

Determinación del vigor por tetrazolio en semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) bajo distintas condiciones de almacenamiento

Pérez, M.A y J.A. Argüello

RESUMEN

Para el análisis de vigor por tetrazolio en semillas de maní aún no se dispone de patrones de evaluación adecuados.

El objetivo de este trabajo fue elaborar un patrón de tinción para la determinación del vigor en semillas de maní, sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento en relación con la emergencia de plántulas a campo.

En los ensayos se utilizaron semillas de maní cv. Florman almacenadas con y sin cáscara, las que fueron sometidas a condiciones de envejecimiento acelerado a fin de ampliar la variabilidad en la calidad, y en las que se llevaron a cabo ensayos de germinación, vigor por tetrazolio y ensayos de emergencia a campo. Las evidencias experimentales muestran que el ensayo de tetrazolio es un método sensible para evaluar calidad en lotes de semillas de maní, ya que establece diferentes niveles de vigor. Éstos pueden determinarse de acuerdo a las variaciones de color, tanto en intensidad como ubicación en eje embrionario y cotiledón. Así semillas de alto vigor muestran embriones de color rojo carmín, de aspecto brillante, con tejidos firmes al corte.

El patrón de tinción propuesto permite estimar la emergencia a campo en lotes de semillas de maní.

Palabras clave: semilla, maní, vigor, tetrazolio

Pérez, M.A y J.A. Argüello, 1997. Tetrazolium evaluation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cv. Florman seeds under different storage condition. Agriscientia XIV : 19-24.

SUMMARY

At present seed analysts do not have suitable test patterns to analyse vigor in peanut seed by Tetrazolium. The aim of this work was to prepare a dye pattern to determine the vigor of peanuts cv. Florman using various storage conditions in correlation with field test assays. The peanut cv. Florman seeds were stored with and without shell submitted to ageing accelerated conditions in order to enlarge the variability of the quality, the variables measured were percentage of germination, percentage of vigorous viable seeds, less vigorous, non viable and percentage of emergent plantlets at field.

The results revealed that the Tetrazolium test is a suitable method to evaluate the

quality of seed lots of peanuts cv. Florman, since different vigour levels can be established these can be determined according to color variation, its interest and position on embryonic apex and cotyledon. Thus, high vigour seeds show bright red carmine embryos and steady tissue when cut. The proposed dye pattern allows to estimate emergence of peanut seeds at field condition.

Key words: seeds quality, peanut, vigor, tetrazolium, storage condition

Pérez, M.A y J.A. Argüello, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. CC:509 Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba. e-mail: aperez@agro.uncor.edu

INTRODUCCIÓN

El área manisera argentina se encuentra ubicada en un 98% en la provincia de Córdoba, siendo el cv. Florman el de mayor difusión (Giandana, 1992 a). Es de destacar, la importancia que tiene la "calidad de la semilla" a emplear como factor determinante, a fin de optimizar la siembra de maní (Giandana, 1992 b). En lo que hace a la determinación de "calidad", los analistas aún no cuentan con patrones de evaluación adecuados para el análisis de vigor por tetrazolio en semillas de maní.

Entre los ensayos para estimar calidad de semillas, el ensayo de tetrazolio ha sido ampliamente aceptado como una técnica rápida y segura para determinar la viabilidad en otras especies (Pasha & Das, 1982; Bulan, 1988). Desde el punto de vista agronómico, las estimaciones logradas por este ensayo facilitan tanto la comercialización como el manejo de los lotes, dado que es una técnica sencilla y de rápida ejecución (Bulan, 1988).

Al respecto Hathayatham (1988) sostiene que la tinción diferencial con tetrazolio estaría determinada por el grado de deterioro de las semillas. Al respecto, Gitli Das & Swati Sen-Mandi (1992) y Vaughan & Moore (1970) sostienen que los procesos respiratorios que tienen lugar en el embrión, son determinantes en la aparición del color rojo sobre los tejidos vivos de éste.

El ensayo de tetrazolio, además de determinar viabilidad, puede ser usado para estimar el vigor (Vaughan & Moore, 1970; Yaklich & Kulik, 1979; AOSA, 1983). Si bien Frezzi (1967) y Vaughan & Moore (1970) realizaron estudios con tetrazolio en maní, no existen antecedentes de análisis por tetrazolio de semillas de maní cv. Florman en relación al vigor. La diferencia fundamental para que el ensayo de tetrazolio sea interpretado como indicador de viabilidad o de vigor, está dada en que ciertas áreas teñidas en las semillas que resultan no ser críticas al juzgar

para viabilidad, pueden ser determinantes al establecer su vigor (AOSA, 1983; ISTA, 1995). La observación debe ser detallada en todas las partes constituyentes de la semilla en cuanto a la coloración y turgencia de los tejidos, teniendo en cuenta las condiciones del embrión (Pasha & Das, 1982; Vaughan & Moore, 1970) ya que es la parte más sensible (Pérez & Argüello, 1995).

El objetivo de este trabajo fue elaborar un patrón de tinción para la determinación del vigor en semillas de maní sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento, en relación con la emergencia de plántulas a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En los ensayos de calidad se utilizaron semillas de maní (*Arachis hypogaea* L. cv. Florman) almacenadas con y sin cáscara (descascarado mecánico) provenientes de la E.E.A Manfredi (Córdoba, Argentina). Las condiciones de almacenamiento durante un año fueron de 20 °C ± 5 y HR 50% ± 10. En todos los casos las semillas previo a los ensayos, se trataron con Thiuram (1g/kg).

Posteriormente y a fin de ampliar la variabilidad en la calidad de las muestras con y sin cáscara, parte de las mismas se sometieron a condiciones de envejecimiento acelerado. Para ello se utilizó la metodología de McDonald & Phaneendranath (1978). En ensayos preliminares se ajustaron las condiciones, para el material biológico estudiado, a 45 °C y 100% HR, durante 3 días de acuerdo a Pérez & Argüello (1995).

Ensayo de germinación: se llevaron a cabo ensayos de germinación estándar con 3 repeticiones de 50 semillas cada una, a las condiciones propuestas por ISTA (1996) en arena, a 20 °C (16 hs.) y 30

°C (8 hs). A los 10 días desde la siembra se determinó el porcentaje de plántulas normales, anormales y semillas muertas (ISTA, 1979).

Ensayo con Tetrazolio: Se colocaron a embeber 3 repeticiones de 50 semillas cada una por tratamiento, entre toallas de papel humedecido con agua destilada durante 16 horas a 10 °C. Posteriormente se retiraron en forma manual los tegumentos, separando los cotiledones. Aquellos con el eje embrionario adherido se sumergieron en solución de Tetrazolio (cloruro 2, 3, 5, trifeníl tetrazolio Sigma) al 0.5% a 30 °C durante 2 horas en oscuridad, según experiencias previas. Posteriormente se los enjuagó con agua corriente.

De acuerdo a la localización e intensidad de tinte se establecieron categorías que posteriormente se combinaron en forma aditiva. A las combinaciones con "t" más bajo (Student, $p < 0.05$) se las consideró con más factibilidad de integrar el grupo de semillas viables de alto vigor, viables de bajo vi-

gor o no viables, según correspondiere (Pasha & Das, 1982).

Ensayo a campo: La siembra a campo se realizó el 3 de enero en 2 localidades: Manfredi (L1) en el Dpto. Río Segundo y Ascochinga (L2) en el Dpto. Colón, ambas en la provincia de Córdoba. El porcentaje de humedad del suelo a una profundidad de 10 cm fue de $22\% \pm 9.2$ en L1 y de $30\% \pm 6$ en L2. La temperatura del suelo fue de 27 °C (mínima 20.3) en L1 y 30 °C (mínima 25 °C) en L2. Las parcelas estaban constituidas por 2 surcos distanciados 0.7 m, sembrándose a mano 50 semillas por surco, con 4 repeticiones por tratamiento.

A los 30 días desde la siembra se evaluó el porcentaje de plántulas normales emergidas.

Diseño experimental y análisis estadístico

En todos los casos el diseño experimental fue totalmente aleatorizado. Para cada variable se llevaron a cabo el ensayo de Shapero Wilks para normalidad y el ensayo gráfico y de Levene para ho-

Tabla 1. Categorías de tinción con Tetrazolio en semillas de maní cv. Florman almacenadas sin cáscara (s.c) y con cáscara (c.c), sin Envejecimiento Acelerado (s/E.A) y con Envejecimiento Acelerado (c/E.A).

Categorías de tinción		Porcentajes de semillas en cada categoría			
Grupos	Descripción de las categorías	s.c s/E.A	s.c c/E.A	c.c s/E.A	c.c c/E.A
Viables vigorosas	Embrión totalmente teñido	70	30	77	72
	Áreas irregulares y superficiales sin teñir a nivel del cotiledón (1%)	13	30	7	4
	Extremo de la radícula rojo intenso	0	0	11	9
Viables poco vigorosas	Extremo de la radícula sin teñir o rojo cereza (hasta 2 mm)	7	7	5	6
	Más del 50% del cotiledón sin teñir	2	4	0	3
	Área del cotiledón blanca o rojo cereza circundante al eje, < 50% del cotiledón.	4	2	0	3
No Viables	Eje embrionario blanco o rojo cereza. Cotiledón teñido	0	1	0	0
	Eje embrionario blanco o rojo cereza, áreas del cotiledón sin teñir	4	10	0	3
	Eje embrionario blanco, área central del cotiledón sin teñir	0	8	0	0
	Embrión totalmente blanco, marrón o blanco amarillento	0	6	0	0

mocedasticidad. El análisis de las medias se realizó usando el test de Tukey ($p < 0.05$). En todos los casos cada ensayo fue repetido al menos tres veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la condición de almacenamiento ensayada (con y sin E.A), con y sin cáscara, se obtuvieron diferentes categorías de tinción con tetrazolio (Tabla 1). De la asociación de las categorías de tinción surgen los grupos: viables de alto vigor, viables de bajo vigor y no viables. Las categorías en forma aditiva, se convirtieron en combinaciones cuyos valores porcentuales se asimilaban a la emergencia a campo (Tabla 2).

Las evidencias experimentales muestran la sensibilidad del ensayo en respuesta al deterioro sufrido, es decir a su nivel de vigor. Resultados similares fueron encontrados por Gitali Das & Sen Mandi (1992) en trigo y Yaklich & Kulik (1979) en soja. Así, las semillas vigorosas, o sea poco deterioradas (Fig. 1A), presentan un tejido firme, tiñéndose superficialmente de color carmín a nivel de cotiledón y eje embrionario. En tanto los tejidos más profundos, que permanecen firmes, presentan color más claro, dado por el menor grado de penetración del tetrazolio (Pasha & Das, 1982). Así mismo, semillas que presentan, a nivel del cotiledón, pequeñas áreas blancas superficiales (1%), son consideradas vigorosas (Fig. 1 B), de acuerdo a la relación entre las categorías de viables de alto vigor y la emergencia a campo (Tabla 2).

Semillas que presentan color que se asemeja al rojo cereza son consideradas de bajo vigor, ya que la pérdida de la integridad de membranas facilita la entrada del tetrazolio (Bulan, 1988). Al respecto

Vaughan & Moore (1970) sostienen que la respiración está aumentada, por lo que el tetrazolio se reduce más fácilmente observándose el color rojo cereza. Por otra parte el color blanco se debe a células muertas que no respiran (AOSA, 1983; ISTA, 1995). Consecuentemente semillas de maní que presentan áreas de color rojo cereza y/o blancas se consideran deterioradas.

De acuerdo a lo propuesto por Frezzi (1967), se debe tener en cuenta el grado de tinción del cotiledón. Esto permitirá, según este autor, establecer el nivel de deterioro en las semillas como consecuencia de las condiciones de almacenamiento o daños mecánicos. Por lo tanto, zonas blancas o rojo cereza (Fig. 1 de la E a la I) que abarcan menos del 50% del total del cotiledón corresponden a la categoría viables de bajo vigor. Mientras que semillas con zonas deterioradas (blancas o rojo cereza) cercanas al eje embrionario (Fig. 1F), se consideran de bajo vigor, ya que perjudicará su crecimiento posterior. Al respecto las evidencias experimentales de los ensayos a campo (Tabla 2) respaldan esta afirmación, concordando con lo encontrado por Frezzi (1967) en semilla de maní Colorado y Blanco.

En la evaluación de semillas de maní con tetrazolio se reconoce un área crítica que corresponde al eje embrionario, de acuerdo a lo propuesto por Frezzi (1967) y Vaughan & Moore (1970). Esto es debido a que el eje embrionario resulta ser la porción de la semilla de maní más susceptible al deterioro (Pérez & Argüello, 1995). Además, es una parte esencial para el crecimiento de una plántula normal de maní, y dada su morfología, deja expuesta la radícula, la que puede ser dañada mecánicamente (Frezzi, 1967). Por lo tanto, a nivel de eje, sólo daños muy superficiales, que no afecten al sistema vascular, podrán ser tolerados para considerarlo vi-

Tabla 2. Tetrazolio, germinación y emergencia a campo de semillas de maní cv. Florman almacenados sin cáscara (s.c) y con cáscara (c.c), sin Envejecimiento Acelerado (s/E.A) y con Envejecimiento Acelerado (c/E.A), en dos localidades (L1 y L2).

Tratamientos	Tetrazolio	Germinación (%)			Emergencia a campo (%)	
	Viables vigorosas(%)	Normales	Anormales	Muertas	L1	L2
s.c s/E.A	83 ab	89 ac	7	4	79 b	86 ab
s.c c/E.A	60 ab	40 a	30	30	50 c	56 b
c.c s/E.A	95 a	93 a	7	0	89 a	94 a
c.c c/E.A	85 a	83 a	13	4	86 a	82 a

Cada valor representa la media de tres repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p < 0.05$) de acuerdo al test de Tuckey.

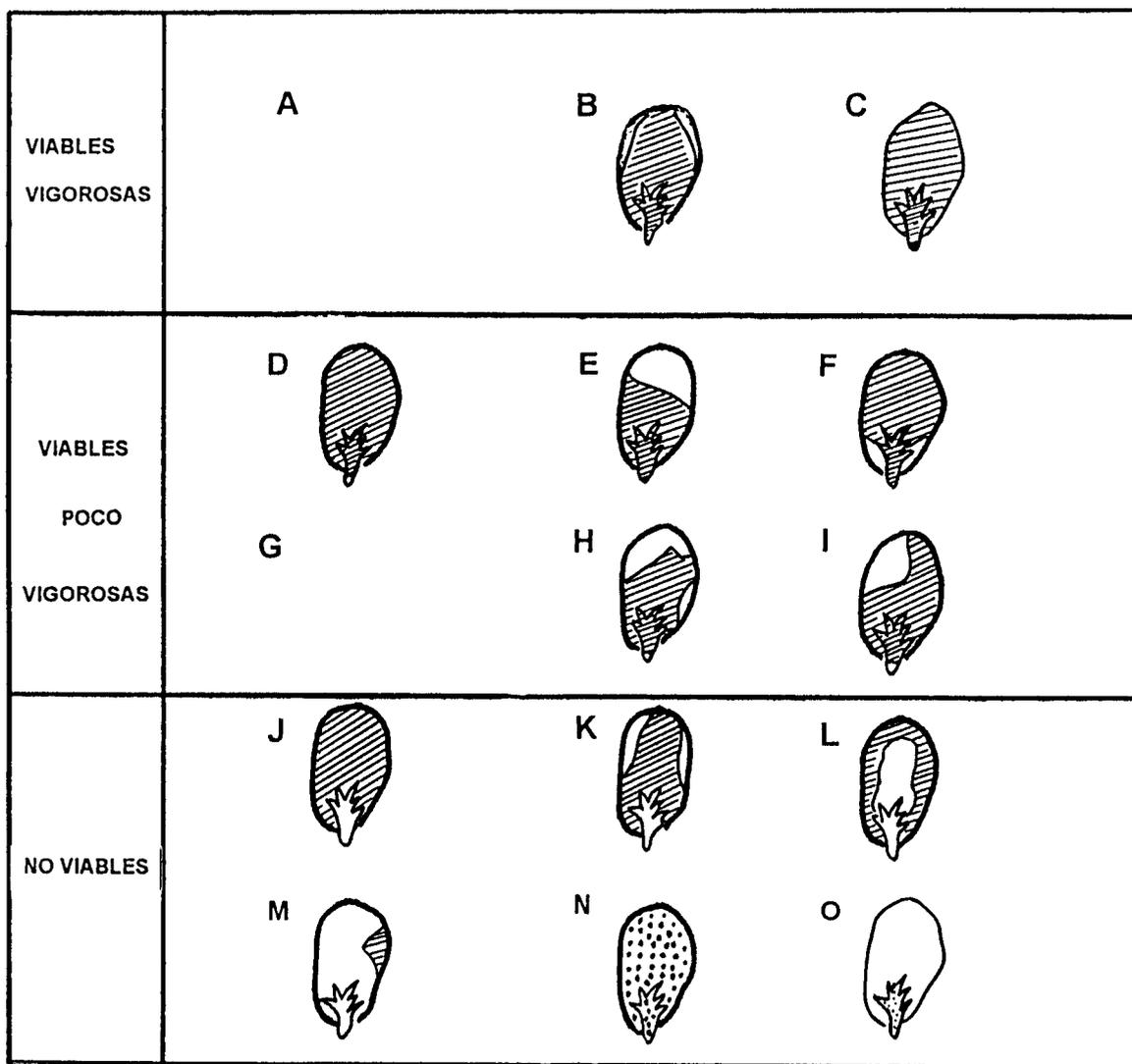


Figura 1: Categorías de tinción con Tetrazolio en semillas de maní cv. Florman almacenados con y sin cáscara sometidos a Envejecimiento Acelerado (E.A). Las áreas blancas representan zonas no teñidas o rojo cereza.
A. Embrión totalmente teñido. **B.** Áreas irregulares sin teñir (1%), superficiales a nivel de cotiledón. **C.** Extremo de la radícula rojo intenso. **D.** Extremo de la radícula sin teñir (> 2 mm). **E.** Porción distal del cotiledón sin teñir, < 50%. **F.** Área del cotiledón blanca o rojo cereza circundante al eje, < 50% del cotiledón. **G.** Extremo de radícula blanca, porción distal del cotiledón sin teñir (< 50%). **H-I.** Extremo de radícula blanca, < 50% del cotiledón sin teñir. **J.** Eje embrionario blanco, cotiledón teñido. **K.** Eje embrionario blanco, áreas del cotiledón sin teñir (< 50%). **L.** Eje embrionario blanco, área central del cotiledón sin teñir. **M.** Eje embrionario blanco, más del 50% del cotiledón sin teñir. **N.** Embrión totalmente marrón o blanco amarillento. **O.** Cotiledón blanco, eje embrionario marrón o blanco amarillento

goroso. En tal sentido Hathayatham (1988) sugiere que, en arveja, ejes con áreas deterioradas con una profundidad de no más de un cuarto de diámetro de la radícula pueden ser considerados vigorosos. En base a lo expuesto se deduce que el eje embrionario de maní debe presentar un color rojo carmín, de aspecto brillante, y al corte el tejido debe ser firme, para considerar a una semilla como vigorosa.

En algunos casos se presentan semillas vigorosas que tienen el extremo de la radícula color rojo intenso (Fig 1C). Esta característica no corresponde a un signo de deterioro, si no más bien una muestra evidente de que la germinación ha comenzado, coincidentemente a lo observado en poroto por Bulan (1988). Este autor sostiene que el tejido meristemático de la radícula se vuelve más activo durante el crecimiento y

la solución de tetrazolio que penetra se reduce más, dando una coloración más intensa.

Radículas con su extremo blanco de aproximadamente 2 mm (Fig. 1D), evidencian daño mecánico tal lo expuesto por Vaughan & Moore (1968) en maní. Esta característica se corresponde al total de plántulas anormales en el ensayo de germinación (Tabla 2) y al tipo de anomalías observadas, localizándose éstas principalmente a nivel de radícula.

Los valores porcentuales totales de semillas viables de alto vigor (Tabla 2), que surgen de la combinación de las categorías establecidas, fueron comparados con la emergencia a campo y el ensayo de germinación, sin que se observaran en general diferencias significativas ($p < 0.05$). A partir de los resultados obtenidos, es claro que el porcentaje de semillas vigorosas y la emergencia a campo en ambas localidades ensayadas presentaron una estrecha asociación.

El ensayo de tetrazolio refleja las variaciones en el vigor de semillas de maní cv. Florman, por lo que se transforma en un método conveniente para estimar la emergencia a campo. Además, esta metodología permitió establecer claramente el efecto beneficioso del almacenamiento de semilla de maní con cáscara (Tabla 2), mencionado por Frezzi (1967) y adoptado como técnica de manejo poscosecha.

Mediante el ensayo de tetrazolio normalizado y con la ayuda del patrón de tinción propuesto (Fig. 1), el analista entrenado de un laboratorio de semillas puede obtener resultados estimativos rápidos y confiables sobre la calidad de lotes de semillas de maní cv. Florman.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Agr. Edgardo Giandana por el suministro de semillas y por colaborar en la implementación de los ensayos a campo en la E.E A Manfredi Córdoba.

Al CONICOR por el subsidio recibido.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Seed Analysts, 1983. Seed Vigour Handbook. Association of Official Seed Analysts. Contribution N° 32. pp 82-88.

- Bulan, P., 1988. Tetrazolium evaluation of Mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and Whitbean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. Thesis MS. Mississippi State University Mississippi 62 pp.
- Frezzi, M.J., 1967. *La semilla de maní y sus problemas*. IDIA 1-28.
- Giandana, E. (a), 1992. Para optimizar la siembra de maní. *Panorama Manisero* VI N° 20, 6-7. Córdoba R.A.
- Giandana, E. (b), 1992. Evolución de los rendimientos en maní en la Argentina. *Panorama Manisero* VI N° 20, 12-13. Córdoba R.A.
- Gitali Das and Swati Sen-Mandi, 1992. Triphenyl tetrazolium chloride staining pattern of differentially aged wheat seed. *Seed Sci and Technol.*, 20, 367-373.
- Hathayatham, A., 1988. Tetrazolium evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Austrian winter pea (*Pisum sativum* v. *arvense* (L.) Poir) seeds. Thesis Mississippi State University Mississippi. 80 pp.
- International Seed Testing Association, 1979. Manual para Evaluación de Plántulas en análisis de germinación. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Madrid. 2ª Edición. Dr J. Bekendon and Dr. R. Schmitt-Grob. 130 pp.
- International Seed Testing Association, 1995. Handbook of vigour test methods. 3rd edition. Ed. J.G. Hampton and D.M. Tekrony Chairperson and Deputy Chairperson, Vigour Test Committee. 117 pp.
- International Seed Testing Association, 1996. International rules for Seed Testing. *Seed Sci & Technol.* 24, Supplement. 343 pp.
- Mc. Donald, M. and Phaneendranath, B., 1978. A modified accelerated aging seed vigor test for soybean. *Journal of seed Technol.*, vol. n° 1: 27-37.
- Pasha, M.K. and R.K. Das, 1982. Quick viability test of soybean seeds by using tetrazolium chloride. *Seed Sci. & Technol.* 10:651-655.
- Pérez, M.A and J.A. Argüello, 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Florman) seeds under natural and accelerated aging. *Seed Sci & Technol.*, 23, 439-445.
- Yaklich, R. and M. Kulik, 1979. Evaluation of vigor tests in soybean seeds: Relationship of the standard germination test, seedling vigor classification, seedling length and tetrazolium staining to field performance. *Crop Sci.* 19 247-252.
- Vaughan, C. and R. Moore, 1970. Tetrazolium evaluation of the nature and progress of deterioration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed in storage. *Proc. Association of Official Seed Analysts*. Vol. 60. 104-117.