
El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas.

Caso de estudio: cebadilla chaqueña.

Ruiz, María de los Ángeles

Lic. Rec. Nat., MSc en Tecnología de Semillas

Contenidos

Alcances y limitaciones del método	5
TZ es método de análisis rápido	5
TZ tiene una serie de ventajas	6
Desventajas del método	6
Principio y pasos a seguir	7
Es una prueba bioquímica	7
Procedimiento de análisis	7
La prueba de viabilidad por tetrazolio en gramíneas forrajeras. Ejemplificada en cebadilla chaqueña	9
Resumen	9
Introducción	9
Materiales y Métodos	10
Resultados y Discusión	11
Vigor por Tetrazolio	17
Bibliografía	18

Alcances y limitaciones del método

El Control de Calidad de las semillas dispone de ciertas metodologías de laboratorio que nos permiten alcanzar un importante grado de confiabilidad en la toma de decisiones comerciales, en el momento de la siembra, o bien para evaluar su posibilidad de almacenamiento.

Evaluar la calidad de un lote tiene como objetivo poder estimar su comportamiento una vez sembrado en el campo; debemos recordar que en este ambiente real de germinación, no podemos controlar con precisión la gran mayoría de los factores - temperatura, luz, humedad, sales, nitratos, exudados de otras plantas, residuos de herbicidas- que afectan la emergencia y el establecimiento inicial de las plántulas.

Entre los métodos empleados durante el proceso de control de calidad contamos con las siguientes pruebas:

1. **Primer Conteo** (conocida como **Energía Germinativa**),
2. **Conteo Final** (conocida como **Poder Germinativo**) y
3. la **Prueba Topográfica por Tetraxolio (TZ)**, utilizada fundamentalmente para determinar **Viabilidad**.

La prueba de viabilidad nos revela una serie de aspectos esenciales para conocer no solamente la calidad del lote, sino que también puede servir de guía para identificar otros factores que pueden estar afectando a las semillas; entre ellos la *dormición*, que suele ser la causa de una menor germinación, pero que no debe confundirse con mala calidad.

TZ ES MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO

La industria de la semilla requiere métodos de análisis rápidos; determinar la viabilidad de las semillas -lo cual indica la capacidad potencial de germinación-, es en este aspecto el método ideal. TZ posiblemente haya sido uno de los más grandes descubrimientos en análisis de semillas en la última centuria, y aún es poco aprovechado.

El TZ puede ser utilizado sin importar el grado de dormición de las semillas, tornándose muy importante para especies con este problema; en nuestra zona para diversas gramíneas forrajeras, entre ellas cebadillas y especies de ciclo C_4 como *Panicum* spp. TZ constituye una herramienta de gran utili-

dad para productores de semilla, clasificadores y comerciantes ya que puede ayudar en decisiones que deben ser tomadas rápidamente. Durante los meses de verano, inmediatamente a la cosecha, muchas semillas de gramíneas forrajeras poseen un alto nivel de dormición; y para completar un ensayo de poder germinativo se necesitan **alrededor de cuatro semanas** para romper dicha dormición y que se logre la germinación. En contraste, el TZ puede ser completado en **uno o dos días**, creando así la posibilidad de tomar decisiones sobre la base de este ensayo, y luego realizar la prueba de germinación estándar.

TZ TIENE UNA SERIE DE VENTAJAS

- Rápida determinación de la viabilidad del lote de semillas, importante para la toma de decisiones rápidas en la industria de semillas.
- Adecuada evaluación de la capacidad germinativa potencial, especialmente para lotes con elevada cantidad de semillas dormidas.
- Guía en el control de calidad de semillas que deben ser guardadas de un año para otro, conocido como “carry over”, puede llegar a detectar deterioro aún antes que el poder germinativo.
- Útil para estudiar la biología de las semillas y procesos de deterioro.

DESVENTAJAS DEL MÉTODO

- La interpretación visual de la tinción es subjetiva y requiere experiencia, especialmente en semillas pequeñas (Howarth y Stanwood, 1993). Esta necesidad de entrenamiento y experiencia, posiblemente haya sido la razón por la cual se lo ha utilizado poco en el pasado.
- Labor intensiva que implica al tener que cortar y evaluar las semillas.
- Puede no detectar daños menores, presencia de infección fúngica o daños por insecticidas (Vankus, 1997).
- En nuestro país y en el mundo se ha trabajado mucho en TZ; sin embargo, el método es utilizado en trabajos rutinarios de análisis, y generalmente no se intenta sacar mayor información del lote, limitándose a expresar el número de semillas viables sin otro tipo de detalles, por ejemplo tipo de daño encontrado, que en algunos casos es posible establecer (Craviotto y Arango, 2005).

Principio y pasos a seguir

ES UNA PRUEBA BIOQUÍMICA

En los embriones de las semillas, diferencia los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración).

Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio –2,3,5- triphenil tetrazolum chloride, incoloro- a formazán – color rojo-. El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función de el 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.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- 1. Hidratación:** las semillas deben embeberse para iniciar la actividad de las enzimas deshidrogenasas; además así se ablandan los tejidos, y es más fácil cortarlos.
- 2. Corte o pinchazo:** permite el contacto del TZ con los tejidos del embrión. En algunas especies, por ejemplo alfalfa, el corte no es necesario, y el TZ es adicionado a la semilla intacta.
- 3. Tinción:** las semillas se sumergen en la solución de TZ al 0,5 o 1% (a veces es necesario un buffer para balancear el pH) por un cierto período de tiempo, que puede oscilar de 2 a 18 h (ISTA, 2007) depende las especies. Durante este tiempo, los tejidos vivos se tiñen, mientras que los muertos no.
- 4. Evaluación:** en base al patrón de tinción e intensidad. El analista debe estar familiarizado con la anatomía de la semilla de la especie que está evaluando.

La prueba de viabilidad por tetrazolio en gramíneas forrajeras.

Ejemplificada en cebadilla chaqueña*

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron ajustar el tiempo de tinción y la concentración de la solución de tetrazolio para evaluar lotes de cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trin. ex Nees), y comparar los resultados de viabilidad por tetrazolio con los de poder germinativo en lotes de diferente calidad. Para la concentración de 1 % es necesario un tiempo de reacción de 2 horas como mínimo (a 30 °C), en tanto que para la concentración de 0,5 % son necesarias 4 h. La correlación entre el análisis de viabilidad por tetrazolio y el poder germinativo fue significativa ($r = 0,9977$ ***), con un intervalo de confianza para $p = (0,9953; 0,9997)$, las diferencias entre los resultados de germinación y viabilidad estuvieron dentro del rango admitido para otras especies. Se sugiere un patrón para clasificar las semillas de cebadilla chaqueña en viables y no viables.

Palabras clave: *Bromus auleticus*, viabilidad, semilla.

INTRODUCCIÓN

El análisis de viabilidad por tetrazolio se presenta como una herramienta útil para estimar rápidamente la capacidad germinativa de las gramíneas forrajeras de lenta germinación y con dormición poscosecha (Leme de Lima Días y Rego Barros, 1995). En los programas de control de calidad su uso contribuye permitiendo agilizar decisiones de compra, venta, beneficio, almacenamiento o descarte de semillas (Leme de Lima Días y Rego Barros, 1995).

La velocidad de reducción del tetrazolio es afectada por diversos factores, entre ellos: la concentración de la solución, la temperatura, la duración del preacondicionamiento y la tinción, la presión atmosférica y el nivel de dete-

* Trabajo desarrollado como parte de la Tesis de MSc. en Tecnología de Semillas de M. de los A. Ruiz; Director Dr. J.A. Argüello; Codirector Ing.MSc. N.A. Romero; Asesores Ing.MSc. M.A. Pérez, Ing.MSc. C. Vieyra, Biol.MSc. J. Di Rienzo.

rioro de las semillas (Da Costa y Marcos-Filho, 1994; Das y Sen-Mandi, 1992; Leme de Lima Dias y Rego Barros, 1995; Kruse, 1996).

Los objetivos de este trabajo fueron ajustar el tiempo de tinción y la concentración de la solución de tetrazolio para evaluar lotes de cebadilla chaqueña, y comparar los resultados de viabilidad por tetrazolio con los de poder germinativo en lotes de diferente calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para responder a los objetivos, se realizaron dos ensayos. El primero de ellos para ajustar la metodología de trabajo, y el segundo para evaluar lotes de diferente calidad mediante el análisis de tetrazolio, y ver su correspondencia con la germinación de los mismos.

Ensayo 1. Ajuste del tiempo de tinción y concentración de la solución

El ensayo se realizó con semilla de cebadilla chaqueña cultivar Pampera INTA, cosechada en forma directa con una cosechadora de parcelas. Luego de la cosecha, la semilla se dejó expandida sobre el suelo durante 30 días (25 ± 5 °C) para que terminara de secarse naturalmente, y no recibió tratamientos posteriores de despunte, ni curado. A los cuatro meses de cosechada se iniciaron las pruebas de viabilidad. El poder germinativo del lote se determinó de acuerdo a las condiciones óptimas establecidas en trabajos previos, estimándose una capacidad germinativa de 89 ± 2.6 %.

Se probaron dos concentraciones de solución de tetrazolio: 0,5 y 1 %; y diferentes tiempos de tinción: 1/2, 1, 2, 4, y 6 horas.

Procedimiento de análisis:

1. Preacondicionamiento

Los antecios se colocaron entre papel húmedo por un lapso de 18 horas. Durante ese lapso, las muestras se mantuvieron en la parte inferior de la heladera (10 °C).

2. Corte y tinción

Los antecios se cortaron longitudinalmente a lo largo del embrión y 3/4 partes del endosperma, y se sumergieron en la solución de tetrazolio. La temperatura para la reacción fue de 30 °C.

3. Evaluación

Se lavaron con agua corriente, y se procedió a evaluar la superficie de corte, colocándose sobre un papel humedecido, bajo lupa binocular

(x20). De esta manera se clasificaron de acuerdo a las zonas coloreadas en categorías de tinción.

Ensayo 2. Correspondencia entre TZ y poder germinativo

Para este ensayo se utilizaron once lotes de cebadilla chaqueña de diferente calidad, evaluada previamente por ensayos de germinación de acuerdo a condiciones determinadas en otros ensayos (Ruiz y otros, 2005).

Las semillas fueron tratadas durante su precondicionamiento de manera similar al Ensayo 1. El tiempo de tinción, y la concentración de la solución estuvieron de acuerdo al ajuste realizado en el primer ensayo.

Las semillas se clasificaron en viables y no viables teniendo presente las indicaciones de ISTA para *Bromus* spp., y antecedentes en otras gramíneas forrajeras (Peretti, 1994; Aranguren, 1997; Martinelli, 1997).

Los tratamientos se dispusieron según un Diseño Completamente Aleatorizado. Las unidades experimentales fueron muestras de 100 semillas en el ensayo 1, y 50 semillas cada una en el ensayo 2; se emplearon cuatro repeticiones.

En el Ensayo 1 se determinaron valores medios error estándar. En el Ensayo 2, se realizó Análisis de Correlación de Pearson entre poder germinativo y viabilidad estimada por tetrazolio, y se calculó el Intervalo de Confianza para ρ .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1. Ajuste de la concentración de la solución y tiempo de tinción

La Figura 1 muestra la evolución del porcentaje de semillas teñidas en función del tiempo de tinción y de la concentración de la solución.

A la hora de tinción, la coloración de las partes viables era de un tono rosado claro para la concentración de 0,5 %, y rosado más intenso para la concentración del 1 %, todavía no se había alcanzado la máxima viabilidad, teniendo presente el poder germinativo del lote. Para la concentración de 1 %, a las dos horas se alcanzó la viabilidad máxima, en cambio trabajando con la concentración de 0,5 %, todavía no había alcanzado dicho valor. Estos resultados coinciden con la metodología indicada para *Festuca* y *Lolium* (Leist, 1997). A las cuatro horas, no se encontraron diferencias entre concentraciones, la coloración era rojo carmín para ambas concentraciones de la solución, y los sectores teñidos eran similares.

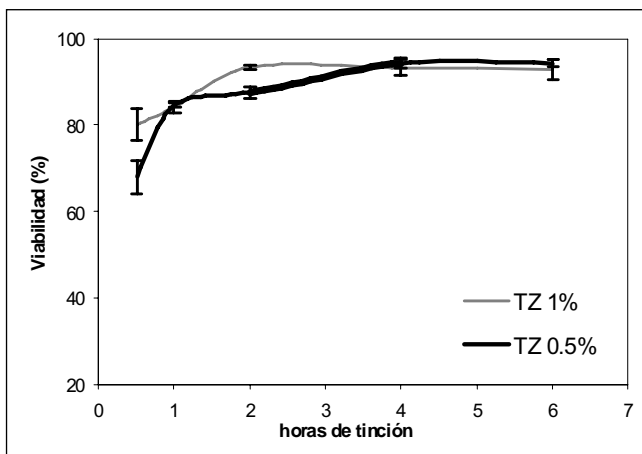


Figura 1. Efecto del tiempo de tinción (a 30 °C) y de la concentración de la solución de tetrazolio (0,5 y 1 %) sobre la determinación de viabilidad de las semillas cebadilla chaqueña.

Del análisis de estos resultados se concluye que para la concentración de 1 % es necesario un tiempo de reacción de 2 horas como mínimo (a 30 °C), en tanto que para la concentración de 0,5 % es necesario un tiempo de tinción de 4 horas. Esto concuerda con lo propuesto para *Bromus spp.* en ISTA.

Ensayo 2. Correspondencia entre tetrazolio y poder germinativo

La Tabla 1 muestra los valores de poder germinativo y viabilidad de los diferentes lotes evaluados.

En las Tablas 2 y 3 se muestra el criterio para la evaluación por tetrazolio de las semillas de cebadilla chaqueña, el mismo fue elaborado en función de

Tabla 1. Poder germinativo y viabilidad por tetrazolio de diferentes lotes de cebadilla chaqueña.

± = error estándar

Lote	Poder germinativo (%)	Viabilidad (%)
1	2 ± 1.4	1 ± 1.0
2	0 ± 0.0	0 ± 0.0
3	95 ± 0.6	91 ± 1.8
4	0 ± 0.0	0 ± 0.0
5	0.5 ± 0.5	0 ± 0.0
6	92 ± 1.5	93 ± 1.3
7	90 ± 1.4	95 ± 1.8
8	70 ± 1.4	71 ± 1.7
9	7 ± 0.5	6 ± 1.6
10	22 ± 2.2	18 ± 1.8
11	49 ± 2.3	47 ± 2.3

Tabla 2. Criterios para la evaluación de semillas de cebadilla chaqueña mediante el análisis de tetrazolio. I. Semillas VIABLES.

Categorías	Embrión	Escutelo
1	Completamente teñido de color rojo carmín (a) o rosado intenso (b)	Completamente teñido de color rojo carmín (a) o rosado intenso (b)
2	Completamente teñido	1/3 o menos del extremo superior (a) y/o inferior (b y c) del escutelo sin teñir
3	Coleoriza y 1/3 o menos de la radícula sin teñir (a)	Completamente teñido

(a) y (b) se corresponden con los esquemas de la Figura 2.

Tabla 3. Criterios para la evaluación de semillas de cebadilla chaqueña. II. Semillas NO VIABLES.

Categorías	Embrión	Escutelo
4	Completamente teñido de color rojo carmín (a) o rosado más o menos intenso (b)	Completamente sin teñir (blanco o blanco amarillento) (a y b)
5	Completamente teñido(a y b)	Más de 1/3 superior y/ o inferior sin teñir (a y b)
6	Completamente teñido	Parte central del escutelo sin teñir.
7	Plúmula sin teñir en su totalidad (a), o en el extremo superior (b)	Completamente teñido (a), teñido en partes (b), o completamente sin teñir
8	Radícula completamente (c y d) o más de 1/3 sin teñir (a y b)	Completamente teñido, teñido en partes (a,b y c), o completamente sin teñir (d)
9	Sin teñir en su totalidad (a), o de color rosa muy pálido amarillento (b y c)	Completamente teñido de color rosa pálido (c) Teñido en partes (b), o completamente sin teñir (a)
10	Inmaduro (pequeño y no se distinguen bien sus partes constituyentes), sin teñir	Sin teñir
11	Ausente	Ausente (la semilla sólo posee endosperma)

(a), (b), (c) y (d) se corresponden con los esquemas de la Figura 3.

la observación de los distintos lotes con que se trabajó.

En la Figura 2 puede observarse la representación esquemática de las categorías de tinción por TZ encontrados para semillas viables, y en la Figura 3 para aquellas no viables, los mismos se corresponden con los casos des-

criptos en las Tablas 2 y 3. Para la clasificación de una semilla como viable, se tuvieron en cuenta los antecedentes de ISTA (2007) para *Bromus spp.* con respecto a la tolerancia de 1/3 o menos de la radícula no viable. Se toleró como máximo, 1/3 del extremo superior o inferior del escutelo no viables, de acuerdo a las observaciones realizadas en otras gramíneas forrajeras (Martinelli, 1997).

En general se observaron las coloraciones: rojo carmín o rosa intenso (viable), blanco o blanco amarillento (no viable), y rosa pálido amarillento (no viable). Esta última coloración fue considerada no viable teniendo presente antecedentes de otras especies de la familia *Poaceae* (Peretti, 1994; Aranguren, 1997; Martinelli, 1997).

También se encontraron casos de ausencia de embrión, como fue observado en otras gramíneas forrajeras (Aranguren, 1997; Martinelli, 1997). Esto posiblemente sea debido a un desbalance hormonal durante el desarrollo de la semilla (Bewley y Black, 1994). No se encontraron embriones verdosos ni







V I A B L E S	Categorías			
	1	 1a	 1b	
	2	 2a	 2b	 2c
	3	 3a		

Figura 2. Categorías (1, 2 y 3) de embriones de semillas **viables** de cebadilla chaqueña.















NO VIABLES	4	 
	5	 
	6	
	7	 
	8	   
	9	  

Figura 3. Cate-
gorías (4, 5, 6, 7, 8 y
9) de embriones **NO**
viables de cebadilla
chaqueña.

grisáceos como en *Setaria* y pasto llorón (Aranguren, 1997; Martinelli, 1997).

La correlación entre el análisis de tetrazolio y el poder germinativo fue significativa $r = 0,9977^{***}$, con un intervalo de confianza para $p = (0,9953; 0,9997)$. Luego del ajuste de metodología, se encontró una fuerte evidencia de correlación entre poder germinativo y viabilidad por tetrazolio, las diferencias entre los resultados de germinación y viabilidad estuvieron dentro del rango admitido para otras especies (Leme de Lima Dias y Rego Barros, 1995).

En base a estos resultados, se puede concluir que el ensayo de tetrazolio utilizando el patrón sugerido, permite clasificar lotes de cebadilla chaqueña de diferente calidad, presentando alta correspondencia con el poder germinativo.

Vigor por Tetrazolio

En algunas especies se ha puesto a punto el análisis de vigor por TZ, por ejemplo en soja y trigo, en este aspecto ha trabajado desde hace varios años el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA.

Trigo: pasos para la evaluación (Craviotto y Arango, 2005)

1. Un analista de viabilidad seguramente podrá distinguir a primera vista aquellos embriones que se encuentran en perfecto estado de aquellos que manifiestan un deterioro completo, logrando así conformar **dos primeras categorías de semillas: Viables Sin Defectos y No Viables.**

2. A continuación, entre las viables con defectos, se reconocen lesiones del embrión que constituyen un límite crítico al concepto de viabilidad, y se clasifican como **Viables con Defectos Severos, y Viables con Defectos Leves.** Es así que con esta forma de operación se conforma el análisis completo del lote y se determina el valor de **Viabilidad por Tetrazolio** y por otra parte, el método de registro permite realizar una clasificación de tal manera de poder asimilar las clases de viabilidad a parámetros de clase en el atributo de **Vigor.**

La proporción de semillas clasificadas como Viables Sin Defectos, Viables Defectos Leves y Viables Defectos Severos definirán las categoría de Vigor Alto, Medio y Bajo respectivamente.

El método permite también realizar una identificación de estructuras embrionarias con lesiones, de gran utilidad no solo para análisis de rutina sino también en investigación. Esto constituye un elemento de gran importancia cuando intentamos ver la **historia del lote** de semillas en aspectos ligados no solo a la producción de campo sino también al manejo en la pos-cosecha (daños de secado, envejecimiento en silo, daños por insectos, etc.)

Bibliografía

- Aranguren, M.B. 1997. Tetrazolium test procedure for *Setaria italica*. ISTA.Tetrazolium Workshop, 3- 7 November. Buenos Aires, Argentina. National Seed Institute Oficial Seed Testing Station Argentina. 7 pp.
- Bewley, J.D. and M. Black. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. 2 ed. New York. London. pp. 131-136.
- Craviotto, R.M. y M.R. Arango. 2005. Simiente de trigo: nueva herramienta en el control de calidad. INTA EEA Oliveros. Para mejorar la producción 31: 48-50.
- Da Costa , N.P. and J. Marcos-Filho. 1994. Alternative methodology for the Tetrazolium test soybean seeds. Seed Science and Technology 22: 9-17.
- Das, G. and Sen-Mandi, S. 1992. Triphenil tetrazolium chloride staining pattern of differentially aged wheat seed embryos. Seed Science and Technology 20: 367-373.
- Howarth, M.S. and P.C. Stanwood. 1993. Tetrazolium staining viability test using color image processing. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 36:1937-1940.
- ISTA. 2007. Chapter 6: Tetrazolium test. In: International Rules for Seed testing. Seed Science and Technology. 6-10.
- Kruse, M. 1996. Embryo excision versus longitudinal cut in tetrazolium viability determination of cereal seeds. Seed Science and Technology 24: 171-183.
- Leist, N.O. 1997. Tetrazolium test procedure for *Triticum aestivum*. ISTA Tetrazolium Workshop, 3-7 November, Buenos Aires, Argentina. National Seed Institute Oficial Seed Testing Station Argentina. pp. 17.
- Leme de Lima Dias, M.C. and A.S. Rego Barros. 1995. Avaliação da qualidade de sementes de milho. Circular Nº 88. Instituto Agronômico de Paraná, Londrina – Paraná, Brasil. pp. 43.
- Martinelli, A.H. 1997. Tetrazolium test procedure for *Eragrostis curvula*. ISTA Tetrazolium Workshop, 3-7 November, Buenos Aires, Argentina. National Seed Institute Oficial Seed Testing Station Argentina. pp. 4.
- Peretti, A. 1994. Manual para análisis de semillas. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. pp. 109-133.
- Ruiz, M.A., Pérez, M.A. and Argüello, J.A. 2005. Conditions and stimulation for germination in *Bromus auleticus* Trin. seeds. Seed Science and Technology 34: 19-24.
- Vankus, V. 1997. The Tetrazolium Estimated Viability Test for Seeds of Native Plants. In: Landis, T.D.; Thompson, J. R., tech. coords. National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-419. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 57-62. Available at: <http://www.fcnanet.org/proceedings/1997/vankus.pdf>

Diseño Gráfico

Francisco Etchart

Impresión

Omar A. Bortolussi

Luisa Blatner de Mayoral

Gustavo J. Moyano

Impreso en los talleres gráficos de la
E.E.A. INTA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas"

Tirada de 1.000 ejemplares

Marzo 2009