


| | | |
|--|--------------|---------------------------------------|
|  Facultad de Ciencias UNER Agropecuarias | | Espacio curricular Fisiología Vegetal |
| PROTOCOLOS DEL BGO Y OTROS DEL PROYECTO ORQUÍDEAS | | |
| Titulo principal: BGO | Confeccionó: | Luz García y V. Lallana |
| Sub-titulo: 2. Ensayos de viabilidad | Revisó: | |
| Nº: 2.1. Análisis de viabilidad de semillas de orquídeas con la prueba topográfica por tetrazolio | Publicado | SI x NO WEB x |
| Año de creación: 2014 | Impreso | SI x NO |

Publicado en: Revista Análisis de Semillas, 7(28):75-78, 2014

PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS CON LA PRUEBA TOPOGRÁFICA POR TETRAZOLIO

Luz F. GARCIA^{1,2} y Víctor H. LALLANA²

¹Laboratorio de Semillas y ²Docentes-Investigadores Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNER. Ruta 11, Km 10,5 (3100) Oro Verde, Paraná. Entre Ríos.

Resumen

Debido a que en los trabajos sobre orquídeas, en general no se explicita la técnica operativa de la prueba de tetrazolio, el objetivo del presente es establecer un procedimiento operativo para determinar la viabilidad de semillas de orquídeas mediante tinción con tetrazolio. En este protocolo se detallan las necesidades tanto de infraestructura como de materiales, equipos y reactivos para llevar a cabo la prueba y una serie de recomendaciones acerca del manejo de las muestras y conservación las simientes en el tiempo.

Summary

Due to that in papers about orchids it isn't made clear the technique used on tetrazolium assays, the objective of this research is to establish an operative procedure to determine the viability of orchid sedes by tetrazolium staining. The requirements of infrastructure, materials, equipment and reagents necessary for testing, and the recommendations concerning the simple handling and the conservation of sedes, are listed in this protocol.

Marco de trabajo y objetivos

Dentro de los objetivos de un proyecto de investigación (Lallana y Billard, 2009) se ha propuesto la conservación y micropropagación de especies nativas de orquídeas de la zona del litoral y para ello se ha

procedido a la colecta de frutos y cosecha de semillas como primer paso para la construcción de un **banco de germoplasma (BGO)** de semillas e híbridos, que sirva como apoyo de base a los procesos de rescate y conservación por técnicas de cultivo “in vitro” de estas especies. Los bancos de semillas proveen un medio para preservar al máximo la diversidad genética en un espacio y costo mínimo (Seaton y Pritchard, 2003). La determinación periódica de la **viabilidad** de las semillas es un dato importante a evaluar para conocer el grado de conservación de las muestras y más aún teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las semillas y el desarrollo de un embrión inmaduro sin endosperma (Arditti y Ernst, 1993).

Uno de los métodos más usado para evaluar viabilidad es la Prueba Topográfica por tetrazolio (Tz). Las deshidrogenas, activas en tejidos vivos, reducen la parte cromófora de la sal cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio en un compuesto de color rojo / rosado e insoluble conocido como formazán, coloreando las semillas viables. (Singh, 1981; Craviotto et al, 2008). Si bien la prueba de Tz está documentada en las Reglas ISTA (2012), no existen referencias a semillas de orquídeas. Esta prueba ha sido ampliamente usada en semillas de orquídeas (Lauzer et al. 1994; Vujanovic et al. 2000) y experiencias previas (Lallana y García, 2010, 2012, 2013 y Dalzotto et al. 2013) han permitido poner a punto la prueba de Tz empleando distintas dosis y tiempos de exposición a la sal 2,3,5 Cloruro de trifenil tetrazolio. En función de ello y que en los trabajos sobre orquídeas en general no explicitan detalladamente la técnica operativa de la prueba de Tz se propuso como **objetivo** establecer un procedimiento operativo para determinar la viabilidad de semillas de orquídeas mediante tinción con tetrazolio. En este protocolo se detallan las necesidades tanto de infraestructura como de materiales, equipos y reactivos para llevar a cabo la prueba y una serie de recomendaciones acerca del manejo de las muestras y conservación las simientes en el tiempo.

Requisitos

El Laboratorio debe tener un área lo suficientemente amplia para la necesidad de los análisis que corresponden, sin exposición a corrientes de aire y con buena iluminación. Las instalaciones deberán evitar condiciones excesivas de temperatura, vapor o humedad que puedan afectar la manipulación de las semillas y afectar adversamente los resultados.

Se debe contar con:

- ° Lámpara de mesa.
- ° Cámara de frío de hasta 10 °C.
- ° Estufa de esterilización o secado con regulación de temperatura entre 20-40 °C.
- ° Lupa estereoscópica de 45 a 60 x.
- ° Pinzas.

- ° Bisturís.
- ° Agujas de disección.
- ° Contenedores (frascos de vidrio de 3 ml ó 5 ml) con tapón de goma.
- ° Baño termostático.
- ° Bandejas.
- ° Papel filtro liso.
- ° Agua destilada.
- ° Reactivo: Cloruro o Bromuro de 2,3,5-Trifenil Tetrazolio (Solución al 0, 1 % o 0,5 %).
- ° Cajas de Petri de vidrio (6 cm de diámetro).
- ° Grillas de acetato con cuadrícula impresa de 1 x 1 y 0,5 x 0,5 cm.
- ° Cámara fotográfica digital (16 MP), escáner de mesa de alta definición.
- ° Opcional: Microscopio digital de mano con conexión a puerto USB o lupa binocular con cámara digital incorporada.

Es importante que el analista posea conocimientos de morfología de semillas y experiencia en el análisis con Tz en semillas, es decir estar capacitado y entrenado en el análisis.

Recepción, identificación y manejo de la muestra

Normalmente se reciben frutos en distintos estados de madurez. Si el fruto está próximo a su dehiscencia (extremo distal amarillo) se procede a su cosecha cortando el extremo con bisturí y volcando las semillas sobre papel blanco, sacudiendo suavemente el fruto. Si el fruto no está maduro (color verde) se lo coloca en sobre de papel y se deja secar en cámara de germinación con luz a 20-30°C. Luego se cosechan las semillas y se guardan en frascos de vidrio con tapón de goma identificando la tapa y la base del recipiente con etiquetas autoadhesivas con el número de registro correspondiente, utilizando lápiz de grafito (Fig. 1). En el caso de frutos pequeños, las semillas se almacenan en cajas de plástico con tapa de 1 cm de diámetro por 1 cm de altura, debidamente rotuladas en la tapa y en la base (Fig. 1).

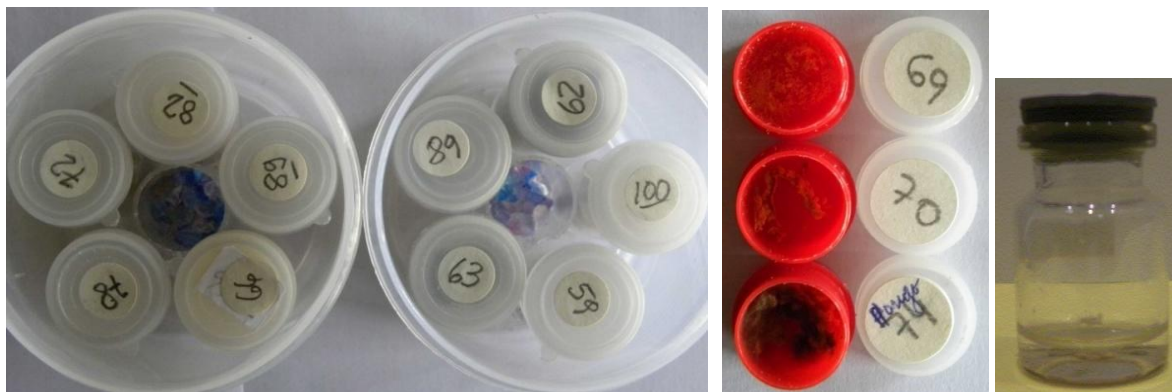


Figura 1. Envases utilizados para el almacenamiento de semillas de orquídeas, forma de rotulación y guarda de semillas en cajas de mayor tamaño con tapa y gel de sílica, para su almacenamiento en refrigerador.

Deben existir instalaciones para almacenar las muestras en condiciones de temperatura, humedad y limpieza, que permitan la integridad de las muestras. Con el objetivo de conservar las semillas en buenas condiciones de viabilidad, se colocan en frascos de vidrio o de plástico, con tapón, los que a su vez se acondicionan dentro de envases plásticos o de vidrio con cristales de gel de sílice, a fin de controlar el exceso de humedad (Fig. 1). Todo rotulado se mantendrá en refrigeración para su perfecta conservación.

En el manejo o manipulación de la muestra se debe tener mucho cuidado ya que las semillas son extremadamente pequeñas y cualquier descuido, golpe involuntario, corriente de aire o respiración fuerte próxima a la muestra puede provocar la pérdida de miles de semillas. Las semillas a simple vista tienen la apariencia de un polvo. Por ejemplo 1 mg de semillas de *Oncidium bifolium* Sims contiene aproximadamente 1.700 semillas muy pequeñas (Lallana et al., 2010).

Con el objeto de mantener la confiabilidad y objetividad en los análisis, las muestras deben ser identificadas con un número o código único dado por el Laboratorio al momento de su recepción. Este número, que será asignado por orden de entrada, identificará la muestra a través de todas las pruebas a las que sea sometida y a lo largo del tiempo. Las muestras deben recibir antes, durante y después de su análisis un manejo tal que permita mantener su integridad e identificación.

Se deberá tomar nota del origen (lugar de cosecha), identificar la persona que obtuvo la muestra, la fecha de recepción en el laboratorio y todo otro dato que se considere relevante: nombre de la especie, progenitores en caso de tratarse de un híbrido, etc. Por ejemplo, la base de datos del BGO del Proyecto de investigación contiene 27 descriptores (campos de información) por cada muestra.

Protocolo de la Prueba Topográfica por tetrazolio

- 1) Pesar 1 a 3 mg de semillas y colocarlas en un recipiente pequeño de vidrio con agua destilada durante 24 horas y a temperatura ambiente para lograr la imbibición.
- 2) Extraer con jeringa 1ml el agua en exceso del recipiente y agregar solución al 0,5 o 0,1 %, de 2,3,5 – Cloruro de trifetil tetrazolio, preparada y conservada según las Reglas ISTA (2012). Dejar 24 horas en baño termostático a 30-33 °C en oscuridad.

- 3) Extraer la solución de tetrazolio con jeringa de 1ml y agregar agua destilada para detener la reacción. Verter el contenido del vial a una caja de Petri de 6 cm de diámetro. En este proceso se podrá agregar agua destilada con el objeto de verter la totalidad de las semillas -aun adheridas al vial-. Realizar suaves movimientos circulares, para lograr una distribución más homogénea en la base de la caja de Petri.
- 4) Paso siguiente, se debe colocar un círculo de papel de filtro que cubra toda la base de la caja de Petri y soltarlo por los bordes. El papel queda adherido al fondo de la caja. Es recomendable quitar el exceso de agua. Para ello, se debe usar más papel secante doblado en pliegos y presionar suavemente, para que se absorba el exceso de agua (Fig. 2). Luego se tapa y se la invierte para efectuar el recuento.

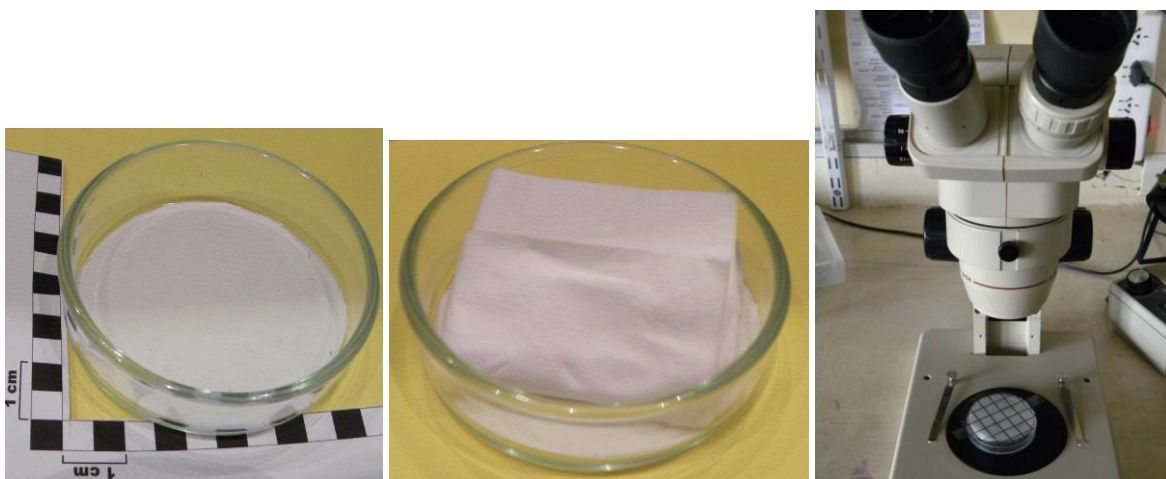


Figura 2. Detalle de la colocación del papel de filtro sobre la base y del papel extra para absorber el exceso de agua. A la derecha, caja de Petri invertida con la cuadrícula fijada lista para hacer los recuentos.

- 5) Para la evaluación de las semillas viables y no viables, se debe dar vuelta la caja, fijar la cuadrilla de acetato (1 x 1 cm o de 0,5 x 0,5 cm) diseñada al efecto, con cinta adhesiva (Fig. 2) y hacer los recuentos de semillas viables (teñidas de color rosado y/o rojo), no viables (sin teñir) y vanas (sin embrión) con lupa estereoscópica sobre cuadros elegidos al azar.
- 6) Tomar nota de las cantidades y asentarlas en planillas “ad hoc” a fin de realizar la expresión de resultados.
- 7) Registrar digitalmente (foto, escáner o microscopio digital) el estado de coloración de las semillas al finalizar los recuentos. Para este paso, también se han desarrollado protocolos específicos. Tomar al menos 5 registros digitales de cada muestra.

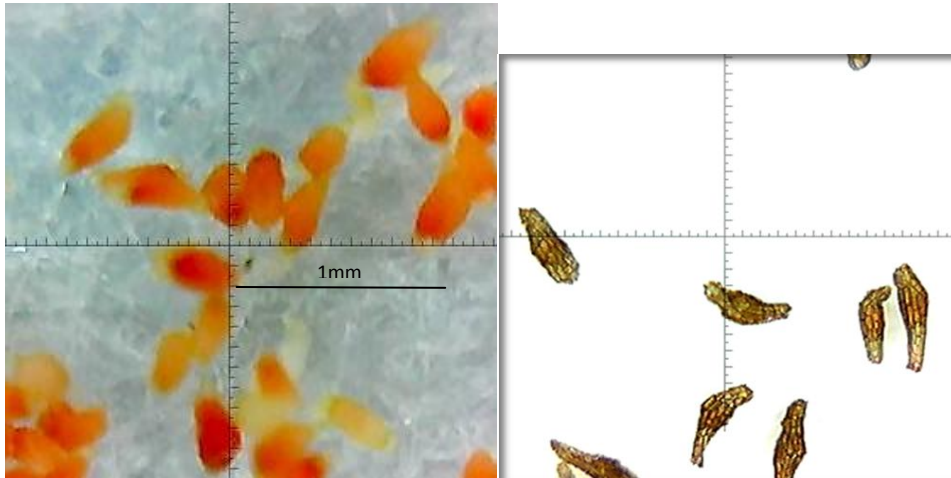


Figura 3. Ejemplos de imágenes obtenidas con un microscopio manual digital (Super Eyes) de semillas de orquídeas, la foto de la izquierda corresponde a semillas de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. con distintos grados de tinción al Tz. Se observan semillas vanas (color amarillo pálido traslucido, levemente teñidas) y semillas viables (rojo intenso), la foto de la derecha corresponde a *Chloraea membranacea* Lindl. orquídea terrestre común en pastizales de zonas húmedas de Entre Ríos.

Cálculo y Expresión de Resultados

1. Por cada muestra analizada contar al menos en 5 cuadros de 1cm de lado, las semillas viables y no viables (en caso usar una cuadrícula de 0,5 x 0,5 cm, contar 10 cuadros). Sobre el total de semillas por cuadro establecer la Proporción o porcentaje de semillas viables = $\frac{\text{Número de semillas viables}}{\text{Total de semillas (viables + no viables)}} * 100$.
2. Es recomendable registrar el número de las semillas vanas y expresar su presencia en cantidades y porcentajes.

$$\% \text{ Semillas Vanas} = \frac{\text{número de semillas vanas}}{\text{número total de semillas (vanas + no viables + vanas)}} * 100$$
3. Expresar el resultado final como porcentaje promedio de semillas viables, no viables y vanas.

Los resultados se expresan en una ficha de análisis o en bien en un informe, donde se deberá detallar:

- Identificación de la muestra analizada con su nombre científico y su número de identificación interna dada en el laboratorio.
- Fecha de realización del análisis.
- Tiempo de almacenamiento de la muestra en días (Fecha de análisis – Fecha de cosecha o de ingreso al BGO).

- Tipo de pretratamiento usado (imbibición en agua, desinfección, etc.)
- Fecha y hora de inicio y término del pretratamiento.
- Concentración de la solución de Tz usada.
- Fecha y hora de inicio y término de exposición al Tz.
- Temperaturas utilizadas (pretratamiento y Tz).
- Indicar el tipo de registro digital que se efectuó, y lugar y denominación de la carpeta de archivo.

El informe deberá, además, contener un ítem de **Observaciones del análisis** donde el analista consignará todo dato de relevancia, como las condiciones en que se realizó, dificultades, morfología de las semillas y la flotabilidad de las mismas al momento de realizar la observación (48 h), entre otras.

Firma del Analista Evaluador

Firma del Responsable Técnico del Laboratorio.

Fecha de confección del informe.

Agradecimientos

A la Dra. Adriana R. Salinas, docente investigadora de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, por la revisión del manuscrito y sus aportes que ayudaron a la mejor comprensión del texto.

Bibliografía citada

- ARDITTI, J. y ERNST, R. (1993). Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.
- CRAVIOTTO, R.M.; ARANGO PEREARNAU, M.R.; GALLO, C. (2008). Prueba Topográfica por Tetrazolio en Soja. Análisis de Semillas. Suplemento Especial. N°1. 96p.
- DALZOTTO, C.A.; GARCÍA, L.F. y LALLANA, V.H. (2013). Efecto del pretratamiento con hipoclorito de sodio en la prueba de viabilidad de semillas de *Oncidium bifolium* Sims. I Congreso Brasileño de Producción de Orquídeas. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido. p. 42-44. Edición CD-ROM.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. (2012). International Rules for Seed Testing. Basserdorf, Switzerland 362p.
- LALLANA, V.H.; BILLARD, C.E. (2009). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “in vitro”. PID-UNER 2144. 31 pp. Proyecto de Investigación y Desarrollo-UNER. Aprobado por Res. C.S. n° 109/10 (19/08/10).

LALLANA, V.H. y GARCÍA, L.F. (2010). Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas. 75° Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral. Santa Fe, 23 de junio de 2010. Resúmenes, Pág. 8

LALLANA, V.H. y GARCIA, L.F. (2012). Conservación de semillas de orquídeas y estudio de su viabilidad en el tiempo. Revista Análisis de Semillas, 6 (23): 58-61.

LALLANA, V.H. y GARCÍA, F.L. (2013). Efecto de pre_tratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). Revista de Investigaciones Agrícolas, UNA. Investig. Agr. 15(2):129-132.

LALLANA, V.H.; BILLARD, C.E. y KLUG, L.M. (2010). Germinación y desarrollo de plántulas “in vitro” de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae). Libro de resúmenes, pp. 272-274. En: V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Comp. por Claudia Gallardo y Elena Gagliano. 1ra. Ed. – Paraná: Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER. 354 pp.

LAUZER, D.; M. ST-ARNAUT y D. BARABÉ. (1994). Tetrazolium staining and In vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana 9:197-204.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. (2003). Orchid germplasm collection, storage and exchange. In: Orchid conservation (ed. K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, and P. J. Cribb), p. 227-258. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

SINGH, F. (1981). Differential staining of orchid seeds for viability testing. American Orchid Society Bulletin 50:416-418.

VUJANOVIC, V.; ST-ARNAUT, D. BARABÉ ; G. THIBEAULT (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colorations and germination. Ann. Bot. 86:79-86.

Otros documentos relacionados

SEATON, P.; MARKS, T.; PERNER, H.; JIJON, C.; PRITCHARD, H. (2009). Orchid seed banking takes off (p. 173-183). In: Pridgeon A M, Suarez JP (Eds.) Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

Cómo citar este documento:

García, Luz F. y Víctor H. Lallana (2014). Protocolo para el análisis de viabilidad de semillas de orquídeas con la prueba topográfica por tetrazolio. Revista Análisis de Semillas 7 (28):75-78. ISSN 1851-1678