

Técnicas Para Evaluar Germinación, Vigor y Calidad Fisiológica de Semillas Sometidas a Dosis de Nanopartículas

¹Josué Israel García-López, ²Norma Angélica Ruiz-Torres, ³Ricardo Hugo Lira-Saldivar, ⁴Ilena Vera-Reyes y ⁵Bulmaro Méndez-Argüello

¹Asistente de Proyecto. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) Blvd. Enrique Reyna Herмосillo 140, Saltillo, Coah., CP 25100. ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro #1923. Buenavista, Saltillo, Coah. ³CIQA, Saltillo, Coah., CP 25100. ⁴Catedras CONACYT-CIQA. Saltillo, Coah., CP 25100. ⁵Investigador Posdoctoral CONACYT-CIQA. Saltillo, Coah., CP 25100.

Resumen

La agricultura moderna demanda semilla de alta calidad, siendo esta el principal insumo que en la agricultura debe cumplir con diferentes atributos, entre estos se encuentran: la calidad genética, fisiológica, física y sanitaria. Las pruebas de germinación y de viabilidad han sido utilizadas ampliamente en la evaluación de la calidad de las semillas, cabe destacar que la calidad fisiológica hace referencia a mecanismos intrínsecos de la semilla que determinan su capacidad de germinación, la emergencia y el desarrollo de aquellas estructuras esenciales para producir una plántula normal bajo condiciones favorables. Sin embargo, en los últimos años se ha dado énfasis en la medición de otros parámetros, tales como: el vigor y las variables asociadas con este parámetro.

La prueba de germinación estándar es el procedimiento más común para evaluar la calidad fisiológica de un lote de semillas. No obstante, debido a que esta prueba se realiza bajo condiciones óptimas para cada especie, en la práctica ha demostrado sobreestimar el comportamiento de las semillas y, además, resulta deficiente para discriminar lotes de semillas en relación con la rapidez y uniformidad de germinación (McDonald, 1980). En este caso es necesario evaluar el vigor. La definición de vigor es relativamente novedosa en comparación con la germinación. El vigor de la semilla es un parámetro muy importante puesto que permite identificar las diferencias entre la germinación y la emergencia en campo, principalmente cuando las condiciones del campo pueden ocasionar estrés. Dentro de la utilidad práctica de los ensayos de vigor de semillas, se encuentra su uso en los

programas de mejoramiento genético para el desarrollo de cultivares con mejor comportamiento de la semilla. Tiene además aplicaciones en el estudio de los aspectos de la producción de semilla, cosecha, acondicionamiento y procedimientos de almacenamiento. Actualmente los ensayos de germinación y de vigor, se están usando para determinar el efecto que ejercen los tratamientos con nano partículas (NPs), nanotubos de carbono (NTC), grafito u óxido de grafeno, aplicados a semillas, en el proceso de germinación y vigor de semillas y plántulas.

Introducción

La calidad fisiológica de la semilla abarca la suma de todas las propiedades o características, las cuales determinan el nivel potencial del comportamiento de las semillas y el establecimiento del cultivo. Los componentes de la calidad de la semilla incluyen los aspectos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios (microorganismos e insectos) (Velázquez, 2014). La calidad fisiológica puede ser beneficiada a través de pre-tratamientos directos en la semilla antes de la siembra.

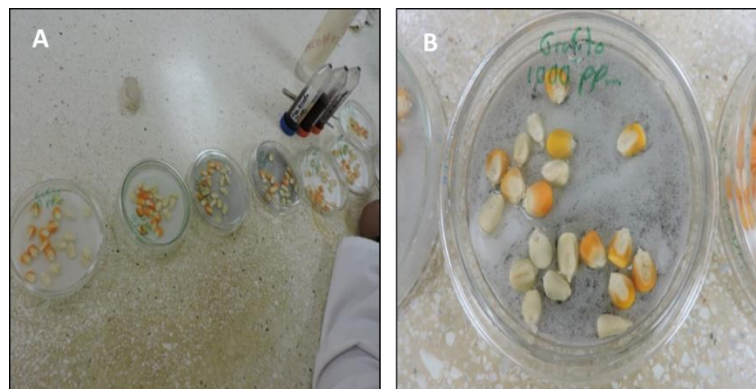
Sin embargo, los componentes de calidad pueden ser afectados adversariamente durante la producción, beneficio, almacenamiento y transporte de las semillas (Méndez *et al.*, 2007). De tal manera, es fundamental realizar un control de calidad y dentro de este se ven involucrados los diferentes métodos útiles y confiables para determinar las principales características de lotes de semillas con buena calidad, con la finalidad de cumplir con los estándares de germinación y vigor. Este aspecto adquiere mayor relevancia aún, ya que el mercado de las semillas ha experimentado importantes cambios como la globalización y el incremento de su valor (Contreras, 2002).

Es clave destacar que un buen manejo del control de la calidad de la semilla influye directamente sobre su valor comercial. La prueba de germinación estándar es el procedimiento más común para evaluar la calidad fisiológica de un lote de semillas y sirve

para determinar en gran medida la viabilidad de la semilla, que tiene la capacidad de producir una plántula normal, la cual establece la capacidad de germinación. Durante el desarrollo de este artículo se presentan las principales técnicas en bioensayos para evaluar la germinación y el vigor de semillas y plántulas, para determinar el efecto de NPs, NTC, grafeno o grafito, en las variables desarrollo de plántulas normales, anormales, semillas sin germinar, vigor de germinación y vigor de plántula (longitud de plántula: tallo y raíz), y peso seco de plántula.

Ensayos para evaluar el efecto de NPs en la germinación y vigor de semillas

Antes de llevar a cabo un ensayo de germinación, se debe tratar la semilla con las NPs, (ZnO, Ag, Fe₃O₄, Cu, CeO₂, etc.) o con NTC a concentraciones bajas (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 10.0 o 50 ppm) o altas (100, 200, 500 o 1000 ppm), para esto, con antelación se desarrolla una curva de imbibición. Esta curva permite determinar el número máximo de horas que se debe tratar las semillas, para que estas embeban NPs o NTC, a través de la testa, hipótesis propuesta por Khodakovskaya et al. (2009). Una vez determinado el número de horas, se siembran las semillas sobre papel filtro en cajas Petri, se aplica los tratamientos en solución sobre las semillas (20 - 30 ml, dependiendo del tamaño de la semilla) y las cajas se mantienen por ese periodo en una cámara bioclimática a 25 °C (Figuras 1a y 1b). Transcurrido el tiempo (ej. semillas de maíz, melón y pepino se embeben por 24 h), las semillas se siembran de acuerdo a un ensayo de germinación estándar, que se explica a continuación.



Figuras 1A y 1B. Tratamiento de semillas de maíz con grafito a diferentes concentraciones.

Prueba de germinación estándar

La prueba de germinación tiene como finalidad determinar la viabilidad de un lote de semillas, la cual se determina a través del por ciento de semillas que tienen la capacidad de generar plántulas normales, bajo condiciones óptimas de luz, agua, aire y temperatura. La prueba de germinación “estándar entre papel” se desarrolla en condiciones de laboratorio, consiste en evaluar la semilla tratada con NPs o NTC en condiciones controladas de humedad, temperatura y luz, para determinar el porcentaje de plántulas normales que determinan la capacidad germinativa. El proceso de germinación está constituido por tres fases: i) imbibición de agua ii) activación del metabolismo, síntesis de proteínas y carbohidratos y degradación de reservas; iii) desarrollo del embrión y ruptura de las testa a través de la cual se observa la emergencia de radícula y posteriormente la plúmula o tallo (Figura 2).

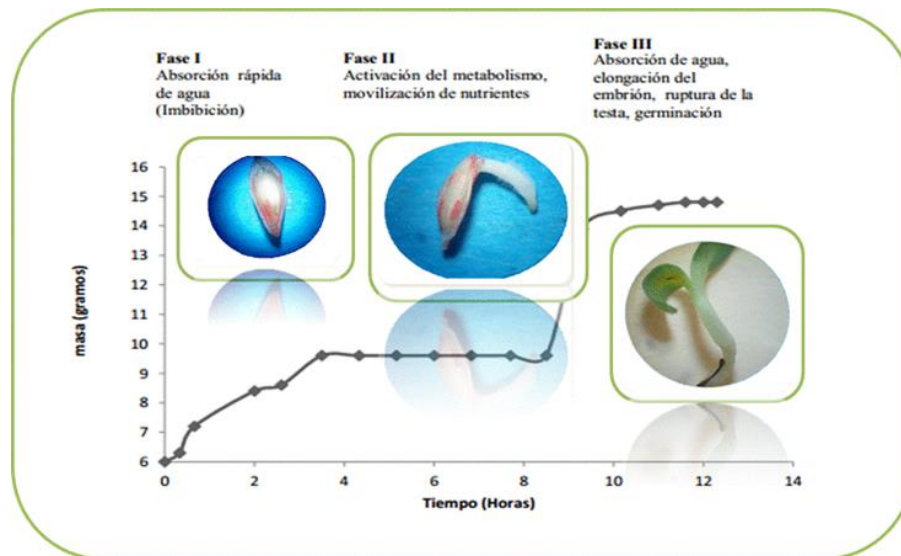


Figura 2. Fases del proceso de germinación en *Lactuca Sativa*. Fuente: Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Este bioensayo requiere una muestra de 400 semillas, sin embargo para los ensayos con NPs, NTC, y otros materiales se ha modificado y se establecen de 4 a 6 repeticiones de 25

semillas cada una. En esta prueba de germinación el sustrato (papel) provee la humedad que requiera la semilla durante el proceso de germinación. Es importante utilizar como sustrato un papel de alta calidad que permita un óptimo desarrollo de la germinación y que los resultados puedan ser reproducibles. El papel debe cumplir con las siguientes características (ISTA, 2004):

- El papel utilizado como sustrato no debe ser tóxico para las plántulas en desarrollo.
- Debe de absorber y suministrar humedad suficiente para que las semillas germinen.
- Debe ser lo suficientemente fuerte para que no se deshaga mientras se manipula, y no lo penetren las raíces de las plántulas en desarrollo.

Material y equipo

- Muestra de trabajo
- Tipo de sustrato
- Lápiz tinta para marcar
- Bolsas de polietileno
- Canasta para soporte de tacos
- Cámara bioclimática a 25°C, con 12 h oscuridad y 8 h luz, con ventiladores y una HR de 50 %.

Metodología de germinación entre papel

Este método es uno de los más adecuados para evaluar la germinación de semillas tratadas con NPs, NTC, grafito, grafeno u otros materiales. Las semillas se germinan entre dos bases de papel Anchor previamente humedecido con agua destilada, posteriormente las semillas se organizan en hilera a diferentes espacios dependiendo del tamaño de la semilla. Se respetan 6 cm del borde superior, dejando un espacio de 2-3 cm en los costados. Lo ideal es que la distribución de las semillas sea homogénea a lo largo del papel. Enseguida se cubren las semillas con otra hoja de papel Anchor humedecido con agua destilada, y se enrolla en forma de “taco”, al finalizar, los “tacos” son acomodados aleatoriamente dentro de una bolsa de polietileno que será colocada dentro de una bandeja de plástico profunda (cada “taco” se considerado como una unidad, la cual debe ser rotulada para identificarla al

momento de la evaluación). La Figura 3 muestra las etapas en la preparación de los “tacos” para la prueba de germinación.



Figura 3. Fases del proceso de siembra para prueba de germinación estándar en semilla de maíz. La bandeja de plástico se coloca en una cámara bioclimática a 25 C° con 50 % de humedad relativa, con 12 h de oscuridad y 8 h con luz.

Evaluación de la prueba de germinación estándar

Se realiza un primer conteo de plántulas que varía de acuerdo a la especie (4 días para maíz, melón, pepino), se evalúan las plántulas normales (plántulas con raíz y tallo, cada estructura con al menos dos veces el tamaño de la semilla en longitud), como un indicador de vigor de germinación de la semilla y el resultado se expresa en porcentaje. Es necesario realizar un conteo final de la germinación a los 7, 8 o 14 días, dependiendo de la especie, para determinar el porcentaje, contando las plántulas normales (PN), anormales (PA) y las semillas sin germinar (SSG) (Figura 4). Se determina también la longitud de plúmula (LP) y de la radícula o tallo (LR) en plántulas normales, estos datos se expresan en cm, y se consideran un indicador del vigor. Para finalizar, se toma el peso seco (PS) de todas las plántulas normales, las cuales son colocadas en bolsas de papel estraza con perforaciones, para someterlas a secado en una estufa Lab-Line modelo 3478M, con una duración de 24 h a 70°C. Las normas de la ISTA (2004) establecen procedimientos de germinación y periodos detallados para realizar los conteos de plántulas.

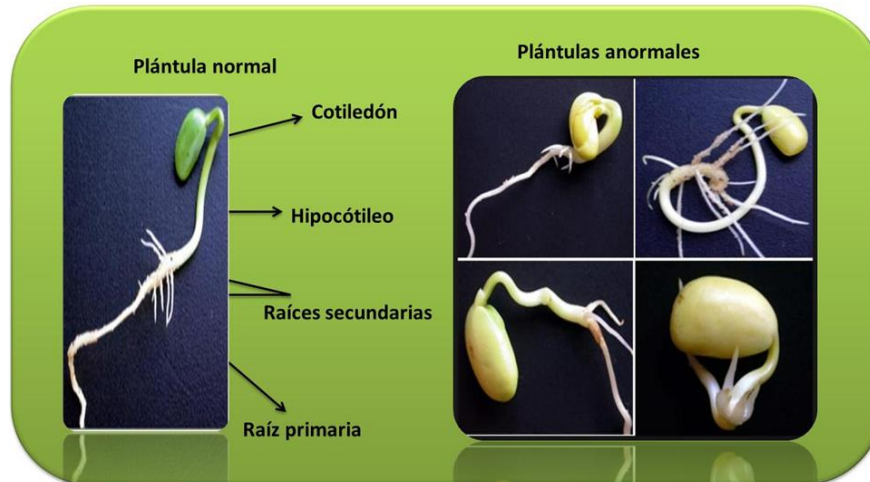


Figura 4. Anormalidades en plántula de soja. Fuente Grupo de Trabajo Tecnología de Semillas, EEA (Oliveros INTA).

Evaluación de plántulas

Las plántulas normales son aquellas que desarrollan todas sus estructuras esenciales en condiciones controladas (agua, luz y temperatura), que tienen la capacidad de generar plantas de buen porte.

- Sistema radicular bien desarrollado, raíz primaria y raíces seminales.
- Hipocótilo con buen desarrollo sin daños en el tejido.
- Plúmula con buen crecimiento, con hojas bien desarrolladas.
- Un cotiledón en monocotiledóneas y dos cotiledones en dicotiledóneas.

Las plántulas con los siguientes defectos de clasifican como anormales

- Raíz primaria dañada, sin desarrollo y/o emergencia, con poco vigor sin atravesar la testa de la semilla, con geotropismo negativo, sin raíces secundarias.
- Brote (hipocótilo, epicótilo, mesocótilo) sin desarrollo, ensanchado, torcido o sin emergencia.
- Cotiledones y hojas deformes, necróticas o dañadas por infecciones.

Cálculo y expresión de resultados

El resultado de la prueba de germinación se obtiene como el promedio de las 4 - 6 repeticiones de 25 semillas y se expresa como porcentaje de plántulas normales. El porcentaje de plántulas anormales y semillas sin germinar se calcula igual, debiendo sumar estas tres variables 100 por ciento.

Técnica para la evaluación de vigor en semillas

El vigor en las semillas es el potencial biológico de esta que favorece el establecimiento rápido y uniforme bajo condiciones, incluso desfavorables de campo (Gonzales *et al.*, 2008). La semilla presenta el mayor vigor y potencial germinativo cuando alcanza la madurez fisiológica.

Evaluación del crecimiento de plántulas

La prueba se basa en que las semillas vigorosas son capaces de sintetizar más eficientemente nuevos materiales nutritivos y transferir rápidamente estos nuevos productos al eje embrionario en crecimiento, resultando en acumulaciones de peso seco. Siendo la tasa de crecimiento el estándar que se relaciona con los procesos bioquímicos que intervienen en el vigor. Esto permite correlacionar la tasa de crecimiento con el desarrollo vegetativo en campo, lo que hace posible observar efectos de deterioro rápido, algunos períodos de almacenamiento y diferencias genéticas sobre el vigor (Copeland y McDonald, 1985).

Esta prueba consiste en sembrar cuatro repeticiones de 25 semillas por muestra previamente tratada con Nps o NTC, cada una sobre una toalla de papel Anchor, humedecida con 30 ml de agua destilada, acomodando las semillas en hilera a lo largo del papel (el embrión de la semilla se debe orientar hacia abajo), posteriormente se cubren con una toalla previamente humedecida, y se enrollan en formas de “taco” para ser colocados en una bolsa de polietileno que será colocada dentro de una bandeja de plástico profunda, las cuales se llevan a una cámara germinadora sin luz a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, la fecha de evaluación depende de la

especie. En los días que se determina realizar la evaluación, se efectúa el conteo de plántulas normales, anormales y semillas sin germinar.

En plántulas normales, se elimina la testa o cotiledones, para determinar el peso seco de todas las plántulas normales (PS), que tienen que ser colocadas dentro de bolsas de papel de estraza con perforaciones y se someten a un secado continuo dentro de una estufa Lab-Line modelo 3478M, por 24 h a 70 C° (AOSA, 1983). Una vez cumplido el tiempo, las bolsas se colocan en un desecador por 15 minutos, posteriormente se toma el peso de las plántulas en una balanza analítica (Precisa Instruments Ltd. / Switzerland) y el dato se reporta en miligramos por plántula (mg plántula⁻¹).



Figura 5. Evaluación del crecimiento de plántulas y acumulación de peso seco.

Índice de velocidad de emergencia y emergencia total de plántulas

Esta prueba se debe realizar bajo condiciones de invernadero utilizando arena de río previamente tratada con fungicida Tecto 60, para evitar la presencia de hongos. Posteriormente se siembran 100 semillas de cada lote, previamente tratadas con NPs, NTC,

grafito, grafeno o partículas de otros materiales, distribuyéndolas en 4 repeticiones de 25, a una profundidad de 2.5 cm con una distancia entre semillas de 1.5 cm.

Variables a evaluar

Índice de velocidad de emergencia (IVE): se obtiene a través del conteo diario de las plántulas emergidas a partir de la siembra, tomando como plántulas emergidas a las que sobresalgan del sustrato. El índice de velocidad de emergencia IVE se calcula mediante la expresión propuesta por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{N_i}$$

En donde:

IVE = índice de velocidad de emergencia; X_i = Número de plántulas emergidas por día; N_i = Número de días después de la siembra; n = Número de conteos 1, 2....., n conteos.

Al término del estudio se puede obtener el porcentaje total de emergencia (ET), el cual consiste en contabilizar cada una de las plántulas emergidas hasta el último día de la evaluación y el resultado se obtiene dividiendo el número total de plántulas emergidas, entre el número total de semillas sembradas y se multiplica por cien.

$$\% E = \frac{\text{No. plántulas emergidas en el ultimo conteo}}{\text{No. de semillas sembradas}} * 100$$

Para finalizar, se determina el peso seco de las plántulas, las raíces tienen que ser lavadas con agua de la llave para retirar el exceso de tierra, posteriormente son colocadas en bolsas de papel de estraza con perforaciones, sometiéndolas a un secado continuo dentro de una estufa Lab-Line, modelo 3478M en un periodo de 24 h a 70 C°. Una vez cumplido el tiempo, las bolsas se colocan en un desecador por 15 minutos, posteriormente se toma el

peso seco de las plántulas en una balanza analítica (Precisa Instruments Ltd. / Switzerland) y el dato se reporta en miligramos por plántula (mg plántula^{-1}).



Figura 5. Índice de Velocidad de emergencia y emergencia total en semilla de maíz

Conclusiones

La prueba de germinación estándar permite evaluar la respuesta de muestras de semillas a la aplicación de NPs, NTC, grafito, grafeno, y partículas de otros materiales. El ensayo de vigor en semillas considera parámetros que están asociados con la emergencia en campo y que determinan en gran medida la calidad de las semillas. Asimismo permite determinar el efecto de tratamientos a las semillas con NPs, NTC, grafito, grafeno, y partículas de otros materiales, en la respuesta del vigor de germinación y desarrollo de plántulas.

Literatura citada

- Association of Official Seed Analysts (AOSA). (1983). Seed vigor testing handbook. Contribution No. 32. U.S.A. 82 p.
- Contreras, S. (2002). The international seed industry. In: Proceedings International Seed Seminar: Trade, Production and Technology. Edts. M. pp. 1-9.
- Copeland, L. O. and M. B. McDonald. (1985). Principles of seed science and technology. 2nd. Ed. Burgess Publishing Company. U.S.A. p. 121-144.
- González, G., F. M. Mendoza, J. Covarrubias, N. Morán, y J.A. Acosta. (2008). Rendimiento y calidad de semilla de frijol en dos épocas de siembra en la región del bajo. Agricultura Técnica en México. 34(4):421-430.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2004). International Rules for Seed Testing. Zurich, Switzerland. 243 p.
- Khodakovskaya, M., M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe, and A.S. Biris. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth ACS Nano 3(10):3221-3227.
- Maguire, J.D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for Seedling Emergences and Vigor. Crop Science 2:176-177.
- McDonald, M. B. Assessment of seed quality. (1980). HortScience, Alexandria, v. 15, n. 6, p. 784-788.
- Méndez, J., L. Ysavit, y J. Merazo. (2007). Uso de agua caliente para evaluar la calidad de la semilla de maíz (*Zea mays* L.) Departamento de Agronomía. Escuela de Ingeniería Agronómica. Núcleo de Monagas. Universidad de Oriente, Campus los Guaritos. Maturín, Estado Mongas, Venezuela. 8 p.
- Velázquez, H. (2014). Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz JAGUAN. Tesis de Maestría Profesional, especialidad en Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 13 p.