

[ SEMILLAS HORTÍCOLAS ]

# Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas

**Isabel Rodríguez**

**Guillem Adam**

**Jose María Durán**

Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid

La elección de la semilla constituye una de las primeras decisiones que ha de adoptar el agricultor cada año, a la hora de decidir qué variedad debe sembrar y la calidad de semilla a utilizar. En los últimos cincuenta años se han producido importantes avances en el mundo de las semillas que han contribuido a la evolución hacia una agricultura cada vez más tecnificada, con una reducción sustancial de la mano de obra, unida a un empleo cada vez más importante de maquinaria, abonos, fitosanitarios y nuevas variedades.

Las semillas de los cultivos hortícolas en particular suelen tener un coste elevado, por lo que el agricultor se debe asegurar de que la germinación, nascencia y evolución de la plántula sean correctas.

Los ensayos de germinación permiten evaluar el poder germinativo de las semillas y estimar su valor potencial para la siembra en campo.

El ensayo topográfico al tetrazolio, que también explicamos en este artículo, es un test bioquímico, rápido de realizar, que permite estimar la viabilidad de las semillas con independencia de otros factores externos. Este test facilita datos muy interesantes, sobre todo cuando se combina con un ensayo de germinación.

## [ Concepto de germinación

Desde el punto de vista agronómico, se considera que una semilla ha germinado cuando a partir de ella se origina una planta adulta capaz de alcanzar la fase reproductora; es decir, capaz de producir nuevas semillas (Durán y Pérez, 1984). La *International Seed Testing*

*Association* (ISTA), asociación internacional de entidades relacionadas con el análisis de semillas cuya actividad principal consiste en desarrollar métodos y servicios para dicho fin, considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación (ISTA, 2003). La primera expresión de este proceso es la emergencia de la radícula.

## [ Ensayos de germinación

En los últimos cincuenta años se han producido importantes avances en el mundo de las semillas que han contribuido a la evolución hacia una agricultura cada vez más tecnificada, con una reducción sustancial de la mano de obra, unida a un empleo cada vez más importante de maquinaria, abonos, fitosanitarios y nuevas variedades. Las semillas de los cultivos hortícolas en particular suelen tener un coste elevado, por lo que el agricultor se debe asegurar de que la germinación, nascencia y evolución de la plántula sean correctas.

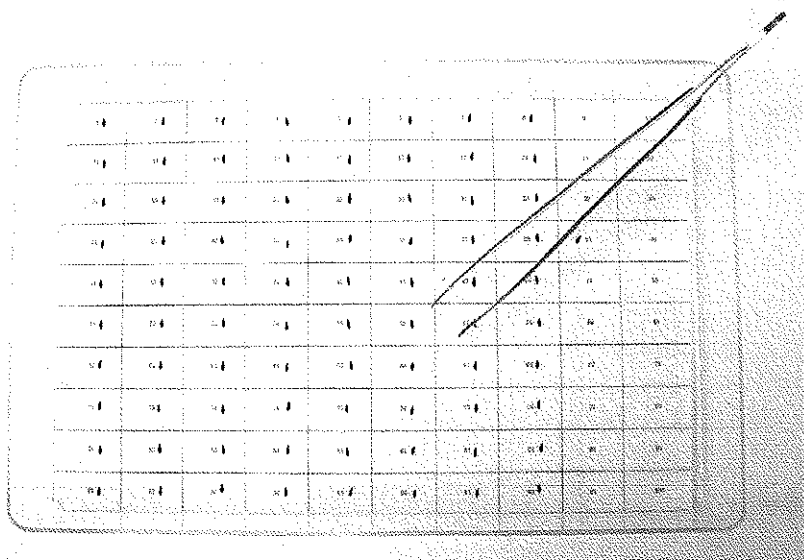


Foto 1. Caja de plástico transparente para ensayos de germinación en laboratorio con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en su interior. Las semillas se colocan, utilizando unas pinzas, sobre papel de filtro con una cuadrícula numerada, que permite identificar cada semilla.

Desde el punto de vista agronómico, se considera que una semilla ha germinado cuando a partir de ella se origina una planta adulta capaz de alcanzar la fase reproductora; es decir, capaz de producir nuevas semillas (Durán y Pérez, 1984). La *International Seed Testing Association* (ISTA), asociación internacional de entidades relacionadas con el análisis de semillas cuya actividad principal consiste en desarrollar métodos y servicios para dicho fin, considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación (ISTA, 2003). La primera expresión de este proceso es la emergencia de la radícula.

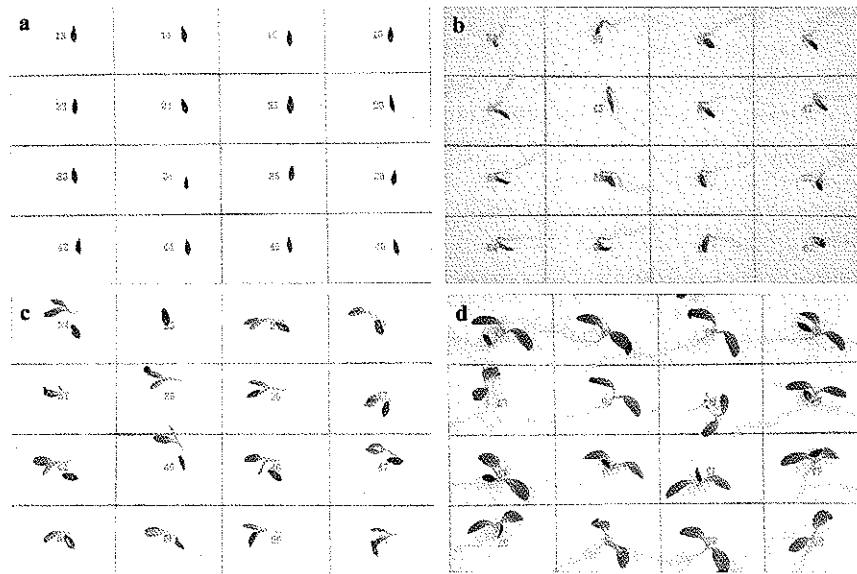
**Los test o ensayos de germinación permiten determinar el potencial de germinación máximo de un lote de semillas (ISTA, 2005) y estimar su valor potencial para la siembra en campo. Estos test de germinación realizados en laboratorio ofrecen una primera información respecto a la calidad de las semillas. Sin embargo, hay que señalar que, en muchos casos, los resultados que se obtienen en condiciones controladas de laboratorio difieren de los obtenidos en el campo.**

### Preparación del ensayo

El test de germinación estándar recoge el porcentaje de plántulas normales obtenido tras un análisis germinación. Es una prueba que informa sobre las semillas que más rápidamente han reanudado la actividad metabólica y el crecimiento propios de la germinación (Peretti, 1994).

Consiste básicamente en colocar las semillas sobre un sustrato adecuado, humedecerlas, y controlar las condiciones de incubación durante un cierto período de tiempo, durante el cual se realizan conteos de germinación, observando el número de semillas que han germinado. Se pueden evaluar también las plántulas obtenidas, identificando el número de plántulas normales y anormales.

Los ensayos de germinación pueden realizarse utilizando innumerables métodos y condiciones. Uno de los procedimientos más habituales a la hora de realizar un ensayo de germinación es colocar las semillas en el in-



**Foto 2. Semillas y plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) durante un ensayo de germinación: a, semillas colocadas sobre papel de filtro el día de la siembra; b, plántulas tres días después de la siembra; c, cinco días después de la siembra y d, siete días después de la siembra.**

terior de una caja de vidrio o plástico transparente, sobre un soporte que permita una rápida y abundante retención de agua, como por ejemplo papel de filtro, arena o medios gelificados a base de agar, (ver **Foto 1**).

Se suele considerar que una semilla ha germinado cuando la radícula alcanza una longitud mayor de 3 mm (ISTA, 2005). Para controlar las condiciones de humedad, temperatura e iluminación durante la incubación, las cajas de germinación se introducen en germinadores termostatzados, que permiten regular estos parámetros según las exigencias específicas de cada especie.

Las temperaturas más corrientemente utilizadas oscilan entre 10 y 35 °C. Cuando se utilizan temperaturas alternas dentro del ciclo diario, se recomienda que la oscilación térmica no sea inferior a 10 °C, coincidiendo la temperatura más elevada con el período de luz en el caso de utilizar cámaras con iluminación. La ISTA establece una serie de recomendaciones para cada especie sobre el sustrato a utilizar, la temperatura de germinación, los días de conteo y, en algunos casos, otras recomendaciones de tratamientos específicos para favorecer la germinación, (ver **Foto 2**).

### Curvas e índices de germinación

Frente a la sencillez que supone colocar a germinar un lote de semillas, la expresión de los resultados que se obtienen es mucho más complicada. Tras

un ensayo de germinación, el analista puede encontrar semillas que germinan perfectamente, dando lugar a plántulas normales, otras que al desarrollarse presentan alguna anomalía y aquellas que al finalizar el ensayo no han sido capaces de germinar.

La representación del número total o más frecuentemente del porcentaje de semillas germinadas, frente al tiempo transcurrido desde la siembra, constituye una curva de germinación. Estas proporcionan toda la información que es posible solicitar una vez realizado un ensayo de germinación, (ver **Figura 1**).

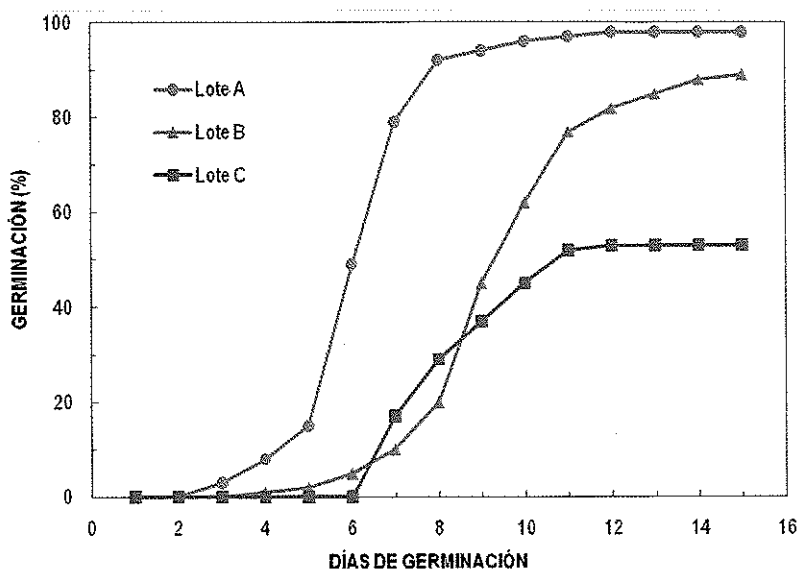
Sin embargo, para expresar los resultados obtenidos lo más frecuentemente es recurrir al cálculo de índices de germinación, que nos permiten estimar la calidad del lote y comparar cuantitativamente diferentes lotes de semillas o muestras sometidas a diferentes tratamientos.

A continuación se describen algunos de los índices más comúnmente empleados para la expresión de los resultados de los ensayos de germinación:

- **Poder germinativo:** es el porcentaje de semillas que germina en las condiciones más favorables (Côme, 1970). Se dice que una semilla ha perdido su poder germinativo cuando es incapaz de germinar, cualquiera que sean las condiciones de germinación y los tratamientos realizados. Por lo tanto, se trata del porcentaje de semillas vivas. Este concepto es sumamente importante en la prácti-

Figura 1:

Curvas de germinación de tres lotes de semillas (A, B y C). El lote de mejor calidad es el lote A, ya que presenta el menor periodo de latencia y una capacidad de germinación próxima al 100%.



ca, especialmente cuando se trata de determinar el valor comercial de un lote de semillas. No obstante, el poder germinativo resulta muchas veces muy difícil de determinar con absoluta precisión, ya que las mejores condiciones de germinación, además de poder variar de un lote a otro, jamás pueden ser conocidas a priori. Precisamente por este motivo se prefiere muchas veces hablar de capacidad de germinación.

• **Capacidad de germinación:** es el porcentaje de germinación máximo que se obtiene en unas condiciones previamente definidas (Durán y Pérez, 1984).

• **Velocidad de germinación:** Côme (1970) define la velocidad de germinación como el tiempo que necesitan las semillas para germinar. De acuerdo con diversos autores, la velocidad de germinación puede expresarse con diferentes índices:

- Porcentaje de germinación: Porcentaje de semillas germinadas hasta un momento determinado.

- Período de latencia: Tiempo necesario para que se produzca la germinación de la primera semilla desde la siembra.

- Tiempo de germinación: Tiempo necesario para conseguir un porcentaje de germinación determinado. Por ejemplo, el tiempo necesario para alcanzar el 50 % ( $T_{50}$ ) ó 25 % ( $T_{25}$ ) de la capacidad germinativa.

- Tiempo medio de germinación

• **Coefficiente de velocidad de germinación ( $V_g$ ):** Queda definido por la integración de los tiempos de germinación de cada semilla y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$T_g = \frac{\sum(N_i \cdot D_i)}{\sum N_i}$$

$N_i$  = Número de semillas germinadas el día  $D_i$ .

$D_i$  = Tiempo transcurrido desde la siembra, en días.

La velocidad de germinación corresponde al inverso del tiempo medio de germinación multiplicado por 100.

Tabla 2:

Métodos de germinación recomendados por la ISTA (2005) para las especies hortícolas de mayor importancia económica en España. Sustrato: A, arena; EP, entre papel; PP, papel plisado y SP, sobre papel

NOMBRE		FAMILIA BOTÁNICA	RECOMENDACIONES ISTA			
COMUN	CIENTÍFICO		°C	SUSTRATO	CONTEOS (DÍAS)	TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS
Cebolla	<i>Allium cepa</i> L.	Asteraceae	20; 15	SP, EP y A	6 y 12	Preenfriamiento
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	20	SP, EP	4 y 7	Preenfriamiento
Melón	<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	20-30; 15	PP, EP y A	4 y 8	-
Pimiento	<i>Capsicum annuum</i> L.	Solanaceae	20-30	PP, EP y A	7 y 14	KNO <sub>3</sub>
Tomate	<i>Lycopersicon lycopersicum</i> L.	Solanaceae	20-30	SP, EP y A	5 y 14	KNO <sub>3</sub>

• El **Índice de Timpson ( $I_T$ )** queda definido mediante la fórmula (DURÁN y PÉREZ, 1984):

$$I_T = \sum N_i(T - J_i)$$

considerando:

$$J = D - 1$$

donde  $N_i$  y  $D_i$  tienen el mismo significado que para  $V_g$ .

$T$  = Último día de conteo de germinación (según especies, ver **Tabla 1**).

• El **coeficiente de uniformidad ( $C_u$ )** queda definido por la ecuación (DURÁN y PÉREZ, 1984):

$$C_u = \frac{\sum N_i \cdot (\bar{D} - D_i)^2}{\sum N_i}$$

donde:

$N_i$  = Número de semillas germinadas el día  $D_i$ .

$D_i$  = Número de días transcurridos desde la siembra.

$\bar{D}$  = Número de días después de la siembra elegido para calcular la uniformidad de germinación.

La velocidad de germinación y el  $T_{50}$  son los índices más utilizados. La interpretación de un ensayo de germinación es la principal tarea del analista de semillas. Un ensayo de germinación no es solo concluir un porcentaje de germinación al final del ensayo. Hoy en día, las formulas e índices descritos permiten describir de forma muy precisa la dinámica de germinación, permitiendo conocer de una muestra de semillas.

## El test del Tetrazolío, análisis de viabilidad y vigor

El hecho de que una semilla no germine no siempre quiere decir que se trate de una semilla muerta. A menudo, en semillas hortícolas, se recurre a ensayos de germinación para determinar la viabilidad de un lote de semillas, pero, en realidad, los resultados de estos ensayos pueden conducirnos a conclusiones equívocas cuando lo que queremos averiguar es si la semilla es viable o no. Esto se debe a que existen semillas viables que pueden estar afectadas por algún tipo de dormición que impida su germinación

### ¿Qué es?

En 1949, Lakon sugirió por primera vez un ensayo directo para determinar la viabilidad de las semillas de maíz. Se trataba del ensayo topográfico al tetrazolío, comúnmente llamado ensayo del TZ o TZ test. Un año más tarde, el mismo autor extendía esta técnica a la determinación del vigor en semillas de cereales como el trigo, el arroz, la cebada o la avena.

El ensayo topográfico al tetrazolío es un análisis bioquímico basado en las reacciones de oxidación-reducción que se producen en las células vivas del embrión u otros tejidos de la semilla al entrar en contacto con la sal de tetrazolío. Las células vivas poseen unas enzimas, denominadas hidrogenasas, que están implicadas en la respiración celular, y son capaces de reaccionar con la solución de tetrazolío, formando un compuesto insoluble de color rojo (formazán) que permite identificarlas, diferenciándolas de las células muertas que pueden encontrarse en la semilla (ISTA, 2004).

Se trata de un método rápido que, en menos de 48 h, permite obtener resultados sobre la viabilidad de las semillas, pudiéndose obtener un avance de tales resultados en menos tiempo (24 h) si las semillas se incuban a mayor temperatura (ISTA, 1993).

### Vigor y viabilidad

Semillas viables son aquellas que tienen la capacidad de transformarse en plántulas aceptables, inclu-

so bajo condiciones no favorables. El vigor se puede definir como el potencial o capacidad de la semilla durante la germinación y emergencia de la plántula. Las semillas de alto vigor se conservan más tiempo, germinan más rápido y resisten condiciones adversas de germinación.

El ensayo del TZ es útil para determinar, tras haber realizado una prueba de germinación, la causa que explica por qué una muestra presenta un alto porcentaje de semillas que no son capaces de germinar. Permite conocer si las semillas presentan dormición, si están inhibidas o si están deterioradas y no van a ser capaces de germinar. Para analizar el vigor de un lote mediante el TZ, se requiere disponer de un patrón de tinción de las estructuras vitales de la semilla por el tetrazolío.

Las aplicaciones del ensayo del TZ han sido ampliadas recientemente más allá de la determinación de la viabilidad o vigor de las semillas. Ayala et al. (2002) extendieron este método para estimar la contaminación de semillas de arroz por semillas transgénicas. Se utiliza también en leguminosas para diagnosticar la causa del deterioro de las semillas (daños mecánicos debidos a la cose-

cha o al transporte, por frío o ataques de insectos, entre otros).

### Fundamento

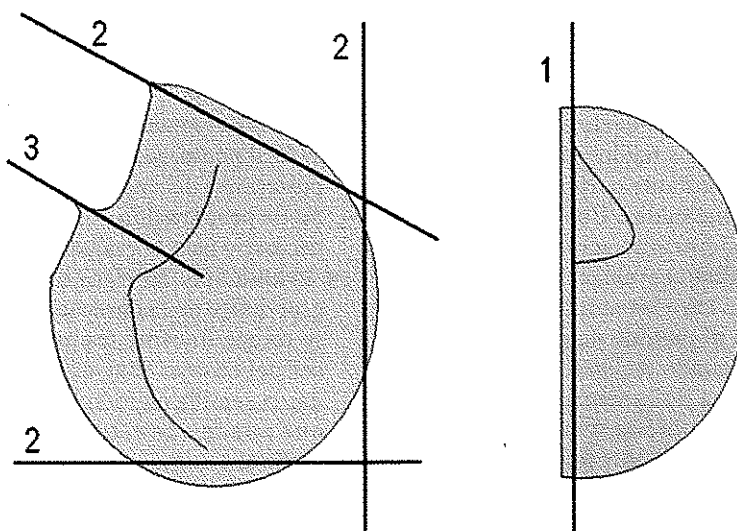
Para llevar a cabo la prueba de viabilidad, las semillas se tratan con una disolución de cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolío, de modo que penetre en las células y reaccione con las enzimas hidrogenasas implicadas en la respiración celular que tiene lugar en los tejidos vivos. Como consecuencia de la reacción, el tetrazolío se transforma en un compuesto de color rojo, el formazán, insoluble en agua, estable y no difusible, de modo que aquellas zonas donde ha habido reacción permanecerán teñidas de color rojo; por lo tanto la tinción con tetrazolío permite diferenciar las células vivas por su actividad respiratoria. Aquellas células que quedan débilmente coloreadas (tonalidad rosada), son células que tienen disminuida su actividad respiratoria y por consiguiente menor actividad hidrogenasa.

### Metodología

El ensayo del tetrazolío requiere seguir varios pasos, imprescindibles para todos los ensayos de viabilidad,

Figura 2:

Esquema de los cortes realizados para preparar las semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) para la tinción al tetrazolío (TZ): 1, corte longitudinal, en su totalidad y casi completamente en las proximidades de la superficie plana; 2, corte de los extremos de la semilla, sin dañar la radícula o los cotiledones y 3, corte lateral, en toda su profundidad desde el centro de la semilla hacia afuera, hasta la zona situada entre la radícula y los cotiledones.



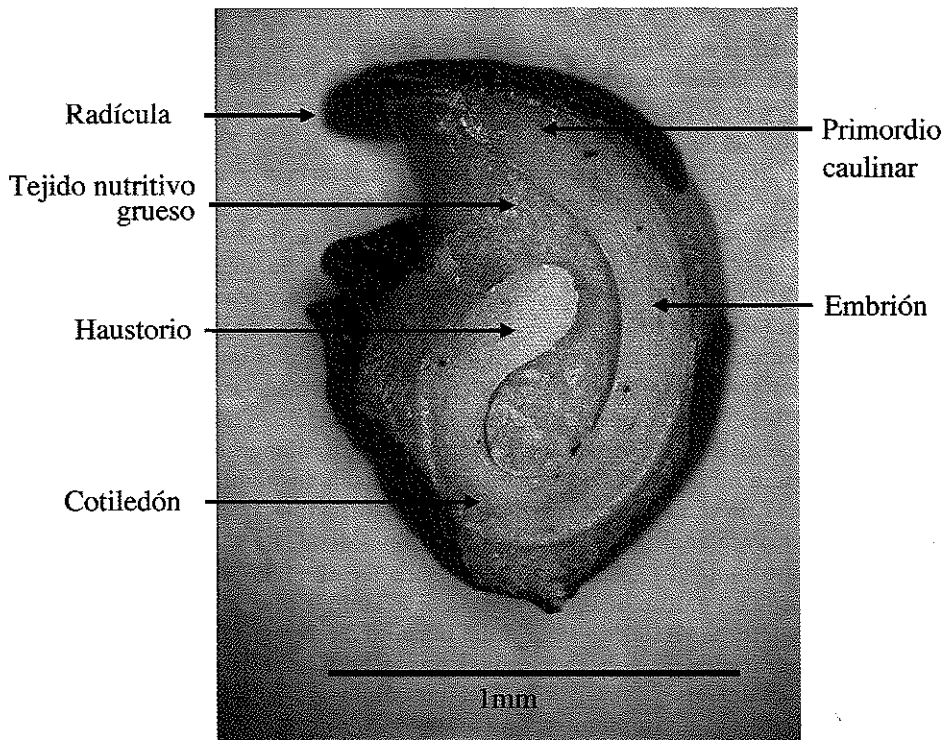


Foto 3. Anatomía de una semilla de cebolla (*Allium cepa* L.) en un test de viabilidad. El color rojo se debe a la transformación del tetrazolio en formazán en los tejidos vivos. A la hora de analizar la viabilidad y el vigor de la semilla cada una de las estructuras tiene su función y su importancia.

independientemente de la especie analizada. Esas etapas son:

**1. Preacondicionamiento.** Su objetivo es promover una tinción fiable y aumentar la calidad de la evaluación de los resultados mediante una prehumidificación, que facilitará los cortes posteriores y la eliminación de las estructuras innecesarias de la semilla, permitiendo de esta forma la adecuada penetración de la disolución de TZ.

**2. Preparación para la tinción.** La cubierta de la semilla puede ser una barrera para la difusión de la disolución de tetrazolio. El principal objetivo de esta etapa es precisamente asegurar la oportuna y adecuada penetración del tetrazolio en los tejidos vitales de la semilla mediante perforaciones y cortes superficiales. Una buena preparación permite acelerar la tinción y facilita la evaluación de los resultados. Para las semillas de cada especie, el método de preparación más adecuado depende del tamaño y la forma de la semilla, de la textura de la cubierta seminal, la localización, tamaño y forma del embrión y otras características de la semilla (Figura 2).

**3. Tinción.** Consiste en poner en contacto la sal de tetrazolio con los tejidos de la semilla, para que penetre y se difunda a través de los mismos. En los tejidos vivos se produce la reacción que hace que estos se tiñan de color rojo. La tinción posibilita el reconocimiento y la situación precisa de tejidos normales, débiles pero vivos, críticamente débiles o muertos, en función de la tinción. Los embriones y los tejidos nutritivos vivos, en caso de existir, se tiñen de rojo intenso.

**4. Preparación para la evaluación.** Depende siempre de las técnicas de preparación seguidas en las etapas anteriores. La forma de realizar un corte o incisión inicial en la cubierta seminal a menudo puede modificarse fácilmente, reduciendo en etapas posteriores del ensayo tanto el tiempo de preparación como el tiempo necesario para la evaluación.

**5. Evaluación.** Su rigor depende en gran parte de las precauciones que se tomen durante las primeras fases del ensayo. Hay que evitar dañar la semilla en todo momento, ya que puede que estos daños no se distinguen de los originales de la semilla. La capacidad del analista en la observación de los detalles y en

el análisis cuidadoso de la gravedad de las alteraciones del tejido es, asimismo, un factor muy importante para lograr una evaluación fiable.

### Evaluar las semillas mediante el test

Antes de realizar la evaluación, es necesario conocer la anatomía y la función de cada estructura en la semilla. En este sentido, la integridad del embrión es primordial. Cualquier daño que pueda sufrir el embrión conlleva normalmente a la falta de germinación o a la formación de plántulas anormales poco viables y vigorosas. El endospermo (tejido que contiene las sustancias de reserva de algunas semillas) también interviene sustancialmente en el proceso de germinación, así como en la formación de la plántula (Fotos 3 y 4).

La evaluación de cada semilla se basa en múltiples factores, a saber: turgencia y aspecto general de los tejidos, fracturas, tejidos sin embrión, daños causados por insectos, anomalías y otras causas que puedan debilitar la semilla o hacerla no viable. El tamaño, localización y naturaleza de los daños y otros defectos en o entre las estructuras son factores decisivos para determinar el nivel de viabilidad.

### ¿Cuándo realizar el ensayo del tetrazolio?

Los test o ensayos de germinación en laboratorio nos ofrecen una primera información respecto a la calidad de las semillas. Sin embargo, puede ocurrir que las semillas de un lote presenten un porcentaje de germinación muy reducido durante el ensayo. Pero esto no significa que las semillas estén muertas o que no vayan a germinar en campo. A menudo, estas semillas que no germinan están en estado de dormición, es decir, a pesar de encontrarse bajo condiciones óptimas para su germinación, no son capaces de germinar.

Existen varias causas de dormición o latencia. Este fenómeno es común en especies hortícolas, aunque la domesticación y la selección de las especies cultivadas han hecho que muchas de ellas perdieran esta capaci-

dad, que tenía originalmente una función ecológica muy importante. La relación entre viabilidad, germinación y latencia puede entenderse del siguiente modo:

$$\text{Semillas viables} = \text{Semillas germinadas} + \text{Semillas latentes}$$

En especies hortícolas es frecuente que existan problemas de latencia, por lo que un ensayo de germinación convencional no nos proporciona una información fiable sobre viabilidad. En estos casos se necesita combinar el ensayo de germinación con el test del tetrazolio. Los datos que nos proporcionan los resultados permiten entonces definir la cantidad de semillas viables no latentes (que germinan), semillas viables pero latentes y semillas no viables.

El ensayo del tetrazolio, cuando no se combina con un ensayo de germinación, solo permite definir el porcentaje de semillas viables, es decir, la tasa máxima de germinación que se puede obtener, sin tener en cuenta las semillas débiles o latentes que no germinarán en condiciones de campo.

### Ventajas y desventajas del ensayo del tetrazolio

Una de las ventajas fundamentales de este ensayo es la rapidez en la obtención de resultados. En menos de 24 h se puede conocer la viabilidad de un lote de semillas. Además es un ensayo que no precisa mucho material para su realización. El ensayo está normalizado para un gran número de especies y, como hemos dicho anteriormente su utilidad se puede extender al análisis del vigor con mucha facilidad, ya que sólo requiere dividir las semillas viables en categorías de alto y bajo vigor. El ensayo del tetrazolio, además de procurar la tasa de semillas inviables, permite conocer las causas del deterioro de las semillas muertas.

**La ISTA (ISTA, 2003b) establece como principales ventajas del ensayo de vigor al tetrazolio que:**

- Es aplicable a todo tipo de semillas.
- No depende de factores externos.

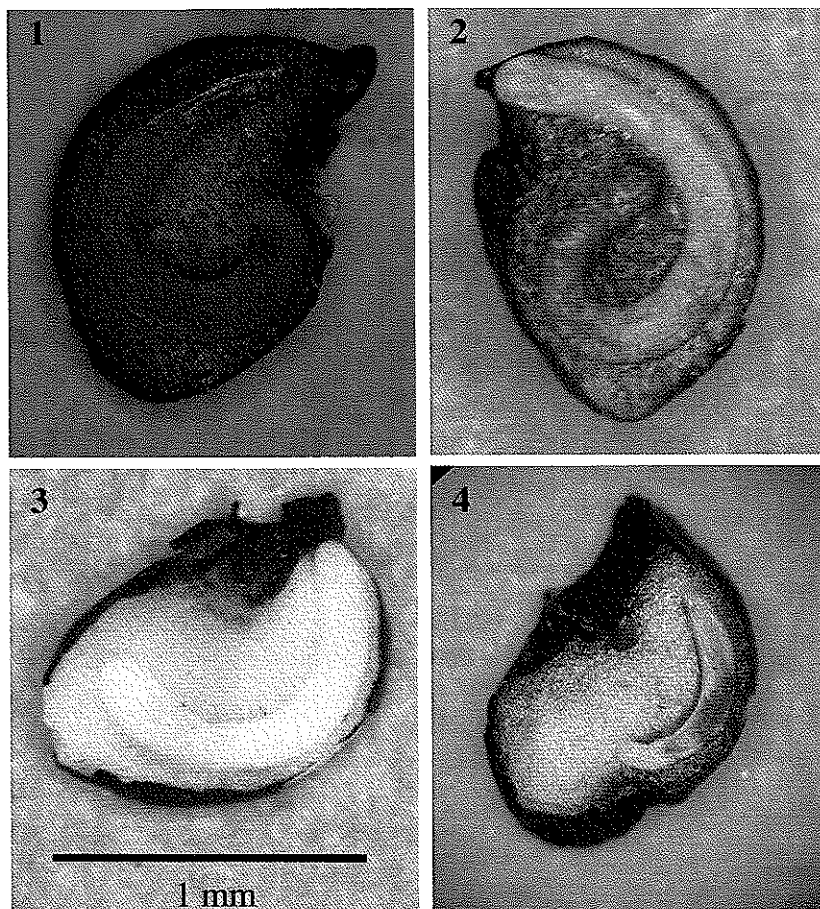


Foto 4. Semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) interpretadas en el test del tetrazolio: 1, semilla de tinción roja viable y de alto vigor; 2, Semilla de tinción rosa viable y de bajo vigor; 3 semilla sin teñir no viable y 4, semilla inviable cuyo embrión está inmaduro.

- Permite examinar características del vigor de las semillas tales como la integridad física de la semilla y de las membranas y la actividad de enzimas claves.

Su principal desventaja es que se trata de un ensayo muy laborioso, que precisa ser realizado por analistas cualificados para que los resultados obtenidos sean fiables. Además, la determinación e interpretación de los resultados pueden resultar subjetivas en algunos casos. Es un ensayo muy difícil de realizar cuando se trabaja con semillas pequeñas, como es el caso de muchas especies hortícolas. No debemos olvidar que cada una de las semillas debe prepararse y ser evaluada individualmente por el analista. Por eso, para el ensayo del tetrazolio se emplean generalmente muestras más pequeñas de semillas que en ensayos convencionales de germinación, menos laboriosos. Realizado solo, el ensayo del topográfico al tetrazolio no permite

determinar la proporción de semillas latentes en un lote. Además este análisis no permite detectar la presencia de hongos.

Generalmente se recurre al test del tetrazolio cuando se trabaja con semillas grandes, cuando se sospecha que existen problemas de dormición y/o cuando el ensayo de germinación requiere un largo periodo para completarse. De lo contrario, generalmente se recurre al ensayo de germinación, aunque no proporcione de forma directa datos sobre viabilidad. El test topográfico del tetrazolio facilita datos muy interesantes, sobre todo cuando se combina con un ensayo de germinación.

### [Bibliografía

Queda a disposición del lector en las siguientes direcciones de correo electrónico: redaccion@editorial-agricola.com, josem.duran@upm.es y Isabel.rodriguez.agronomos@upm.es \*