

APLICACIÓN DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD EN SEMILLAS DE *PINUS PINEA*: TEST DE TETRAZOLIO E ÍNDIGO CARMÍN

Application of colorimetric methods for the viality determination of *Pinus pinea* seeds: tetrazolium and indigo carmine tests

L. F. Benito-Matías*, N. Herrero Sierra, I. Jiménez y J. L. Peñuelas Rubira

C.M.N.F. "El Serranillo", MMA, DGCONA. Ctra. Fontanar Km 2, Apdo. Correos 249. 19001-GUADALAJARA (España). Correo electrónico: serranillo@mma.es

*persona de contacto

Resumen

Se analiza la utilidad de dos métodos bioquímicos (test topográfico al tetrazolio, test de indigo carmín) como estima de la germinación de lotes de semillas. Ambas técnicas sirven para evaluar la viabilidad de semillas forestales mediante tinción. La técnica del tetrazolio tiñe las partes vivas de la semilla; el indigo carmín tiñe las partes muertas del embrión. Se utilizaron semillas de *Pinus pinea* de diferentes cosechas y procedencias. Se presentan los resultados obtenidos que indican que ambas técnicas necesitan mejoras como predictores, a pesar de ofrecer resultados estadísticamente significativos.

Palabras clave: *Facultad germinativa, Potencial germinativo, Viabilidad, Test topográfico al tetrazolio, Test del indigo carmin*

Abstract

Pinus pinea seed viability has been evaluated by two methods: the tetrazolium and the indigo carmine test. A significant relationship between germination and seed viability determined by both methods, either the tetrazolium or the indigo blue test, was found. But determination coefficient was not high enough to conclude that both test are good predictors of seed germination. More studies are needed to develop others viability methods as estimators of the germination of *Pinus pinea* seeds.

Keywords: *Germination, Viability, Tetrazolium test, Indigo carmine test*

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la forma más segura de corroborar la calidad de lotes de semillas proviene de la realización de ensayos de germinación, en los que bajo unas condiciones ideales de luz, temperatura, humedad y sustrato se hacen emerger las plantas. Pero tiene el inconveniente de que requiere, en la mayoría de los casos, excesivo tiempo para la observación de los resultados. La International Seed Testing Association (ISTA) es una asociación que se dedica al estudio de protocolos de análisis con el fin de determinar las condiciones y los métodos más idóneos para calibrar la calidad y estado de semillas, aunque la metodología de especies forestales del área mediterránea es escasa.

La evaluación de la viabilidad de las semillas permite la sustitución de los ensayos de germinación para conocer el nivel de calidad de diferentes lotes de semillas. En este trabajo intentamos encontrar técnicas que sean rápidas, objetivas, sencillas, económicas, reproducibles e interpretables. En este punto conviene definir la facultad germinativa de la semilla, que es la proporción o tanto por ciento de semillas que dan lugar a un germen normal, que se obtiene tras realizar un ensayo de germinación. La potencia germinativa o viabilidad sustituye al ensayo de germinación, y consiste en determinar potencialmente la máxima germinación de un lote. En este último caso son muy usados los métodos colorimétricos, como el test del tetrazolio o el del índigo carmín.

El test de tetrazolio se empezó a desarrollar ampliamente a partir de 1950, ya que fue entonces cuando se creó el Comité de Tetrazolio que, tras muchos años de investigación, consiguió reunir una gran cantidad de conocimientos sobre este ensayo. Posteriormente, y gracias al borrador que aprobó el comité en el Congreso ISTA de Viena en 1980 se recoge un listado de más de 650 especies agrícolas (ISTA, 1999). Por este motivo, se ha usado principalmente para evaluar el vigor de numerosas semillas agrícolas, sin embargo la bibliografía referente a especies forestales, y concretamente las pertenecientes al grupo de las consideradas mediterráneas es todavía muy escasa.

La necesidad de desarrollar técnicas predictivas lleva a investigar la tinción de embriones

con índigo carmín. Lo complicado de esta técnica es agrupar los grados de tinción tras la tinción, labor más o menos bien desarrollada en la primera mitad del siglo pasado (SCHIMDT, 1937; PRATS ZAPIRAÍN, 1944). Es útil para especies de pináceas, aunque no hay constancia de su utilización en otras especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron 15 lotes de semillas de *Pinus pinea* de diferente calidad (tabla 1), considerada a partir del porcentaje final de germinación de cada uno de ellos, de manera que existiera suficiente variedad. Se dispusieron 3 ensayos, en los que se trataba de comparar la facultad germinativa de cada lote, obtenida en un ensayo de germinación, con los resultados de potencia germinativa obtenidos mediante la realización de dos métodos bioquímicos: el test de tetrazolio o el test de índigo carmín.

El objeto del ensayo de germinación es calcular la facultad germinativa del lote estudiado, que refleja la capacidad de germinar bajo condiciones ideales de un lote de semillas. Se separaban cuatro repeticiones de 50 semillas elegidas al azar, se colocaban en bandejas de plástico en un sustrato constituido por arena calibrada y pH comprendido entre 6,0 y 7,5. La cantidad de arena utilizada fue de 5 kg, a la que se añadían 900 ml de agua destilada y 18 ml de cryptonol (fungicida) al 1% diluido en agua. El recipiente ya preparado se introducía en una germinadora con luz fluorescente, con una temperatura constante de 20° C, y periodos de luz/no luz de 8/16 horas. A los siete días se realizó el primer conteo. Las plántulas se clasificaban en normales (todas sus partes están bien desarrolladas), anormales (presentan alguna malformación en sus órganos). Las semillas que no habían germinado, se analizaban e incluían en dos categorías: muertas (el embrión dañado irremediablemente) o vanas (carecen de embrión).

El test topográfico al tetrazolio es un ensayo bioquímico basado en la coloración que adquieren las células vivas al producirse la reducción del indicador por la actividad de la deshidrogenasas (ISTA, 1999). El indicador es una solución incolora y acuosa de cloruro 2,3,5-trifenil tetra-

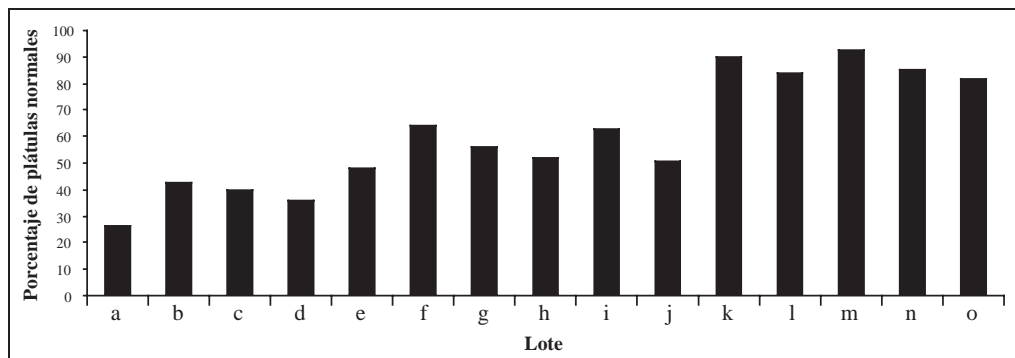


Figura 1. Resultados en porcentaje de plántulas normales del ensayo de germinación por lote

zolio al 0,1%. Esto permite distinguir bien las partes vivas de la semilla (teñidas de rojo) de las muertas (no coloreadas). El ensayo se efectúa sobre cuatro repeticiones de 25 semillas. Tras retirar el pericarpio de las semillas, se realiza un corte transversal en el extremo distal, en concreto por la parte de los cotiledones (la zona más redondeada de la semilla), que afecte a una tercera parte del piñón. Se sumergen posteriormente en una solución de tetrazolio durante 12 horas, a 20-25°C. Las semillas se clasifican en *vivas*: el embrión y el endospermo en su cara interna están teñidos uniformemente de color rojo, brillante y lustroso; *muertas*: embriones blancos o con la radícula y/o el endospermo completamente blancos (normalmente los tejidos de esta categoría están flácidos y con falta de brillo (SAVONEN, 1997); o de *vitalidad limitada*: según la ISTA, en este grupo se incluirían todas aquellas semillas cuya tinción no puede encuadrarse en ninguno de

los grupos anteriores. En este último grupo se consideraron las semillas que presentaron manchas blancas o claras distribuidas irregularmente por el endospermo o en el embrión, o cuando el color rojo era poco intenso.

En el test de indigo carmín se produce una coloración diferencial de los tejidos vivos y muertos del embrión expuesto al colorante índigo-carmín (PRATS ZAPIRAÍN, 1944). Así, se tiñen de azul los tejidos muertos y los tejidos vivos permanecen incoloros. También se realizó con 4 repeticiones de 25 semillas. Al igual que en el anterior ensayo, es necesario eliminar la testa. Se introducen las semillas sin pericarpio en un recipiente con agua destilada durante aproximadamente 18 horas para reblandecer el endospermo y extraer el embrión en su totalidad. La solución índigo-carmín al 0,15 % se prepara disolviendo 15 mg de $C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$ en 100 cc de agua destilada. Los embriones se colocan después en la

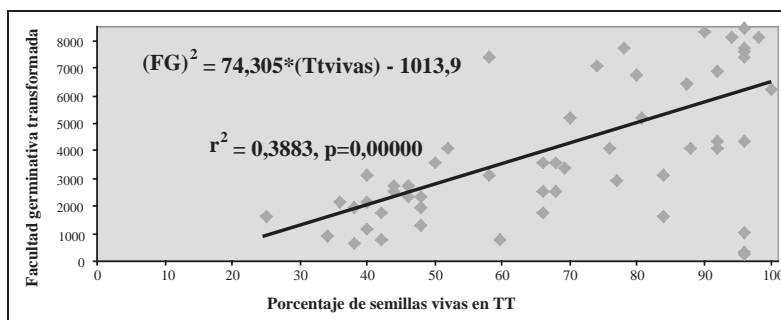


Figura 2. Correlación entre el porcentaje de semillas normales en el ensayo de germinación $(FG)^2$ y el porcentaje de semillas vivas en el test de tetrazolio (TT)

solución y se mantienen sumergidos durante 3 horas a temperatura ambiente. La evaluación también diferenciará tres categorías: *vivos*: embriones blancos o aquellos que tengan manchas puntuadas de color azul que no estén localizadas en la radícula, aunque si el embrión tiene los cotiledones ligeramente teñidos se considera en la categoría de vivo (si están muy teñidos pasan a la categoría de vitalidad limitada); *muertos*: cuando el embrión tiene la zona de la radícula completamente teñida, cuando las manchas en la radícula son mayores del 50 %, o se observan manchas de color azul intenso de una forma continua y con igual intensidad a lo largo o alrededor del embrión; y *de vitalidad limitada*: se incluyen todos aquellos embriones que no se pueden englobar en alguno de los grupos anteriores. En este ensayo, se interpretaron como embriones de vitalidad limitada aquellos que tenían zonas teñidas de color azul, aunque no quedaba claro si estaban coloreadas por daño al extraer el embrión o porque realmente eran zonas muertas.

Posteriormente, los resultados se sometieron a un análisis estadístico mediante el programa STATISTICA 6.0.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de facultad germinativa están representados en la figura 1, mientras que los de potencial germinativo obtenidos en este ensayo se muestran en la tabla 1. Para comparar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de correlación, tras asegurarse de que las variables cumplían las directrices de distribución normal mediante el test de Levene (figuras 2 y 3). Además, se realizó un análisis de regresión múltiple, de forma que explicara de manera más satisfactoria la facultad germinativa: $(FG)^2 = 131,66*(TTvivos) - 73,75*(ICvivos) - 3604,75$; r^2 ajustada=0,60, $p=0,0000 > 0,05$.

DISCUSIÓN

Los estudios de caracterización de métodos de análisis de viabilidad siempre necesitan de variedad en la calidad de los lotes, para poder contrastar los problemas en la evaluación de las diferentes calidades (CHAI SURISRI *et al.*, 1993). Para llevar a cabo el test de determinación de la

Lote	Procedencia/cosecha	Semillas vivas en test del tetrazolio (%)	Semillas vivas en test del indigo carmín (%)
A	Biar 93/94	93 ag	29 af
B	Cataluña litoral 94/95	43,50 bd	63 bcefg
C	Garrovillas 96/97	49,90 bcd	56,06 cgh
D	Garrovillas 96/97	34,25 d	60,50 bcegh
E	La Mancha 95/96	45 bd	59,64 bceh
F	Garrovillas 96/97	78,5 aeg	83,50 dei
G	Garrovillas 96/97	69,77 cef	71,82 bcdehjk
H	Cataluña litoral 94/95	60 bef	43,50 fg
I	La Mancha 95/96	91 af	90 di
J	Tiétar y Alberche 97/98	43,5 bd	51,08 afh
K	Tiétar y Alberche 97/98	96,97 a	99,99 i
L	La Mancha 97/98	95,97 a	93,78 ij
M	Garrovillas 97/98	93,50 ag	92,83 ik
N	La Mancha 95/96	71,50 fg	74,29 bcfehijk
O	Cataluña litoral 94/95	80,37 afg	80,50 bcei

Tabla 1. Caracterización de los lotes: resultados del potencial germinativo obtenido en cada análisis. Resultados seguidos de la misma letra indican mismo nivel de significación en el test de Scheffé

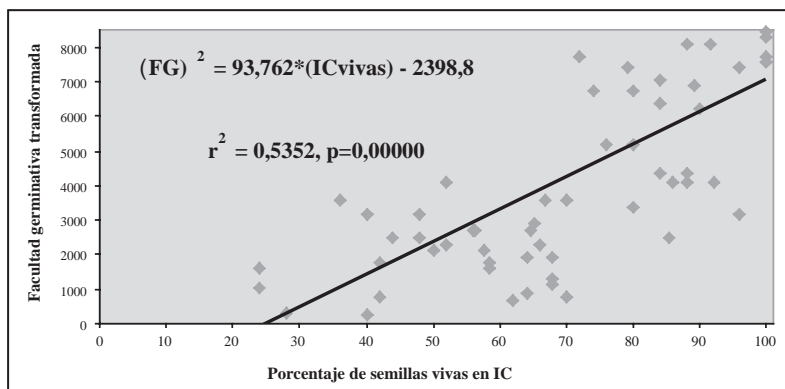


Figura 3. Correlación entre el porcentaje de semillas normales en el ensayo de germinación (FG)² y el porcentaje de semillas vivas en el test de índigo carmín (IC)

viabilidad al tetrazolio se siguieron las indicaciones que la ISTA propone para las semillas de pino piñonero, pero se introdujeron las modificaciones que se consideraron necesarias para conseguir unas mejores estimaciones. Las Normas Internacionales aconsejan la humidificación previa de las semillas con el fin de favorecer la tinción con sal de tetrazolio. La reducción de la duración del período de humidificación puede ocasionar variaciones en los resultados obtenidos en el test al tetrazolio (DA COSTA & MARCOS-FILHO, 1994). Por el contrario, la humidificación previa de las semillas ralentiza el metabolismo y aumenta rápidamente la respiración, de forma que podría disminuir la reacción de reducción catalizada por las deshidrogenasas que caracteriza al test de tetrazolio (VERTUCCI & LEOPOLD, 1984). La eliminación de las cubiertas de las semillas es una operación muy delicada que puede ocasionar daños en la semilla que más tarde se verán reflejados en la interpretación de los resultados obtenidos tras una tinción. Sin embargo, “esta operación permite reducir considerablemente el tiempo de tinción, consiguiendo con esto un test mucho más rápido” (BITTENCOURT & VIEIRA, 1996). En nuestro ensayo se suprimió la humidificación previa de las semillas, sustituyéndola por la eliminación de la testa de forma manual. Esto permitió una correcta humidificación, tinción y posterior interpretación de los resultados. Así, para las semillas de pino piñonero, a pesar de que la ISTA aconseja 18 horas de tinción, en

nuestro ensayo 12 horas resultaron suficientes en el caso del tetrazolio, y tan sólo 3 horas para el índigo carmín.

Las modificaciones realizadas en el protocolo del test de tetrazolio no supusieron mejoras en la estimación de la facultad germinativa. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$), pero el coeficiente de correlación ($r^2 = 0,3883$) resultó demasiado bajo como para poder usar esta técnica para estimar la germinación de un lote. El test de índigo-carmín, pese a no estar recogido en las Normas Internacionales (ISTA, 1999), ofreció mejores estimaciones que el TT ($r^2 = 0,5352$ para el índigo frente a $r^2 = 0,3883$ del TT).

Sin duda, los lotes de baja germinación o que presentan un gran número de germinaciones anormales (lote A de nuestro ensayo, datos no aportados) supusieron una dificultad añadida en la interpretación de la tinción para cualquiera de ambos métodos, significándose sobre todo en el gran número de semillas (TT) o embriones (IC) que se incluyeron en el grupo de vitalidad limitada. Tal vez una adecuación de los protocolos con los que se ha trabajado podría ayudar a predecir con una mayor fiabilidad la germinación de un lote dado. La utilización de ambos test mediante una ecuación de regresión mejoró ligeramente la predicción ($r^2 = 0,60, p < 0,0001$), pero desde nuestro punto de vista, realizar ambos test para ofrecer una mejor estimación de la germinación exige demasiado esfuerzo para el caso de las semillas de *Pinus pinea*, que

germinan ocurre y en un período de tiempo razonablemente corto.

CONCLUSIONES

Con el protocolo del test de viabilidad al índigo-carmín desarrollado se obtiene una tinción más rápida y sencilla de evaluar de los embriones de *Pinus pinea*. Es necesario concretar más en las diferencias entre las distintas categorías en las que se clasifican los embriones al realizar el test al índigo-carmín buscando una mejora en la interpretación de los resultados. Actualmente no se puede predecir con fiabilidad la facultad germinativa mediante el test de viabilidad al índigo-carmín, ya que la correlación existente no es suficiente.

En el caso del test topográfico al tetrazolio se obtienen conclusiones similares que en el test al índigo-carmín: se ha conseguido concretar un protocolo adaptado a la determinación de la viabilidad para las semillas del pino piñonero pero hay que seguir mejorando la valoración de los resultados. No se puede predecir la facultad germinativa mediante las estimaciones obtenidas en el test al tetrazolio. La evaluación de los resultados de los test al índigo-carmín y al tetrazolio se complica cuando la facultad germinativa de los lotes es baja. La utilización de ambos test para predecir de forma conjunta la germinación de un lote de semillas de pino piñonero no se considera útil, aumenta el trabajo y no mejora de manera sustancial la estimación aportada. Sin embargo, dado que muchas especies forestales utilizadas en nuestro ámbito territorial requieren largos pretratamientos para germinar o estos son desconocidos, podría ser interesante aplicar estas técnicas, pese a sus limitaciones, para conocer la

viabilidad de los lotes. Los métodos bioquímicos ensayados en este trabajo podrían al menos ofrecer indicaciones de la calidad de los lotes.

Agradecimientos

A Bonner por la información suministrada.

BIBLIOGRAFÍA

- BITTENCOURT, S.R.M. & VIEIRA, R.D.; 1996. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. *Seed Sci. Tech.* 25: 75-82.
- CHAISURISRI, K.; EDWARDS, D.G.W. & EL-KASABY, Y.A.; 1993. Accelerated aging of Sitka spruce seeds. *Silvae Genetica* 42: 303-308.
- DA COSTA, N.J. & MARCOS-FILHO, J.; 1994. Alternative methodology for tetrazolium test for soybean seeds. *Seed Sci. Tech.* 22: 9-17.
- ISTA, 1999. *International Rules For Seed Testing*. International Seed Testing Association.
- PRATS ZAPIRAÍN, M.; 1944. *Orientaciones modernas en el ensayo de semillas forestales*. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid.
- SAVONEN, E.; 1997. An improvement to the topographic tetrazolium testing of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds. *Seed Sci. Tech.* 26: 49-57.
- SCHIMTD, W; 1937. *Die prüfung des kräftezustandes beim Saatgut*. Berlin.
- VERTUCCI, C.W. & C. LEOPOLD, 1984. Boun water in soybean seed and its relation to respiration and imbibition damage. *Plant Physiology* : 114-117.