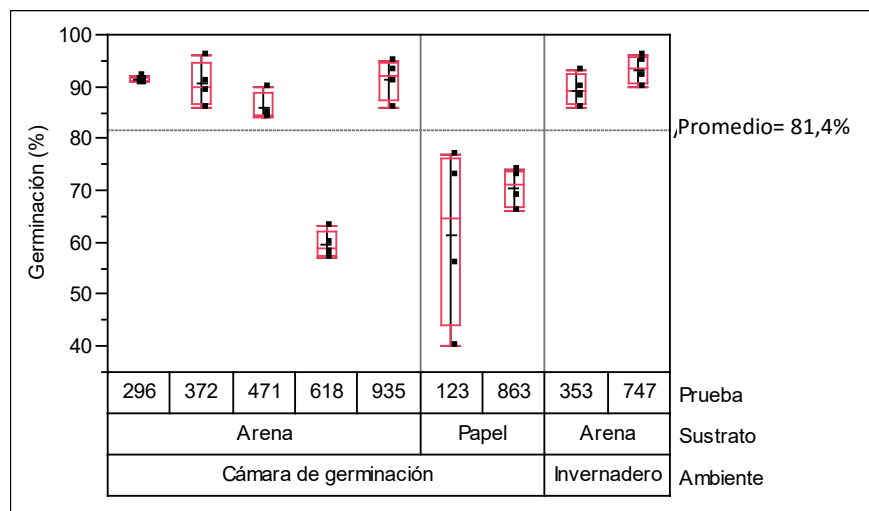


Figura 5. Diagrama de cajas de los niveles de germinación de soya (plantulas normles) en diferentes pruebas de laboratorio.

Las pruebas conformes representaron el 66,67% del total y aunque estas provenían de los dos ambientes estudiados tenían en común la arena como sustrato. Por otra parte, presentaron un promedio de germinación de 90,20% un límite de repetibilidad de 8,67% y un límite de reproducibilidad de 10,34%. Las diferencias estandarizadas de z presentaron valores comprendidos entre 0,11 y 1,75 en los cuales las seis pruebas conformes estuvieron distribuidas en cinco niveles de exactitud (Cuadro 7).

El porcentaje de plántulas anormales obtuvo un promedio general de 13,1%, las pruebas presentaron generalmente una baja amplitud intra-prueba, donde la mayor dispersión fue alcanzada por la prueba 123. El diagrama de caja establecido para plántulas anormales presentó una distribución inversamente proporcional a los valores de germinación (Figura 6). Cuando se empleó como sustrato la arena, las pruebas presentaron niveles de plántulas anormales cercanos e inferiores al valor de referencia, excepto la prueba 618. En contraste, cuando se empleó como sustrato papel, los resultados de las pruebas superaron ampliamente el valor de referencia.

Todos los estadísticos de repetibilidad excluyeron consistentemente la prueba 123 y en reproducibilidad sólo el estadístico **q** de Tukey, recomendado por ISTA (2013), reveló la falta de consistencia de las pruebas 618 y 863 (Cuadro 6). El 66,67% de las pruebas resultaron conformes, presentaron un promedio de plántulas anormales ajustado de 5,7% y sus límites de repetibilidad y reproducibilidad fueron de 6,9% y 9,2% respectivamente. Los valores de z indicaron que las seis pruebas conformes se distribuyeron en cinco grados de exactitud (Cuadro 7).

Cuadro 6. Estadísticos de confiabilidad para variables de germinación de semilla de soya en diferentes pruebas de laboratorio

Descripción / Estadísticos	Germinación	Plántulas anormales	Semillas Duras	Semillas Muertas
	Pruebas excluidas (códigos)			
q de Tukey para repetibilidad	123	123	-	-
Consistencia intra prueba k de Mandel	123	123	296	618
Cochran	123	123	296 / 123 / 618 / 863	-
q de Tukey para reproducibilidad	618 / 863	618 / 863	-	-
Consistencia entre-pruebas h de Mandel	-	-	-	-
Intervalo de confianza 95%	618 / 863	-	-	-
N° de pruebas totales	9	9	9	9
N° pruebas excluidas	3	3	4	1
N° pruebas conformes	6	6	5	8
Pruebas conformes (%)	66,67	66,67	55,56	88,8
Media general (%)	90,20	5,75	0,00	2,75
Varianza de la repetibilidad	9,59	6,19	0,00	3,35
Varianza de la media de las pruebas	6,46	6,25	0,00	8,83
Varianza entre prueba	4,06	4,70	0,00	8,00
Parámetros para pruebas conformes				
Desviación típica de repetibilidad	3,09	2,48	0,00	1,83
Desviación típica de reproducibilidad	3,69	3,30	0,00	3,37
Repetibilidad (%)	3,43	43,28	0,00	66,59
Reproducibilidad (%)	4,09	57,40	0,00	122,53
Límite de repetibilidad (%)	8,67	6,96	0,00	5,12
Límite de reproducibilidad (%)	10,34	9,24	0,00	9,43

El promedio de semillas duras fue de 1,2% y el diagrama de cajas indicó que 5 de las 9 pruebas presentaron promedios de semillas duras de 0,0% y con dispersión intra-prueba de 0,0% (Figura 7). Las pruebas realizadas bajo condición de invernadero y empleando arena como sustrato fueron consistentes para reproducibilidad. Para el resto de las condiciones las pruebas presentaron variaciones específicas con niveles de dispersión de 0,0% a 5,0%. Por otra parte, las pruebas 296 y 123 presentaron la mayor variación intra-prueba y entre-pruebas. Los estadísticos de confiabilidad permitieron la exclusión de cuatro pruebas únicamente por falta de repetibilidad y el nivel de pruebas conformes de 55,5% fue el más bajo de todas las variables de germinación estimadas (Cuadro 6). Las pruebas conformes evidenciaron ausencia de semillas duras y para los

Cuadro 7. Diferencias estandarizadas de **z** para variables de germinación en semilla de soya en diferentes pruebas de laboratorio

Pruebas (códigos)	Valores de z y posición de mérito ()			
	Germinación	Plántulas anormales	Semillas duras	Semillas muertas
123				0,92 (5)
296	0,41 (2)	0,90 (2)		0,84 (4)
353	0,37 (3)	0,20 (1)	0,00 (1)	0,92 (5)
372	0,11 (1)	1,10 (3)	0,00 (1)	0,58 (3)
471	1,75 (5)	0,20 (1)	0,00 (1)	1,76 (6)
747	1,19 (4)	1,30 (4)	0,00 (1)	0,50 (2)
863				0,08 (1)
935	0,41 (2)	1,10 (3)	0,00 (1)	0,92 (5)

indicadores de confiabilidad incluyendo los valores de **z** resultaron iguales a 0,0%, en sus respectivas unidades (Cuadro 7). Lo anterior, indica que dichas pruebas presentaron valores de semillas duras exactamente iguales al valor de referencia.

Los niveles de semillas muertas alcanzaron un valor promedio de 4,1%. La variación intra-prueba y entre-pruebas estuvo asociada a las condiciones específicas de cada prueba (Figura 8). Las pruebas realizadas en invernadero presentaron una mayor proximidad al valor de referencia, mientras que las

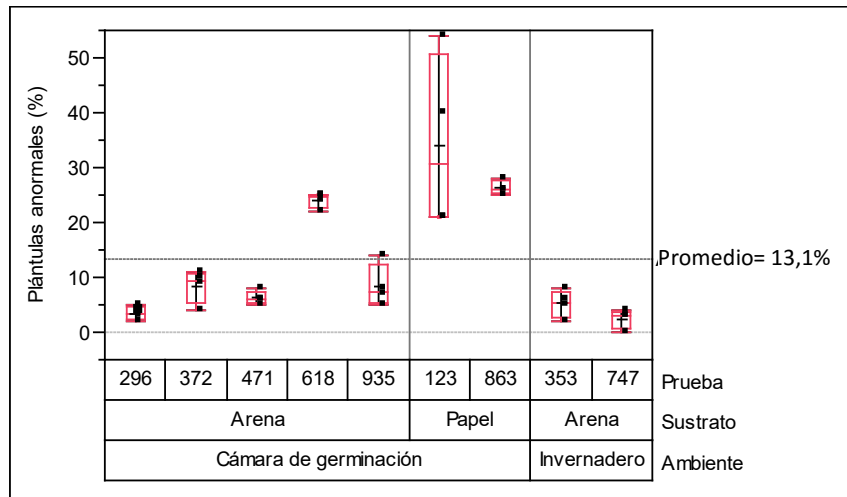


Figura 6. Diagrama de cajas de los niveles de plántulas anormales de soya en diferentes pruebas de laboratorio

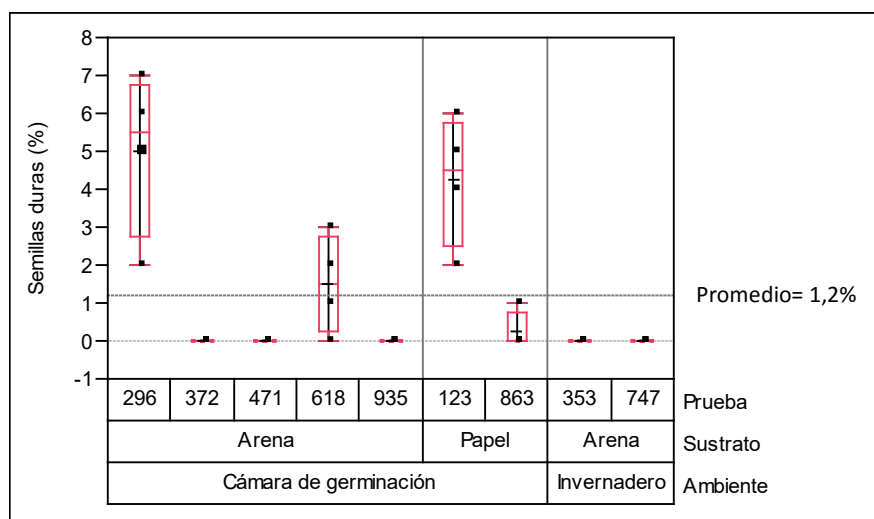


Figura 7. Diagrama de cajas de los niveles de semillas duras de soja en diferentes pruebas de laboratorio

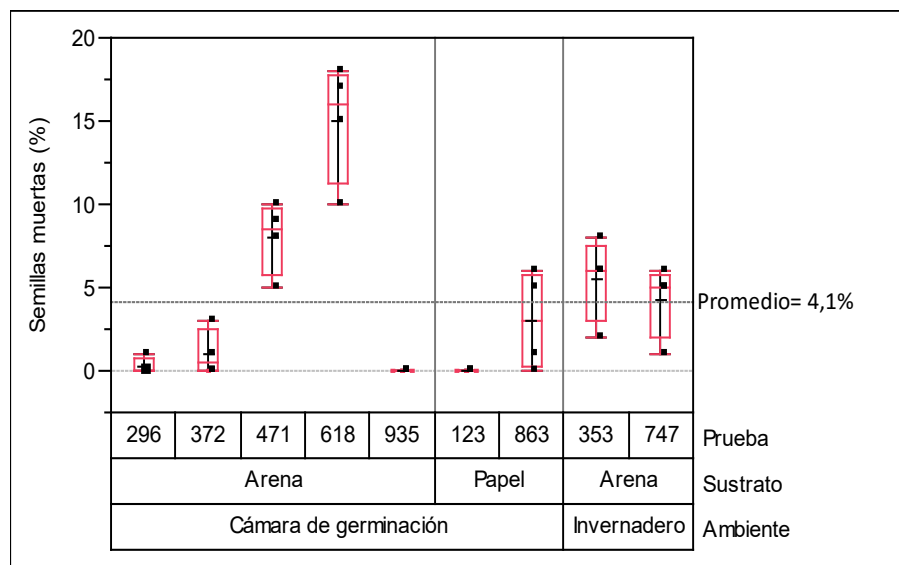


Figura 8. Diagrama de cajas de los niveles de semillas muertas de soja en diferentes pruebas de laboratorio

realizadas en cámaras de germinación no se distribuyeron consistentemente y presentaron niveles superiores e inferiores de semillas muertas con respecto al valor de referencia, incluso algunas pruebas presentaron 0,0% de semillas muertas. La prueba 618 fue la única excluida por falta de repetibilidad de acuerdo a **k** de Mandel y el porcentaje de pruebas conformes alcanzó un 88,8%, siendo el más elevado de todas las variables de calidad fisiológica estudiadas (Cuadro 6). En las pruebas no excluidas el promedio de semillas muertas fue de 2,75% y los límites de repetibilidad y reproducibilidad fueron de 5,12 y 9,43%, respectivamente. Las diferencias estandarizadas de **z** presentaron niveles entre 0,08 y 1,76 lo cual permitió establecer 6 niveles de exactitud de ocho pruebas conformes (Cuadro 7).

La confiabilidad en términos de precisión y exactitud de las variables de calidad fisiológica estuvo determinada por la combinación específica de tipo de análisis, los ambientes y los sustratos utilizados en cada prueba. La germinación (plántulas normales) y plántulas anormales estuvieron asociadas a los mayores porcentajes, en las cuales los estadísticos de repetibilidad y reproducibilidad resultaron consistentes para la exclusión de algunas pruebas que fueron realizadas en su mayoría utilizando papel como sustrato. Las variaciones de germinación encontradas resultaron muy inferiores a las encontradas por Levan *et al.* (2008) quienes, al comparar la germinación de semilla de soya mediante sustratos de papel y papel con arena, encontraron una diferencia máxima de 5,34%, estos autores también encontraron una mayor germinación en aquellos sustratos que incluían arena. Las semillas duras y muertas alcanzaron los menores porcentajes y algunas de sus pruebas fueron excluidas únicamente por repetibilidad, por otra parte se evidenció que la falta de precisión y exactitud de algunas pruebas estuvo asociada a las condiciones particulares en las cuales se realizaron.

Las variaciones de ambientes y sustratos en las cuales se llevaron a cabo los análisis de calidad fisiológica son aceptadas por las especificaciones de las normas ISTA (ISTA, 2013), sin embargo, afectaron las respuestas de algunas variables. La falta de repetibilidad y reproducibilidad de algunas pruebas puede ser producto de la frecuencia de calibración y la ausencia de verificación de calibración previo a los análisis de algunas cámaras de germinación utilizadas resultando en un control limitado de las condiciones ambientales tal como lo indicado por Syngenta (2012). Por otra parte, la naturaleza subjetiva del análisis visual, basado en una inspección con criterios ISTA no específicos para soya, puede jugar un rol importante en la expresión de algunas variables. Por ejemplo, los analistas pudieran presentar discrepancias en ciertos casos para distinguir plántulas normales de las anormales tal como fue señalado por De Pablo *et al.* (2016), en un estudio de confiabilidad de resultados de germinación con semilla de soya.

Viabilidad por tetrazolio (Tz)

Los niveles de dispersión de semillas viables de las pruebas correspondientes a cuatro laboratorios se presentan en la Figura 9, mientras que sus diferentes

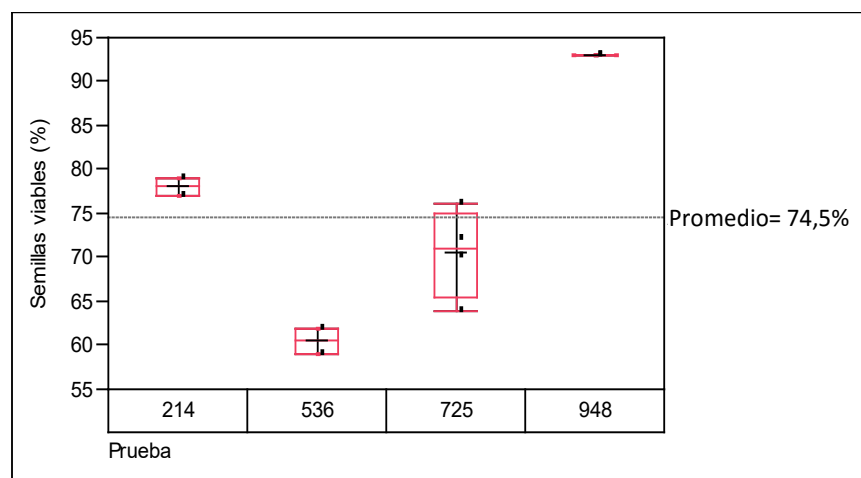


Figura 9. Diagrama de cajas de viabilidad por tetrazolio de semilla de soja de diferentes pruebas de laboratorio

Cuadro 8. Estadísticos de confiabilidad para viabilidad de semilla de soja en diferentes pruebas.

Pruebas (códigos)	Promedios semillas viables (%)	Desviación estándar
948	93,00	0,00
214	78,00	1,41
536	60,50	2,12
725	70,50	5,00

Estadístico	Pruebas no conformes
q de Tukey para repetibilidad	-
Consistencia intra-prueba k de Mandel	725
Cochran	-
q de Tukey para reproducibilidad	948 / 536 / 214
Consistencia entre-pruebas h de Mandel	-
Intervalo de confianza 95%	-
N° de pruebas totales	4
N° pruebas excluidas	4
N° pruebas conformes	0
Pruebas conformes (%)	0,00

descriptores estadísticos se resumen en el Cuadro 8. Las semillas viables presentaron un promedio de 74,5%, una diferencia entre-prueba mínima de 7,5% y una máxima de 32,5%. Por otra parte, se encontró que las diferencias de viabilidad intra-prueba estuvieron comprendidas entre 0 y 12% (datos no mostrados) y resultaron conformes a los rangos de tolerancias propuestos por Gallo *et al.* (2015), para ensayos de tetrazolio en semilla de soya. La prueba con resultados más cercanos al valor de referencia presentó la mayor amplitud intra-prueba y fue excluida por un estadístico de repetibilidad (**k** de Mandel). El resto de las pruebas presentaron resultados incompatibles conforme el estadístico de reproducibilidad **q** de Tukey referido para semillas (Miles, 1963). No se encontraron estudios para comparar las variaciones entre-pruebas, sin embargo nuestra máxima diferencia entre-prueba resultó inferior del 40% indicado por Castillo y Gaviria (2000) y del 36% encontrado por Ávila *et al.* (2012) en evaluaciones visuales realizadas con analistas expertos para asignar categorías de calidad basada en las áreas yesadas y traslúcidas de granos de arroz pulido.

Los niveles de reproducibilidad para los análisis de viabilidad por tetrazolio encontrados en el presente estudio indicaron que los laboratorios divergen en la valoración de la calidad fisiológica de la semilla de soya, lo que podría ser atribuido a la experiencia de los analistas y a la falta de verificación de temperatura de algunas cámaras incubadoras empleadas. En virtud de realizar un diagnóstico inicial de confiabilidad que abarcara un considerable número de laboratorios, se incluyeron analistas que fueron entrenados semanas antes de realizar el ensayo. Los resultados, sin embargo, ponen de manifiesto que la naturaleza visual del análisis de tetrazolio demanda de un entrenamiento más riguroso del analista hasta lograr experticia.

CONCLUSIONES

La confiabilidad de los resultados en ensayos de calidad física y fisiológica de semilla de soya en laboratorios venezolanos fue variable de acuerdo al tipo y método de ensayo, condiciones específicas de los laboratorios, calibración de los equipos, experiencia de los analistas y tipos de estadísticos de confiabilidad aplicados. Al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo de germinación se encontró que las pruebas aplicadas por los laboratorios presentaron conformidades de 66,6% en plántulas normales y anormales, 55,6% en semillas duras y 88,8% en semillas muertas. El 66,6% de los laboratorios fueron conformes y consistentes para la evaluación de todas las variables de pureza de semilla, mientras que los resultados de las pruebas de humedad y viabilidad por tetrazolio fueron discrepantes. Los resultados obtenidos plantean la necesidad de adoptar condiciones reproducibles y corroboran la importancia de la calibración periódica de los equipos y el entrenamiento de los analistas. Dichos resultados constituyen un referente para aumentar la confianza en la evaluación de los requisitos de calidad especificados en semilla de soya y otros cultivos en el país, de conformidad con las legislaciones oficiales vigentes. Se sugiere establecer estudios interlaboratorios permanentes (programas) que permitan evaluar periódicamente la competencia técnica de los laboratorios, así como identificar las desviaciones y orientar su corrección.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Ministerio del Poder Popular para Agricultura y Tierras del Gobierno de la República Bolivariana de Venezuela, por el financiamiento de este estudio a través del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Programa Plan Zamora Proyecto: PZ_OLE_SOY2.

REFERENCIAS

- Ávila, M.; E. Graterol; J. Alezones; B. Criollo; D. Castillo; V. Kuri; N. Oviedo; C. Moquete; M. Romero; Z. Hanley; M. Taylor, 2012. Concordancia entre analistas de laboratorios de Latinoamérica para la determinación de la apariencia de grano de arroz pulido mediante el uso de imágenes digitales. Archivos Latinoamericanos de nutrición ALAN. 62(2):179-184.
- Ávila, M.; M. Romero; Y. Alejos; J. Ávila; O. Verde; H. Hernández. 2013. Evaluación de la precisión de dos laboratorios venezolanos para la determinación de amilosa aparente en arroz (*Oryza sativa* L) pulido. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos RVCTA. 4(1):024-031.
- Ávila, J.; I. Orozco. 2013. XX Aniversario del Programa Interlaboratorios Microbiológicos coordinado por la Fundación CIEPE (1992-2012). V Congreso Venezolano de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracas.
- Castillo, A.; J. Gaviria. 2000. Molinería de arroz en los trópicos. Colombia: Ediagro LDTA.
- Cochran, W.; G. Cox, 1957. Experimental Design John Wiley & Son, New York.
- COVENIN. 1997. Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN 2972-2. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 2: método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método estándar de medición. Caracas, Venezuela.
- De Pablo, M.; L. Daulerio; J. Ressia; V. Martinez. 2016. Evolución de los laboratorios de A. L. A. P. en análisis de semillas de *Triticum aestivum*, *Triticum durum* y *Glycine max*. Asociación de Laboratorios Agropecuarios Privados (A.L.A.P). Comisión semillas Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.
- Fisher, R. 1925. Statistical Methods for Research Workers, Oliver and Boyd. Edinburgh, United Kingdom. 47 p.
- Gallo, C.; J. B França-Neto; M. Arango; S. Gonzalez; V. Francomano; C. Carracedo; O. Costa; R. Alves; R. Craviotto. 2015. Validación de la Prueba de Tetrazolio como Método de Vigor para semillas de *Glycine max*. INTA EEA Oliveros. 8 p.

- González de Núñez, M.; O. Verde. 2010. Curso de confiabilidad de resultados. Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). San Felipe, Venezuela. 42 p.
- ISO. 2005. Organización Internacional de Estandarización. (ISO) Norma ISO 17025:2005. Requisitos en el área para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Zurich, Suiza.
- ISTA. 2013. International Seed Testing Association. International Seed Testing Rules. Zurich, Switzerland.
- Levan, N.; A. Goggi; R. Mullen. 2008. Improving the reproducibility of soybean standard germination test. *Crop Science* 48:1933-1940.
- Miles, S. 1963. Handbook of tolerances and of measures of precision for seed testing. Edité par l' Association Internationale d'Essais de Semences. Wageningen, Hollande.
- Risso, D. 2012. El rol de las Asociaciones de semillas como facilitadores del comercio. Taller sobre Fortalecimiento de los Sistemas de Semillas de América Latina. (Taller) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- SENASA. 2009. Normas específicas de certificación de semillas de variedades de soya (*Glycine máx.* L. Merrill). Servicio Nacional de Semilla. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Maracay, Venezuela.
- Solórzano, P. 2012. Análisis productivo del cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) en Venezuela entre 2001-2010. *Alcance* 72 Revista Alcance de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Edición Especial. Maracay, Venezuela. p. 159-176.
- Syngenta. 2012. Análisis de calidad de semilla. (Taller). Venado Tuerto, Argentina.
- Tukey, J. 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 5 (2): 99-114.