

Prueba topográfica por tetrazolio (TZ) en semillas de soya

Humberto Moratinos^{1*}, Marlene Peñaloza¹, Zulay Flores², Manuel Avila³, Alex González-Vera³

¹Universidad Central de Venezuela, Apdo. 4579. Maracay 210. Aragua. Venezuela.

² INIA-CENIAP, Apdo. 2101. El limón Av. Universidad Zona Universitaria INIA-CENIAP Edificio 4 Tecnología de Semillas, Maracay. Venezuela.

³Fundación para la Investigación Agrícola Danac, San Felipe, Yaracuy. Venezuela.

RESUMEN

A partir de agosto del año 2012 entró en vigencia la adhesión de la República Bolivariana de Venezuela al MERCOSUR, organización que establece el compromiso de los estados partes de armonizar sus legislaciones y de este modo estar preparados con las nuevas expectativas de comercio en cultivos como la soya, en las que se tienen como metas sembrar más de 30 mil ha, siendo imprescindible conocer y manejar las metodologías que permitan evaluar la calidad fisiológica de las semillas en muy breve tiempo. La prueba topográfica de tetrazolio (TZ) especialmente en semillas de soya, es la metodología de pronta aplicación más recientemente aprobada por las reglas de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA por sus siglas en inglés). Con el manejo de esta técnica estaremos preparados para asumir los retos por venir, de los cuales el país debe formar parte. La prueba topográfica de tetrazolio en las semillas de soya, puede ayudar a discriminar las semillas en viables y no viables, e incluso ser empleada como prueba de vigor, lo que nos permitirá entregar al agricultor semillas bajo un mecanismo de control de calidad. Por ello, el objetivo de este trabajo fue dar a conocer la aplicabilidad así como las bondades de la metodología y sus alcances para su empleo en los laboratorios oficiales y no oficiales.

Palabras clave: *Glycine max*, tetrazolio, vigor, calidad fisiológica.

*Autor de correspondencia: Humberto Moratinos

E-mail: moratinosperez@gmail.com

Topographic tetrazolium test (TZ) in soybean seeds

ABSTRACT

As of August 2012, the accession of the Bolivarian Republic of Venezuela to MERCOSUR came into force. This organization establishes the commitment of the states parties to harmonize their legislation and thus be prepared with the new expectations of trade in crops such as soybeans, in which the goal is to plant more than 30 thousand hectares, being essential to know and to handle the methodologies that allow to evaluate the physiological quality of the seeds in a very short time. Tetrazolium Topographic Testing (TZ), especially in soybeans, is the most recently applied rapid application methodology established by the International Seed Testing Association (ISTA). With the management of this technique we will be prepared to assume the challenges to come, of which the country must be part. The topographical test of tetrazolium in soybean seeds can help to discriminate seeds in viable and non-viable seeds and even be used as a test of vigor, which will enable us to deliver seeds to the farmer under a quality control mechanism. Therefore, the objective of this work was to make known the applicability as well as the benefits of the methodology and its scope for its use in official and unofficial laboratories.

Key words: *Glycine max*, tetrazolium, vigor test, physiological quality.

INTRODUCCIÓN

En agosto de 2012, Venezuela ingresó en el Mercado Común del Sur (MERCOSUR) como miembro pleno. Esto le da la oportunidad a un gran mercado, pero a la vez se asumen también nuevos retos, aunados a los planes agrícolas del país, como incrementar el área de siembra del cultivo de la soya a 30 000 ha, estableciendo convenios con países como Brasil. Esto lleva a pensar que se debe producir la semilla de soya en el país con cultivares de origen foráneo, los cuales deben ser evaluados previamente a fin que garantizar su adaptabilidad a nuestras condiciones edafoclimáticas. Hasta ahora Brasil ha sido el proveedor de esos cultivares, pero a lo interno se han reactivado los programas de producción conducidos por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Fundación para la Investigación Agrícola Danac y las universidades. Esto ha hecho que surja la necesidad de implementar métodos rápidos de controles en la calidad fisiológica de esa semilla que llega o se produce en el país, para garantizar que ese insumo tan vital sea el mejor; y que los agricultores, pequeños y grandes, puedan confiar que se les entrega la mejor semilla para sus campos. Sin dejar de lado la prueba de germinación estándar, la prueba topográfica de tetrazolio se perfila como una metodología muy dinámica por ser rápida, segura y confiable, adicionalmente informa sobre el vigor de la semilla y las condiciones pre y pos cosecha a las cuales fue sometida dicha semilla, con lo cual se puede aportar en la cadena de producción de semilla de soya, contribuyendo con semilla de alta calidad para los agricultores.

En los países productores de semilla y grano de soya, se realiza la prueba de tetrazolio como una rutina. Esto lo hacen Brasil, Argentina, Uruguay y EEUU con mucho éxito. De esta manera a través de proyectos de programa Plan Zamora, coordinado por el INIA y con la participación de la Universidad Central de Venezuela (UCV), Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Fundación Danac y Semillas Híbridas de Venezuela, C.A. (SEHIVECA), se reactivó estudio de la aplicabilidad de la prueba topográfica de tetrazolio (TZ) en semillas de soya a fin de que se disponga de datos preliminares, capacitación y divulgación de la metodología de esta prueba, con la finalidad de conocer sus alcances y limitaciones en el país.

EL PASADO Y PRESENTE DE LA PRUEBA DE TETRAZOLIO (TZ)

En el año 1942 el Dr. Georg Lakon, en Hohenheim, Alemania, estableció la prueba topográfica de TZ para semillas y fue publicada a finales de la década de los años 40 (Lakon, 1949). Para el año 1950 se funda el Comité de Tetrazolio por la ISTA, por cuyos productos se rige el MERCOSUR como referencia a normas de análisis en semillas entre los miembros que lo conforman.

En 1966 se publica la prueba bioquímica de viabilidad en las reglas de la ISTA. En 1985 surge el manual preparado por el Dr. Moore sobre ésta prueba de tetrazolio para la ISTA (França Neto, 2015). Así se continúa consolidando lo relacionado a la prueba de TZ; en 1997 se da el Primer Internacional Workshop, en Edimburgo, Gran Bretaña.

En el 2003 aparecen las fichas de la ISTA sobre las pruebas de TZ (França Neto, 2015). Actualmente, se realizan talleres por ISTA sobre TZ de manera de actualizar avances, métodos y nuevas especies incorporadas a la lista. Aunque es paradójico que la ISTA no contemple la soya dentro de la lista de especies con los protocolos para la aplicación de la prueba, tal vez porque no es un cultivo relevante para Europa; sin embargo, sí lo es para América, especialmente para Latinoamérica, donde se encuentran países como Brasil y Argentina en los cuales el cultivo de la soya juega un rol de mucha importancia en la agricultura local. Estos países han aunado esfuerzos y mantenido una investigación constante a través del tiempo en el uso de la prueba de TZ, como un mecanismo de verificación de la viabilidad e incluso del vigor en las semillas de soya.

Con esta prueba se puede verificar la viabilidad y el vigor de los lotes de semillas y diagnosticar los problemas más comunes causantes de la reducción de calidad, tales como daños mecánicos, deterioro por humedad y daños por chinches; adicionalmente, daños por mal secado, estrés hídrico y por heladas (França Neto *et al.*, 1998).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA DE TZ

En esta prueba las semillas son embebidas con la solución de sal de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) que es usado como un indicador para revelar el proceso de reducción que sucede en las células vivas. En éste proceso los iones

H⁺ liberados durante la respiración de los tejidos vivos, son transferidos por un grupo de enzimas, específicamente la deshidrogenasas del ácido málico, donde es reducido el TZ a un compuesto rojo estable, no difusible llamado Trifenil Formazan; de ésta forma, los tejidos vivos son teñidos y se identifican de los tejidos no viables de muy baja respiración cuando son incubados en la solución de TZ. Esto fue lo que el científico alemán Lakon inició como pionero a mediados del siglo XIX (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland *et al.*, 1959).

OBJETIVOS, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE TZ

El objeto varía según el uso a que se destine el ensayo, es decir, sea o no oficial. El objeto en el caso de ensayos oficiales, ISTA está limitado a las especies aprobadas y enumeradas en las reglas oficiales o en posteriores revisiones de las mismas. Cuando se trata de uso no oficial, los objetivos son diversos y no existe restricción de especies, número de semillas utilizadas en el análisis, preparación, evaluación de métodos. La prueba tiene como objetivos determinar la viabilidad de las semillas, específicamente de aquellas latentes, recalcitrantes y las que germinan lentamente en pruebas de rutina, así como determinar la viabilidad de las semillas en muestras individuales, cuando al final de la prueba de germinación ocurre un alto porcentaje de semillas que no germinan. Adicionalmente, con ésta prueba se puede establecer o evaluar el vigor de las semillas y establecer en algunos casos las causas de daños observados.

Ventajas

Esta es una prueba rápida que permite obtener en 24 a 36 h resultados. Cumple con la reproducibilidad de la prueba. Se evalúan semillas individuales. Selección inicial de lotes por viabilidad y vigor.

Desventajas

Esta prueba es tediosa en su preparación, se requiere conocimiento de la morfología y estructuras de las semillas. Tiene cierto grado de subjetividad. Requiere experiencia del analista, en cuanto a capacitación y entrenamiento.

MATERIALES NECESARIOS

Para la realización de la prueba se requieren los siguientes materiales e insumos:

1. Sal de cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio
2. Agua destilada
3. Cajas de Petri
4. Frascos de vidrio
5. Hojillas

6. Bisturí
7. Agujas de disección recta
8. Estufas de 30 a 40°C
9. Lupa estereoscópica de al menos 6X a 7X de aumento con iluminación fluorescente
10. Pinzas
11. Beaker de 100 ml
12. Papel absorbente
13. Vasos plásticos

Normalmente el reactivo se adquiere en polvo en frasco de 10 gy dependiendo del tipo de semilla se emplearán soluciones que van en concentración desde 0,1 hasta 1,0%. Dicha solución debe resguardarse en frascos de vidrio color ámbar.

PREPARACIÓN DE LA PRUEBA DE TZ PARA SEMILLAS DE SOYA

Preparación de la solución

Se prepara la solución de acuerdo a la concentración con la cual se va a trabajar. Se recomienda preparar solo la solución necesaria a utilizar, por ejemplo, si se desea preparar 100 ml de solución al 1%, se debe medir 100 ml de agua y agregar 1 g de 2, 3, 5 cloruro de trifeníl tetrazolio y guardar en frasco de vidrio color ámbar. El agua utilizada en la preparación de la solución de trabajo puede ser destilada o de la red de abastecimiento con pH entre 6 y 7. La solución debe resguardarse en sitio fresco y oscuro.

La concentración de la solución de TZ indicada por AOSA e ISTA actualmente es de 1%. Sin embargo, el protocolo INTA de Argentina para semilla de soya, a partir de la investigación realizada por Gallo *et al.* (2015), establece una concentración de TZ de 0,1%; mientras que Brasil establece para soya concentraciones más bajas (0,075%). En la Figura 1 se presenta la comparación de dos concentraciones de TZ, conforme la prueba realizada en el laboratorio de semillas “Miriana Cerovich de Miranda”, de la Facultad de Agronomía (UCV), se encontró que concentraciones de TZ de 0,1 % producen tinciones de menor intensidad a las obtenidas con 1% pero se obtienen resultados similares, lo cual implica una reducción de los costos asociados al uso del TZ.

Pretratamiento y tratamiento de la semilla

La muestra de trabajo debe ser representativa del lote, para lo cual se toma de la fracción de la semilla pura 200 semillas al azar. Las mismas son divididas en dos repeticiones de 100 semillas cada una, posteriormente se colocan entre toallas húmedas de 16 – 18 horas a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ dentro de

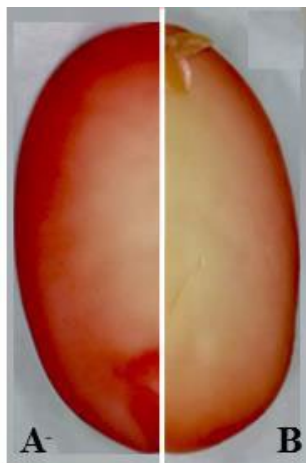


Figura 1. Muestra de la prueba de tetrazolio (TZ) en semilla de soya para una solución de TZ del 1% (A) y al 0,1% (B), realizadas en laboratorio de semillas de FAGRO- UCV. (Fotos: M. Peñaloza)

bolsas plásticas selladas para evitar la evaporación (Figura 2A); transcurrido el tiempo las semillas se sumergen en agua durante 30 a 60 minutos a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para completar la imbibición adicional, luego se colocan intactas, en oscuridad, en la solución de 2,3,5 cloruro trifeníl de tetrazolio al 0,1% durante 3h a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Evaluación de la prueba

Antes de la evaluación, se elimina la solución de tetrazolio, se enjuagan las semillas con agua y se dejan sumergidas durante la evaluación (Figura 2B), se remueve manualmente el tegumento de la semilla exponiendo el embrión (Figura 2C). Longitudinalmente al hipocótilo se aplica un corte limpio y liso con una hoja de afeitar o bisturí para separar simétricamente el hipocótilo y los cotiledones (Figura 2D). La evaluación se realiza por observación directa bajo lupa (Figura 2E) o mediante la captura de imágenes con cámara digital de alta resolución que pueden ser visualizadas en tiempo real por sistemas computarizados (Figura 2F).

La clasificación de las semillas en las distintas tinciones obtenidas de las pruebas de tetrazolio del presente proyecto, permitió discriminar en viables y no viables (vivas o muertas) y en vigor se pudo determinar en semillas viables de alto, mediano y bajo vigor. Esta clasificación para algunos investigadores, permitió determinar hasta ocho clases que incluso pueden señalar el daño o el efecto ambiental que pudo influir esa clase de vigor (Franca Neto *et al.*, 1998).

Una muestra de las diferentes clasificaciones de semilla observadas se resume en una galería de imágenes en la Figura 3 y pueden ser empleadas como referenciales durante la evaluación.

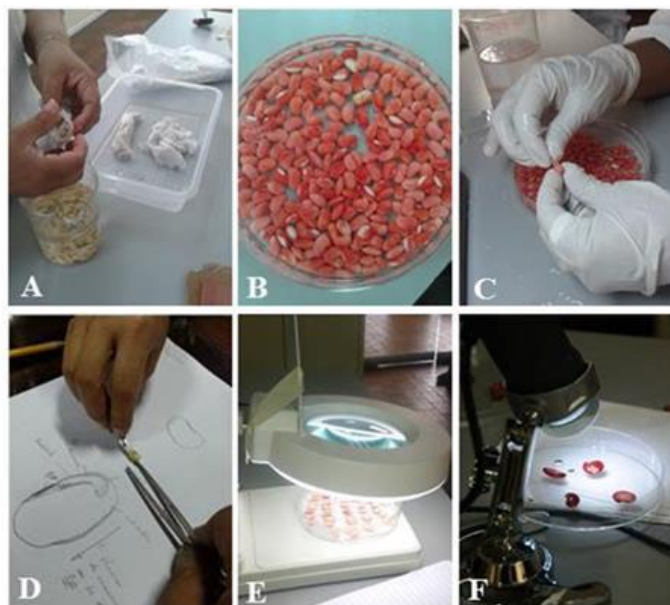


Figura 2. Diferentes pasos de la evaluación de tetrazolio en semilla de soya (Fotos: M. Ávila).

Cálculo y Expresión de Resultados

Debe ser realizado de acuerdo a lo indicado en el Capítulo 6 de las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas de la ISTA (ISTA, 2013). Se expresa como porcentaje promedio de las dos réplicas y aproximado al número entero más cercano. En la ficha de análisis respectiva de cada muestra se recomienda anotar la siguiente información:

- Tipo de pretratamiento usado
- Fecha y hora de inicio y término del pretratamiento
- Fecha y hora de inicio y término de tinción
- Número de semillas analizadas
- Temperaturas utilizadas
- Fecha de evaluación
- Iniciales del analista
- Cálculo de promedio y tolerancia
- Concentración de la solución de tetrazolio usada

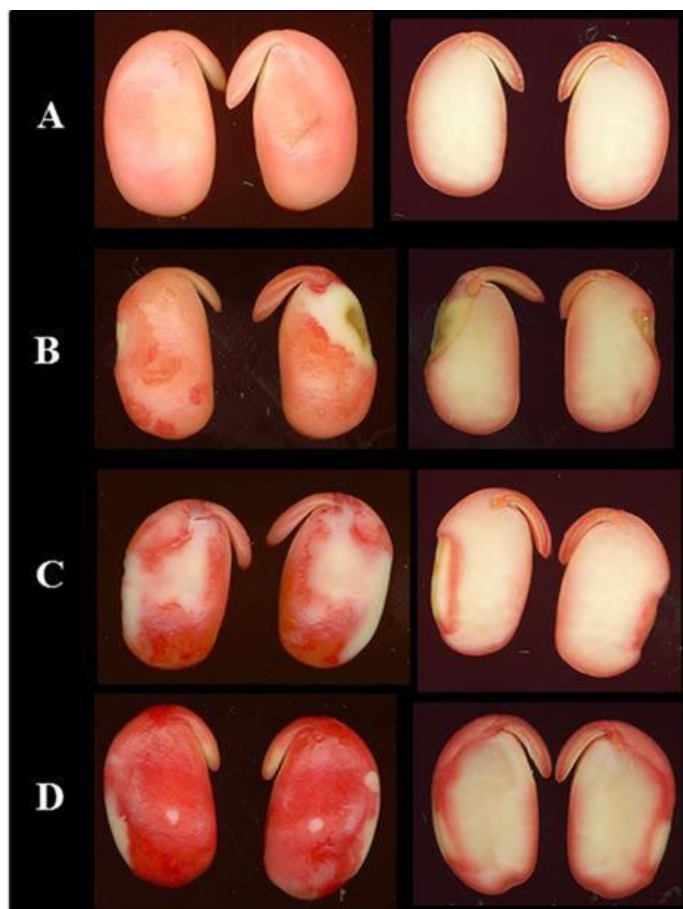


Figura 3. Diferentes descripciones de clases de semilla de acuerdo a la tinción con tetrazolio al 0,1%. A. Semillas viables y de alto vigor. B. Semillas no viables, con daño del eje embrionario y cotiledones. C. Semillas no viables con daños por efecto mecánico y temperatura. D. Semillas no viables con daño del eje embrionario, daño mecánico y envejecimiento (Fotos: M. Ávila).

REFERENCIAS

- AOSA. 1983. Seed Vigour Testing Handbook. Contribution N° 23 to the Handbook on Seed Testing, Association of Official Seed Analysts, NE, USA.
- Bulat, H. 1961. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. Proceedings of the International Seed Testing Association, Copenhagen, v. 26, pp. 686-696.

- Copeland, T. G.; C. P. Bruce; J. W. Midyette Jr. 1959. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts. East Lansing, MI. USA. v.49, pp.134-141.
- França Neto J.B., 2015. DIACOM: 35 Años de capacitación en las pruebas de tetrazolio y patología de semillas de soya. Seeds News. N. 5. Disponible en: http://www.seednews.com.br/_html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=242. [Consultado: 07/03/16].
- França Neto, J.B.; F. C. Krzyzanowski; N. P. Costa. 1998. O teste de tetrazolio em sementes de soja. EMBRAPA-CNPSo (EMBRAPA-C PSo, Documentos, I16). Londrina, Brasil. 72 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, Argentina. 8 p.
- ISTA 2013. International Seed Testing Association. International Seed Testing Rules. Zurich, Switzerland.
- Krzyzanowski, F. C.; R. D. Vieira; J. F. Neto. 1999. Vigor de sementes: Conceitos e testes Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes ABRATES. Londrina, Brasil. 218 p.
- Lakon, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiol.* 24(3): 389–394.