

Yanina A. Torres<sup>1,2</sup>  
Leticia S. Ithurrart<sup>1</sup>  
Carlos A. Busso<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, Argentina. <sup>2</sup>Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Provincia de Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS), Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Bahía Blanca, Argentina. Contacto: [yatorres@criba.edu.ar](mailto:yatorres@criba.edu.ar)

## Limitaciones del test de tetrazolio para determinar viabilidad de yemas y semillas

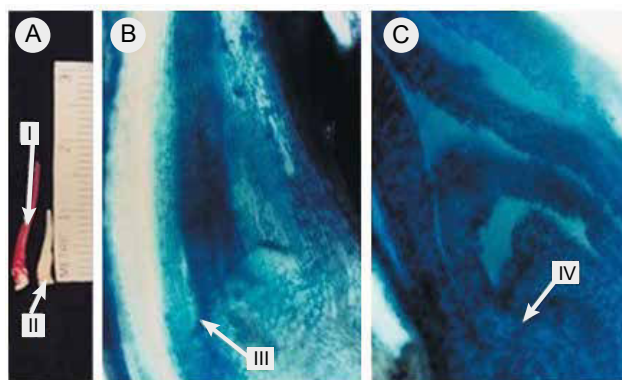
La técnica convencional de tinción conocida como test de tetrazolio no es la más apropiada para la determinación de la viabilidad de los tejidos vegetales, sino que debería complementarse con el colorante azul de Evans.

La técnica histológica de tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), más conocida como test de tetrazolio, se utiliza desde hace décadas para determinar, de manera sencilla y rápida, la viabilidad de los tejidos de plantas (semillas, tejidos verdes, meristemas de yemas axilares, polen) y hongos (esporas). Este método consiste en teñir el tejido vegetal con una sal de tetrazolio incolora, la cual mediante reducción enzimática es convertida a formazán, un producto de color rojo. Esta transformación química solo ocurre en los tejidos metabólicamente activos por medio de la respiración celular. Así, los tejidos teñidos de rojo o rosa se consideran viables y los no teñidos como no viables. Este método, sin embargo, es incapaz de distinguir entre los tejidos muertos y los latentes que tienen una actividad metabólica muy baja como para teñirse con TTC. Estos tejidos latentes o “dormidos” poseen aún el potencial de crecer y desarrollarse bajo condiciones apropiadas; es decir, que aún son viables. La latencia en semillas, por ejemplo, es una característica adaptativa que les permite germinar en un momento o lugar favorable para la posterior supervivencia de la plántula y la planta adulta.

Una característica fundamental de todas las membranas celulares es su permeabilidad selectiva, es decir, que mientras mantengan su integridad, el pasaje de sustancias a través de ellas será controlado por la célula. Existen diversos colorantes que permiten determinar la integridad de estas membranas y, por lo tanto, la viabilidad de las células; uno de ellos es el azul de Evans. Cuando las células están vivas, sus membranas semipermeables impiden el ingreso del colorante

a su interior celular; sin embargo, cuando las células están muertas, y las membranas pierden su capacidad de regular el ingreso o egreso de sustancias, el colorante ingresa tiñendo de azul oscuro todo el tejido. De esta forma pueden diferenciarse células vivas y muertas, logrando identificar correctamente si los tejidos no teñidos con TTC (tradicionalmente considerados muertos) son en realidad viables o no.

La germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas son primordiales en el manejo y conservación de pastizales naturales, ya sea en lo que



**Figura 1.** Tinción de yemas axilares de *Poa ligularis* y observación al microscopio. **A)** bases del tallo mostrando yemas metabólicamente activas teñidas con TTC (I: tejido rojo) y latentes (II: sin teñir, tejido muerto luego de tratarlo con agua hirviendo) (10X). **B)** yema viable no coloreada con TTC y teñida luego con azul de Evans (III: tejido azul claro o de color blanquecino) (400X). **C)** yemas muertas, no coloreadas con TTC, luego de la incubación en azul de Evans (IV: tejido completamente azul con núcleos más oscuros) (400X).

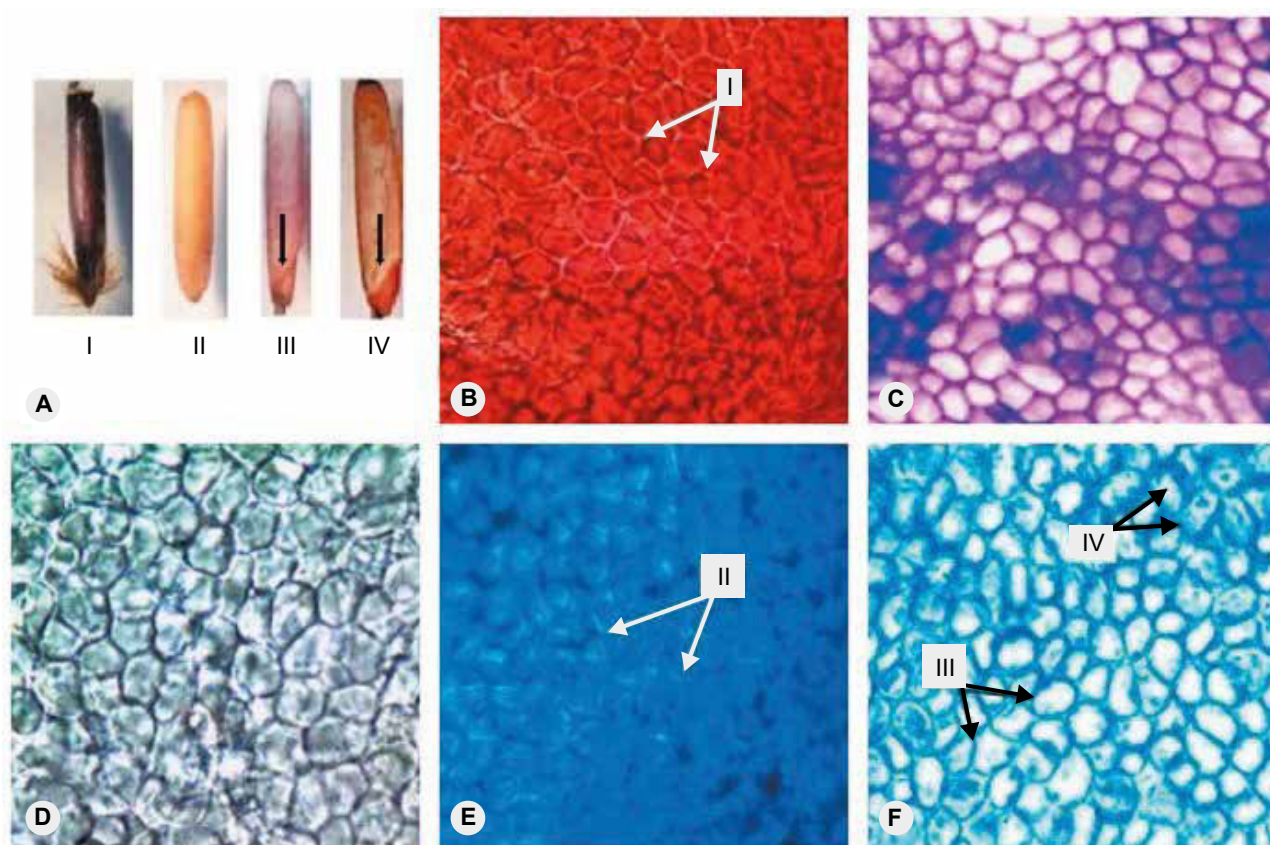
respecta a la resiembra de especies deseables o al control de aquellas no deseadas. De los diversos aspectos de la germinación, el mantenimiento de la viabilidad de las semillas con una edad considerable (longevidad) ha sido ampliamente estudiado; las semillas pueden permanecer latentes durante muchos años en el banco de semillas del suelo. En general, luego de varios años de almacenamiento, la viabilidad de las semillas disminuye, a una tasa que depende de la especie considerada y de las condiciones de almacenamiento. Esto enfatiza la importancia del desarrollo de nuevos métodos que permitan clasificar adecuadamente las semillas en sus verdaderos estados fisiológicos (metabólicamente activas, latentes o muertas).

Los objetivos de este estudio fueron (1) demostrar que los tejidos no teñidos con TTC podrían no estar muertos, sino latentes, y (2) combinar la técnica convencional de TTC con la tinción de azul de Evans para

una mejor clasificación del estado fisiológico de los tejidos de semillas y yemas axilares (tejidos que dan origen a nuevas macollas) como metabólicamente activos, latentes (pero viables) o muertos. Para esto se emplearon tejidos vegetales de varias gramíneas perennes nativas del sudoeste bonaerense.

### Viabilidad de yemas y semillas

Se emplearon plantas de poa (*Poa ligularis*), flechilla grande (*Nassella longiglumis*) y paja vizcachera (*Ameilichloa ambigua*) recolectadas en la Provincia Fito-geográfica del Monte. De la base de sus macollas se extrajeron cinco yemas axilares, que se cortaron longitudinalmente con un bisturí, se sumergieron en una solución de TTC, se incubaron en oscuridad a 30 °C durante 15 horas y se enjuagaron con agua destilada. Las yemas teñidas de rosa o rojo fueron consideradas metabólicamente activas. Las que permanecieron sin



**Figura 2.** Tinción de semillas de *Piptochaetium napostaense*. (A) Semilla intacta (I), semilla sin glumas (II) y corte longitudinal de la semilla mostrando la ubicación del embrión (flechas) sin teñir (III) y teñido de rojo con TTC (IV) (10X). B-F) detalle de cortes longitudinales de semillas observadas con microscopio óptico (1000X): B) células con alta actividad metabólica, teñidas de rojo con TTC (I: viables); C) células teñidas con TTC que permanecen sin teñir con azul de Evans indicando viabilidad; D) células muertas con agua hirviendo y tratadas posteriormente con TTC; E) células teñidas de azul oscuro con azul de Evans indicando muerte completa (II: muertas); F) células sin teñir con TTC y luego tratadas con azul de Evans indicando latencia (III: viables) y células dañadas durante el corte de color azul más oscuro (IV).

teñir (latentes o muertas), y que no estaban visiblemente necrosadas, se sumergieron en una solución de azul de Evans durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se enjuagaron. Este colorante se filtra a través de las membranas deterioradas de las células muertas y las tinte de azul. La inmersión de algunas yemas en agua hirviendo durante unos minutos previo a la tinción con azul de Evans permitió asegurar que los tejidos muertos se tiñen completamente. Todas las secciones se montaron en portaobjetos y se observaron al microscopio óptico. Los tejidos que no se colorearon con azul de Evans se clasificaron como latentes pero viables, mientras que los que se tiñeron de azul oscuro se consideraron muertos.

El mismo procedimiento se realizó con semillas de flechilla negra (*Piptochaetium napostaense*), de diferente antigüedad: 1, 3, 7, 10, 12, 13 y 16 años, recolectadas del Caldenal (Provincia Fitogeográfica del Espinal) y almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente. Se utilizaron 20 semillas de cada año. La recolección se realizó siempre al final de la temporada de crecimiento (finales de primavera, principios de verano) para garantizar que alcanzaran la plena madurez. Las semillas de esta especie tienen una latencia innata impuesta por sus glumas (brácteas estériles que delimitan las espiguillas), por lo que las mismas fueron removidas previo a la tinción (Figura 2A I y 2A II).

### Uso combinado de las técnicas de TTC y azul de Evans

Como se esperaba, las yemas axilares y los embriones de las semillas metabólicamente activos se tiñeron de rojo o rosa tras la inmersión en TTC (Figuras 1A I, 2A IV y 2B). Se corroboró que los tejidos viables teñidos previamente con TTC y, por lo tanto, metabólicamente activos, no se tiñen con azul de Evans (Figura 2C). En cambio, las yemas o embriones de semillas muertas con agua hirviendo permanecieron sin colorear (Figuras 1A II y 2D). Cuando estos tejidos se analizaron para comprobar su viabilidad utilizando azul de Evans, se tiñeron uniformemente de azul, más oscuro en los núcleos que en el citoplasma (Figuras 1C y 2E). Los tejidos con este aspecto se consideraron muertos.

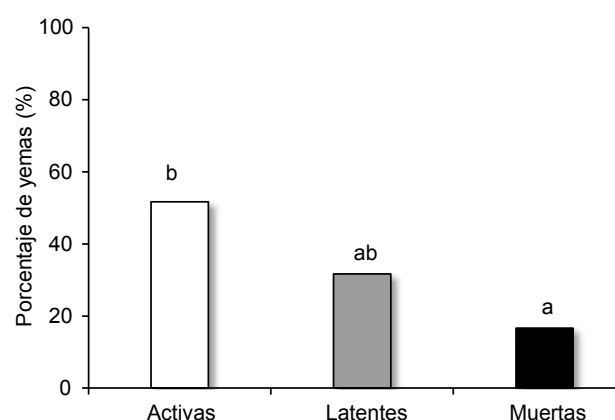
Las yemas o embriones de semillas que no se tiñeron con TTC, y por lo tanto eran considerados muertos por la técnica convencional, se expusieron a la tinción con azul de Evans y demostraron ser viables cuando permanecieron sin teñir (Figuras 1B y 2F) o muertos, cuando se tiñeron de azul oscuro (Figuras 1C y 2E). Los resultados obtenidos mostraron que, en las espe-

cies estudiadas, el uso combinado de ambas tinciones permite clasificar las yemas y las semillas en tres categorías de estados fisiológicos: metabólicamente activas, latentes (pero viables) o muertas.

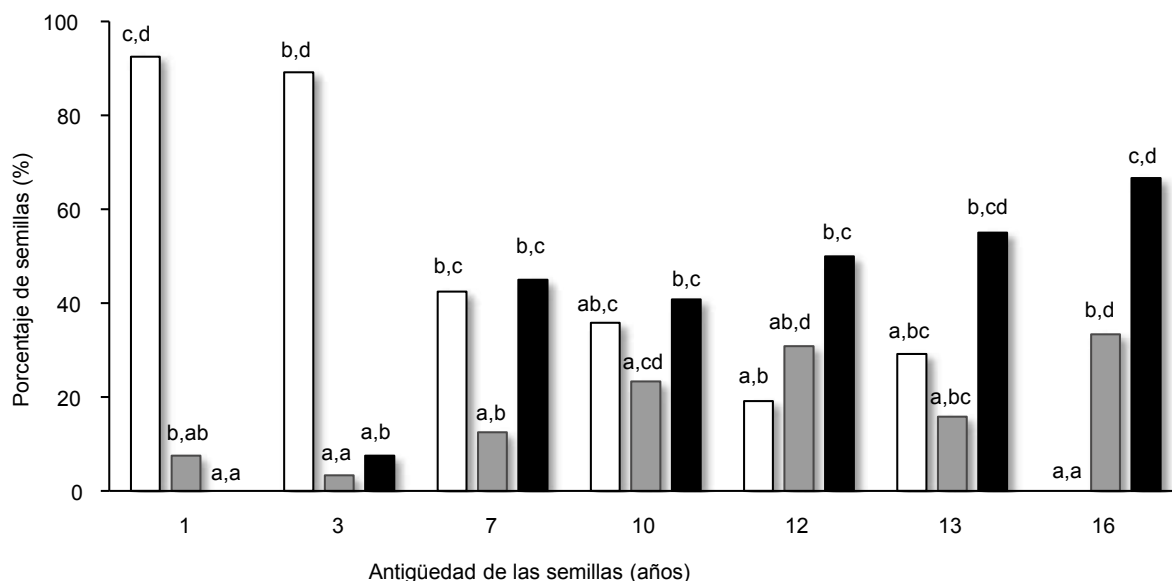
### Estado fisiológico de los tejidos analizados de las especies de gramíneas perennes

En cada estado fisiológico de las yemas axilares no se encontraron diferencias significativas entre las especies analizadas (Figura 3). El porcentaje de yemas metabólicamente activas fue significativamente mayor que el de yemas muertas en las tres especies, mientras que el porcentaje de yemas latentes (viables) mostró valores intermedios en las tres especies de gramíneas (Figura 3). Es decir que, en este caso, un porcentaje importante (entre 20 y 45%) de las yemas latentes se hubieran clasificado incorrectamente como muertas de no haberse empleado la técnica de tinción combinada.

Las semillas de flechilla negra mostraron diferencias significativas en su viabilidad según su antigüedad (Figura 4). Excepto en las semillas de 3 años de antigüedad, a medida que la semilla era más antigua, el porcentaje de semillas metabólicamente activas disminuía, mientras que aumentaba el porcentaje de semillas latentes y muertas, hasta carecer de semillas metabólicamente activas con 16 años de antigüedad.



**Figura 3.** Porcentaje de yemas axilares metabólicamente activas, latentes y muertas en promedio para las gramíneas *Poa ligularis*, *Nassella longiglumis* y *Amelichloa ambigua*. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las categorías de viabilidad. Las columnas representan el promedio de 15 yemas axilares. Para cada categoría, letras diferentes antes de la coma indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre especies. Para cada especie, letras diferentes después de la coma indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las categorías de viabilidad. Las columnas representan el promedio de 5 yemas axilares por especie.



**Figura 4.** Porcentaje de semillas de diferente antigüedad, metabólicamente activas (columna blanca), latentes (columna gris) y muertas (columna negra) de la gramínea *Piptochaetium napostaense*. Para cada año, letras diferentes antes de la coma indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre categorías de viabilidad de las semillas. Para cada categoría, letras diferentes después de la coma indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los años. Las columnas representan el promedio de 20 semillas por año.

## Conclusiones

La utilización combinada de los métodos de tinción de TTC y azul de Evans, en los tejidos de yemas axilares y semillas de cuatro especies de gramíneas perennes, permitió una determinación más precisa de su estado fisiológico. Algunas yemas o embriones no teñidos con TTC no estaban muertos como indicaba el uso de la técnica tradicional, sino que estaban latentes (es decir, viables). Esto es especialmente importante cuando el porcentaje de los tejidos latentes es al menos tan alto como el de los tejidos metabólicamente activos o muertos (Figura 3). Los tejidos latentes podrían tener todavía el potencial de convertirse en metabólicamente activos si se dan las condiciones adecuadas.

El porcentaje de semillas metabólicamente activas de flechilla negra disminuyó en función del tiempo de almacenamiento, mientras que el de las semillas latentes y muertas se incrementó. Estos resultados coinciden con los de otras especies vegetales, siendo la causa más probable las condiciones de almacenamiento.

A la luz de estos hallazgos, se propone que los tejidos de las especies de gramíneas de la zona de distribución, no teñidos con TTC, no se consideren necesariamente muertos en futuras investigaciones. Su viabilidad debería ser comprobada con otros colorantes que no penetran las membranas semipermeables intactas como el azul de Evans. En el caso de las yemas analizadas, la magnitud del error con el método tradicional,

el cual consideraba muertos tejidos que en realidad estaban en estado de latencia, demostró ser de hasta un 75%. La correcta determinación del estado fisiológico de los tejidos vegetales es fundamental para la provisión de servicios del agroecosistema, como son la conservación de los recursos fitogenéticos, la cosecha, procesamiento y producción de semillas viables y su posterior comercialización.

## Nota

Los resultados mencionados fueron publicados en el trabajo: Busso, C., Torres, Y., Ithurrart, L., Richards, J.H. The TTC technique might not appropriately test the physiological stage of plant tissues (2015). *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 551-556.

**El análisis de viabilidad utilizando únicamente el test del tetrazolio no determina correctamente el verdadero estado fisiológico en tejidos con baja actividad metabólica.**

## Bibliografía

Busso, C. A., Mueller, R. J., y Richards, J. H. (1989). Effects of drought and defoliation on bud viability in two caespitose grasses. *Annals of Botany*, 63, 477-485.

International Seed Testing Association (2021). Disponible en URL: [https://www.seedtest.org/en/ista-rules-2019\\_content---1--3410.html](https://www.seedtest.org/en/ista-rules-2019_content---1--3410.html)

Cabrera, A. L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: L.R. Parodi (Ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, Vol. 2, Fasc. 1, (pp. 1-85). Buenos Aires: ACME.

Castro-Concha, L. A., Escobedo, R. M., y Miranda-Ham, M. L. (2012). Measurement of cell viability. *Methods in Molecular Biology*, 877, 49-56.

Mayor, M. D., Bóo, R. M., Peláez, D. V., Elía, O. R., y Tomás, M. A. (2007). Influence of shrub cover on germination, dormancy and viability of buried and unburied seeds of *Piptochaetium napostaense* (Speg.) Hackel, *Journal of Arid Environments*, 68, 509-521.

Simpson, G. M. (2007). *Seed Dormancy in Grasses*. Cambridge University Press.

Towill, L. E., y Mazur, P. (1975). Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as viability assay for plant tissue cultures. *Canadian Journal of Botany*, 53, 1097-1102.