

## **Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis***

M<sup>a</sup> Teresa. Moreno Álvarez, Luis F. Benito Matías, Nieves Herrero Sierra, Susana Domínguez Lerena, Juan. L. Peñuelas Rubira.

Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”, Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080 Guadalajara. España. [serranillo@dgcn.mma.es](mailto:serranillo@dgcn.mma.es)

### **Resumen**

Se compara la utilidad de dos nuevas técnicas de determinación de la viabilidad de semillas (test de electroconductividad y test del índigo carmín) tomando como referencia el test del tetrazolio, técnica bioquímica aceptada por ISTA. Como control de todos ellos se realizó el ensayo de germinación. Se utilizan semillas de *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis* de dos procedencias. Con el índigo-carmín los resultados de estimación del potencial germinativo son por especie los coeficientes de correlación son: *Pinus pinaster* ( $r^2=0,92$ ) y *Pinus halepensis* ( $r^2=0,94$ ). Los resultados en el test del tetrazolio son por especie: *Pinus pinaster* ( $r^2=0,84$ ) y *Pinus halepensis* ( $r^2=0,92$ ). Para la electroconductividad, *Pinus pinaster* presenta unos resultados de  $r^2 = 0,8712$ , y para *Pinus halepensis*, los mejores son de  $r^2= 0,9037$ .

P.C.: electroconductividad, tetrazolio, índigo-carmín, *Pinus pinaster*, *Pinus halepensis*.

### **Summary**

New methods are compared in order to find out the most suitable one to estimate the viability of seeds. In this test we used: tetrazolium test (TT), indigo carmine (acid blue) test and electroconductivity test. All of them we choosed pine seed: *Pinus pinaster* and *Pinus halepensis* of two provenances. Germination test have been done as a control conditions under prescribed by ISTA. Best correlations for indigo carmine test are: *Pinus pinaster* ( $r^2=0,92$ ) y *Pinus halepensis* ( $r^2=0,94$ ). Best correlations for tetrazolium test are: *Pinus pinaster* ( $r^2=0,84$ ) y *Pinus halepensis* ( $r^2=0,92$ ). And for electroconductivity test, best correlations are: *Pinus pinaster* ( $r^2 = 0,8712$ ), *Pinus halepensis* ( $r^2= 0,9037$ ).

K.W.: electronconductivity test, tetrazolium test, indigo carmine, *Pinus pinaster*, *Pinus halepensis*.

### **Introducción**

La producción de planta forestal tiene como base el conocimiento de los procesos de germinación de las especies objeto de interés. Estos procesos germinativos se pueden ver afectados por el estado general de las semillas. Wang (1988), en una revisión sobre nuevos campos de investigación en semillas de árboles y arbustos, reflejaba la importancia de la calidad de la semilla forestal para obtener buenas actuaciones en este campo. Indicaba este autor que la calidad estaba relacionada con 4 factores: la madurez de la semilla en la recogida,

el manejo del cono o fruto, el proceso de extracción de la semilla, y el almacenamiento de la semilla. Los test de germinación presentan dificultades a la hora de aplicarlos en semillas de especies que presentan fuerte letargo, como son las de ámbito forestal. La alternativa a estos test de germinación la ofrecen el test del tetrazolio o el test de embriones escindidos, desarrollados bastante bien por la International Seed Testing Association. A pesar de existir estas técnicas que están bien reguladas en las normas sobre el Tetrazolio publicadas por la ISTA, muchas especies de árboles y arbustos no se encuentran bien reflejadas en estas normas, o incluso ni aparecen, como ocurre con muchas de nuestra flora (Savonen, 1999; Steiner *et al.*, 1999). En muchos casos se sustituyen las técnicas de evaluación más complejas por ensayos de embriones extraídos, que mediante la visualización de los tejidos del embrión permiten valorar su estado.

Ante este campo ligeramente yermo, comienzan a aparecer técnicas que solucionen el problema de la evaluación de la viabilidad en semillas forestales. Se desarrollan técnicas más o menos complejas, como la evaluación mediante el pH, las técnicas basadas en rayos X, que incluso se complementan con la evaluación mediante el test del tetrazolio, o técnicas basadas en la liberación de compuestos por parte de las semillas. En esta línea encontramos liberación de aminoácidos, proteínas, potasio (Custodio y Marcos-Filho, 1997) y otras técnicas que se englobarían bajo un grupo de metodologías que podemos definir como test de electroconductividad (Siddique y Goodwin, 1985; Da Costa y Marcos-Filho, 1997; Heslehurst, 1998; Kim *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1994).

## **Material y métodos.**

Partimos de semillas de *Pinus pinaster* (procedencia Sierra de Cuenca y Sierra de Oña, cosecha 1998-1999) y de *Pinus halepensis* (procedencia Levante interior y Maestrazgo-Los Serranos, cosecha 1998-1999) (Alia *et al.*, 1996). Se extrajeron las semillas por medio de 5 métodos distintos, de manera que se testaba la inocuidad de los mismos con el ensayo propuesto, de forma que obtuvieramos una muestra amplia de germinaciones. Se testaron el test de tetrazolio, el test de índigo-carmín (ambos colorimétricos) y el test de electroconductividad.

Como testigo se realizó el ensayo de germinación adecuado para cada especie, propuesto por las normas ISTA (ISTA, 1999). Se seleccionaron al azar 400 semillas y se dividieron en 4 repeticiones de 100 semillas cada una. Se utilizó como sustrato arena calibrada, humedeciéndose con agua destilada y cryptonol, como fungicida. Se colocaron a temperatura constante a 20° C para conseguir la germinación.

Para el test del tetrazolio se diseñó el siguiente protocolo: se utilizaron 4 repeticiones de 100 semillas tomadas al azar. Se preparó la muestra de tetrazolio (cloruro o bromuro de 2,3,5 trifenil tetrazolio) diluyendo sal de tetrazolio al 1% en una solución tampón (2 partes de difosfato de potasio y 3 partes de monofosfato sódico). Las semillas se prepararon de la siguiente manera: se elimina el pericarpio y se quita la testa. La semilla descubierta se sumerge en agua destilada durante 24 horas. Posteriormente, se sumergen en tetrazolio durante 40-48 horas en caso del *Pinus pinaster* y 20-22 horas para el *Pinus halepensis* a unos 20-25°C para favorecer la reacción. Los individuos se clasifican en vivos (embrión y endospermo teñidos uniformemente de rojo), vitalidad limitada (manchas blancas y rojas distribuidas por diferentes tejidos que hacen muy difícil su valoración) y muertos (embriones blancos o con radícula blanca).

El test del índigo carmín no está aceptado por la ISTA, es un sistema bastante utilizado desde 1925 (Prats, 1944) que en el Centro “El Serranillo” se utiliza en ocasiones. Frente al tetrazolio, tiñe las partes muertas de la semilla. También se tomaron cuatro repeticiones de 100 semillas, y el índigo carmín se preparó añadiendo 0,15 g de índigo carmín en 100 cc de agua. El ensayo se realiza sobre embriones escindidos necesitando eliminar el pericarpio, la testa y el endospermo. Una vez quitado el pericarpio se sumergen las semillas 18 horas en agua destilada para reblandecer el endospermo. Posteriormente se extraen los embriones y se sumergen en la preparación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavan y se clasifican en vivos (blancos o con pocas manchas azules nunca localizadas en la radícula), de vitalidad limitada (embriones con dudas), y muertos (zona de la radícula totalmente teñida y/o embrión teñido).

El test de electroconductividad está basado en la pérdida de funcionalidad de la membrana celular, debido a diferentes factores: deficiencias hídricas, bajas o altas temperaturas, que producen un mayor flujo de pasivo de iones a través de la membrana celular debido a la pérdida de su integridad. El grado de pérdida dependerá tanto de la especie como del momento fenológico del organismo. Para el test de electroconductividad nos enfrentamos ante la dificultad de diseñar unos protocolos. Utilizamos muestras de 0,5 gr y 1 gr por procedencia y especie. Las muestras de semillas sin pericarpio son lavadas con agua destilada durante 15 minutos para eliminar cualquier tipo de suciedad. Cada muestra se sumerge durante 24 horas en 30 ml de agua destilada en un tubo de ensayo. Permanecen tapadas a una temperatura de unos 20° C y pasadas 24 horas se realizan medidas con un conductivímetro. Los resultados se expresan como electroconductividad en microsiemens/cm a las 24 horas/ gramos de semilla.

Posteriormente los datos se trataron estadísticamente mediante un análisis de ANOVA.

## **Resultados y discusión**

Para analizar los resultados hemos considerado más sensato analizar por una parte los test cuya base es una tinción, y por otra el test de conductividad.

Respecto al análisis de regresión lineal de los test colorimétricos (TABLAS 1, 2, y 3) podemos decir que en ambos casos se comportan como buenos predictores. El test del índigo-carmín se presenta en este caso como una buena alternativa al test del tetrazolio, pues aunque ambos presentan unos magníficos valores de  $r^2$  los de índigo carmín son mejores que para el tetrazolio. La gran diferencia entre ambos análisis se refiere a las partes de la semilla que tiñen cada uno. En el caso del tetrazolio, las partes teñidas son las vivas. Para el índigo carmín, las partes teñidas son las muertas. La mejor respuesta que obtenemos del índigo carmín puede deberse a la facilidad para considerar los daños. Teniendo estos test una fuerte carga de subjetividad en la interpretación de los resultados, basada principalmente en la experiencia del analizador, podemos suponer que es más difícil interpretar zonas de las semillas pobremente teñidas por el tetrazolio. Siempre puede deberse la falta de tonalidad a errores en la manipulación, siendo complicado interpretar la importancia de zonas que pueden ser básicas para el desarrollo del embrión y posterior germinación de la semillas. Esta duda es menos frecuente en el caso del índigo. La tinción de las zonas muertas define claramente cómo se encuentra la semilla, y a pesar de que también pueden aparecer indefiniciones en el proceso de tinción, éstos ofrecen menos dudas en la interpretación ya que se considera que las zonas teñidas están claramente muertas.

Tabla 1.- Resultados de germinación, test de índigo-carmín y test de tetrazolio por especie y procedencia (en porcentaje de semillas vivas).

	% Vivas	Extracción manual	Extracción sequero solar	Desalado en hormigonera	Desalado en desaladora externa	Procesado completo en Serranillo
<i>Pinus pinaster</i> Serranía de Cuenca	<b>Germinación</b>	82	81	67	10	79
	<b>Índigo-carmín</b>	75	77	64	14	76
	<b>Tetrazolio</b>	72	73	56	39	70
<i>Pinus pinaster</i> Sierra de Oña	<b>Germinación</b>	65	61	45	56	72
	<b>Índigo-carmín</b>	62	62	31	62	70
	<b>Tetrazolio</b>	69	64	51	60	63
<i>Pinus halepensis</i> Maestrazgo Los Serranos	<b>Germinación</b>	93	78	69	27	62
	<b>Índigo-carmín</b>	87	79	75	41	75
	<b>Tetrazolio</b>	76	72	66	41	75
<i>Pinus halepensis</i> Levante interior	<b>Germinación</b>	92	85	77	29	74
	<b>Índigo-carmín</b>	95	88	79	35	77
	<b>Tetrazolio</b>	81	69	66	34	64

Tabla 2.- Resultados de la regresión lineal en los test colorimétricos para *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. Análisis del porcentaje de embriones vivos por procedencias.

Índices	<i>Pinus pinaster</i>				<i>Pinus halepensis</i>			
	Serranía de Cuenca		Sierra de Oña		Maestrazgo-Serranos		Levante interior	
	Índigo	Tetrazolio	Índigo	Tetrazolio	Índigo	Tetrazolio	Índigo	Tetrazolio
$r^2$ ajust.	0,9969	0,8784	0,7668	0,5703	0,9377	0,9733	0,9947	0,8825
F	p< 0,0001	0,012	0,0329	0,0868	0,0043	0,0012	0,0001	0,0114

Tabla 3.- Resultados de la regresión lineal en los test colorimétricos para *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. Análisis del porcentaje de embriones vivos por especies.

Índices	<i>Pinus pinaster</i>		<i>Pinus halepensis</i>	
	Índigo	Tetrazolio	Índigo	Tetrazolio
$r^2$ ajust.	0,9251	0,8498	0,9542	0,9346
F	p< 0,0001	0,00009	p< 0,0001	p< 0,0001

Para el test de electroconductividad, los resultados indican que la metodología que hemos utilizado es buena, aunque mejorable. En el caso de *Pinus pinaster*, consideraremos que la muestra a utilizar debe ser de 1 g. Esto supone una media de 36 semillas a analizar, lo que podemos interpretar, a la vista de los resultados, como una cantidad suficiente de semilla mientras que muestras de 0,5 g sólo presentan 18 semillas. Para *Pinus halepensis*, la muestra de 1 g también ofrece mejores resultados que la muestras de 0,5 g. En este caso, la semilla analizada tuvo de media 120 semillas en muestras de 1 g.

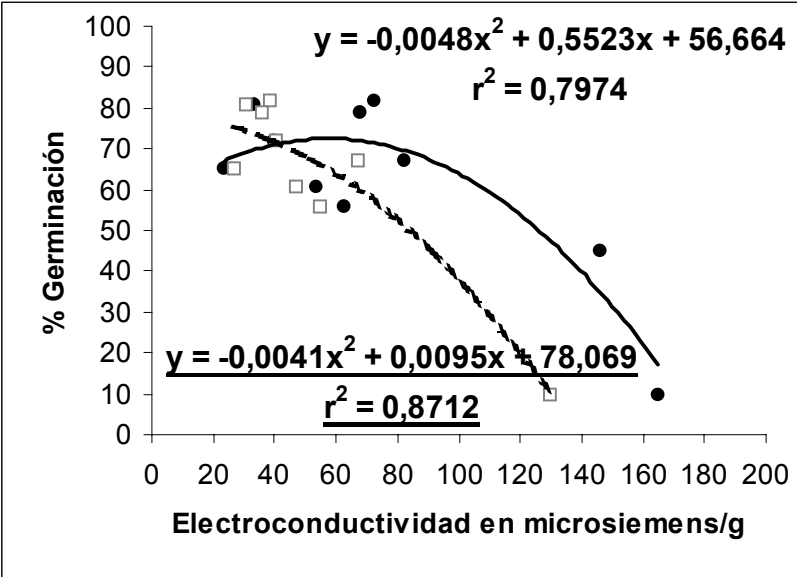


Gráfico 1.- Curva de regresión obtenida para *Pinus pinaster*. Puntos negros y línea continua representa la muestras de 0,5 g; Cuadrados blancos y línea discontinua representa las muestras de 1 g. Ecuación de regresión para muestra de 1 g en subrayado.

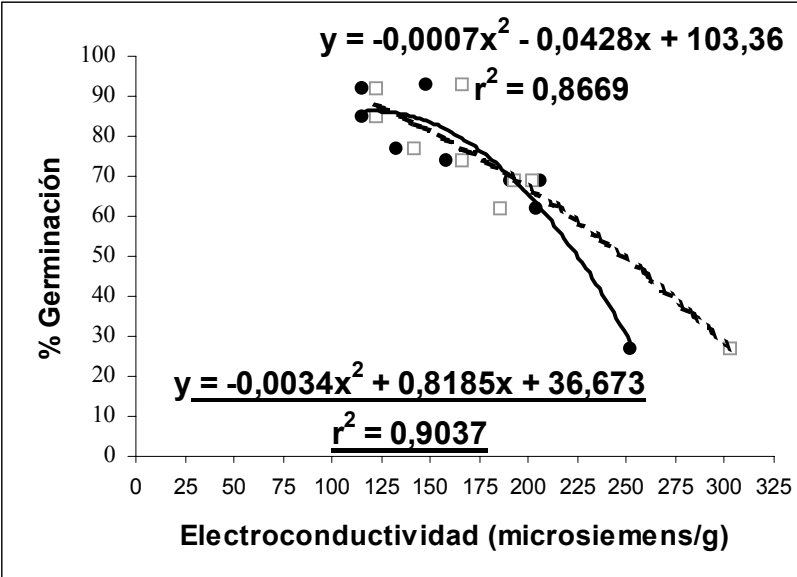


Gráfico 2.- Curva de regresión obtenida para *Pinus halepensis*. Puntos negros y línea continua representa la muestras de 1 g; Cuadrados blancos y línea discontinua representa las muestras de 0,5 g. Ecuación de regresión para muestra de 1 g subrayada.

## Conclusiones

Los test de indigo-carmin y del tetrazolio pueden ser utilizados como predictores de la facultad germinativa. El test de indigo-carmin presenta valores de fiabilidad tan buenos como el test de tetrazolio, pudiendo utilizarse como alternativa al mismo. El test de electroconductividad presenta dificultades de aplicación, ya que el diseño de protocolos es complicado. Sin duda alguna, la gran ventaja que muestra frente a los anteriores es la objetividad, que en definitiva, es la gran ayuda a la hora de valorar los resultados que obtenemos. Sin embargo, es necesario precisar los detalles de los protocolos para cada especie. Presenta buenos índices de  $r^2$ , lo que nos hace considerarlo como una buena alternativa de futuro a los ensayos colorimétricos.

## Bibliografía

- ALÍA, R.; MARTÍN, S., DE MIGUEL, J.; GALERA, R.M.; CATALÁN, G. y GIL, L. (1996). *Regiones de procedencia. Pinus pinaster Aiton*. Ed. DGCONA; INIA – CIFOR; ETSIM, Madrid.
- CUSTODIO, C.C. y MARCOS-FILHO, J. (1997). *Potassium leachate test for the evaluation of soybean seed physiological quality*. *Seed Science and Technology*, 25: 549–564.
- DA COSTA, N.P. y MARCOS-FILHO, J. (1994). *Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seeds*. *Seed Science and Technology*, 22: 9–17.
- HESLEHURST, M.R. (1988). *Quantifying initial quality and vigour of wheat seeds using regression analysis of conductivity and germination data from aged seeds*. *Seed Science and Technology*, 16: 75–85.
- KIM, S.H.; CHOE, Z.R.; KANG, J.H.; COPELAND, L.O. y ELIAS, S.G. (1994). *Multiple seed vigour indices to predict field emergence and performance of barley*. *Seed Science and Technology*, 22: 59–68.
- ISTA. (1999). *Rules. Proceedings of The International Seed Testing Association*. *Seed Science and Technology*, 27. Supplement.
- PRATS ZAPIRAIN, M. (1944). *Orientaciones modernas en el ensayo de semillas forestales*. Ed: Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid, pp. 1-135.
- SAVONEN, E. (1999). *An improvement to the topographic tetrazolium testing of Scots pine (Pinus sylvestris L.) seeds*. *Seed Science and Technology*, 26: 49–57.
- SIDDIQUE, M.A. y GOODWIN, P.B. (1985). *Conductivity measurements on single seeds to predict the germinability of French beans*. *Seed Science and Technology*, 13: 643–652.
- STEINER, A. M.; KRUSE, M. y FUCHS, H. (1999). *A re-assessment of the comparison of tetrazolium viability testing and germination testing*. *Seed Science and Technology*, 27: 59–65.

- VIEIRA, R.D.; PAIVA-AGÜERO, J.A.; PERECIN, D. y BITTENCOURT, S.R.M. (1999). *Correlation of electrical conductivity and other vigor tests with field emergence of soybean seedlings*. Seed Science and Technology, 27: 67-75.
- VILLAR SALVADOR, P. (1998). *Comunicación interna: Liberación de electrolitos por disfunción de membranas celulares: un indicador de estrés en plantas*. C.N.M.F. "El Serranillo" (Guadalajara). Ministerio de Medio Ambiente., pp: 1-3.
- WANG, B.S.P.. (1988). *Review of new developments in tree seed*. Seed Science and Technology, 16: 215-225.
- WANG, Y.R.; HAMPTON, J.G. & HILL, M.J. (1994). *Red clover vigour testing – Effects of three test variables*. Seed Science and Technology, 22: 99-105.