



**ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL  
TETRAZOLIO**

**Código:** PRO-DLSyCV-514  
**Emisor:** DGT-DL-DLSyCV  
**Versión:** 01  
**Vigente:** 17/05/2023  
**Página:** 1 de 6

**ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO**

<b>MODIFICADO POR</b>	<b>VERIFICADO POR</b>	<b>APROBADO POR</b>
<b>Nombre y Apellido:</b> Blanca Coronel Belén Ramírez	<b>Nombre y Apellido:</b> Jadiyi Torales	<b>Nombre y Apellido:</b> César Rivas
<b>Cargo:</b> Jefa del DLSyCV Técnico del DLSyCV	<b>Cargo:</b> Directora de Laboratorio	<b>Cargo:</b> Director General Técnico
<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 
<b>Fecha:</b> 11/05/2023	<b>Fecha:</b> 12/05/2023	<b>Fecha:</b> 17/05/2023



## ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO

**Código:** PRO-DLSyCV-514  
**Emisor:** DGT-DL-DLSyCV  
**Versión:** 01  
**Vigente:** 17/05/2023  
**Página:** 2 de 6

### 1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es describir los pasos que deberá seguir el analista para realizar el análisis de viabilidad al Tetrazolio en forma adecuada y uniforme para las especies sobre las cuales el DLSyCV tiene competencia, a fin de proporcionar resultados confiables.

### 2. ALCANCE

Abarca desde la recepción de la muestra de trabajo junto con el Boletín Interno, hasta la entrega del mismo con los resultados obtenidos para el llenado del certificado de análisis de semillas.

### 3. SIGLAS Y DEFINICIONES

#### 3.1 Siglas:

- 3.1.1 **BI:** FOR-DLSyCV-537 Boletín interno de análisis de viabilidad y vigor.
- 3.1.2 **CAS:** Certificado de análisis de semillas.
- 3.1.3 **DLSyCV:** Departamento de Laboratorio de semillas y Calidad Vegetal.
- 3.1.4 **ISTA:** International Seed Testing Association.
- 3.1.5 **JDLSyCV:** Jefe del Departamento de Laboratorio de semillas y Calidad Vegetal.
- 3.1.6 **TDLSyCV:** Técnico del Departamento de Laboratorio de semillas y Calidad Vegetal.
- 3.1.7 **Tz:** Sal de tetrazolio.

#### 3.2 Definiciones:

- 3.2.1 **Cotiledón:** forman parte del embrión, primera hoja (no foliar) o par de hojas del embrión y plántula. Su función es la de mantener la plántula al principio de su vida, suministrándole los elementos nutritivos almacenados o fotosintetizados por ellos.
- 3.2.2 **Embrión:** planta inicial contenida en una semilla, normalmente consistente en un eje, más o menos diferenciados y con el (los) cotiledón (es) unido (s).
- 3.2.3 **Endospermo:** tejido nutritivo que se origina en la fertilización y es retenido en la maduración en algunas semillas como tejido de almacenamiento de sustancias de reservas.
- 3.2.4 **Tratamiento:** modo de trabajar ciertas materias para su transformación.
- 3.2.5 **Semillas Frescas:** semillas que no germinaron durante el análisis, pero que se mantienen firmes y tienen potencial de desarrollarse en plantas normales.
- 3.2.6 **Semillas duras:** semillas que al final del periodo del análisis permanecen duras porque no absorbieron agua.
- 3.2.7 **Solución de Tetrazolio:** solución acuosa de cloruro o bromuro de 2, 3,5-trifenil tetrazolio con pH 6,5 – 7,5.
- 3.2.8 **Viabilidad:** Capacidad inherente de una semilla para germinar y producir una plántula normal. Capacidad potencial de un lote de semillas para germinar.
- 3.2.9 **Ensayo Topográfico con tetrazolio:** es una prueba bioquímica usada para hacer una rápida estimación de la viabilidad de las semillas.
- 3.2.10 **Dormencia- Latencia de semillas:** incapacidad de una semilla intacta y viable de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuados para la germinación (Condiciones favorables).
- 3.2.11 **Semilla viable:** es aquella que se presentan teñida de rojo todos los tejidos necesarios para el desarrollo de una plántula normal.



## ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO

Código: PRO-DLSyCV-514  
Emisor: DGT-DL-DLSyCV  
Versión: 01  
Vigente: 17/05/2023  
Página: 3 de 6

**3.2.12 Semilla no viable:** es aquella que presenta deficiencia y/o anomalías de tal naturaleza que impiden que se desarrolle una plántula normal.

### 4. RESPONSABLE

Son responsables de la aplicación de este procedimiento los TDLSyCV designados para realizar este análisis y el JDLSyCV de hacerlo cumplir.

### 5. ACTIVIDADES

#### 5.1 Llenado de Boletín Interno

Para el llenado del BI, el TDLSyCV deberá tener en cuenta:

- Los datos deberán ser registrados con letra legible y con tinta indeleble, evitando borrones.
- En el caso de errores, se debe tachar cada error sin borrarlo, ni hacerlo ilegible y el dato correcto se coloca al lado, si el espacio lo permite o se aclara en otro lugar. Todas las alteraciones de los registros deben llevar la firma del responsable de la corrección.
- Ningún campo debe quedar en blanco, los campos que no contienen datos deben ser cerrados con una línea.

#### 5.2 Preparación de solución de tetrazolio

Para preparar la solución de reserva o madre al 1,0 %, se debe proceder a mezclar 10,0 gramos de la sal de tetrazolio en 1,0 litro de agua destilada.

La solución de tetrazolio deberá tener un pH entre 6,5 a 7,5 de no ser así debe ser necesaria la preparación de una solución buffer (ver 5.3)

**Nota 1:** A fin de asegurar que el pH de la solución de tetrazolio se encuentre en rango (6,5 a 7,5) se puede medir previamente el pH del agua destilada a ser utilizada.

**Nota 2:** Esta solución debe ser almacenada en un frasco de vidrio de color ámbar, en lugar oscuro y fresco en heladera entre 5 y 10°C y puede ser almacenada hasta por un año. El frasco a ser utilizado debe estar identificado, utilizando el FOR-DLSyCV-033 Etiqueta de Identificación de Solución de Trabajo.

**Nota 3:** Se podrá trabajar con una solución de tetrazolio en una concentración menor al 1%. Para el caso de solución al 0,5% se debe medir 500 ml de solución de reserva o madre de la solución de tetrazolio al 1,0% y completar con 500 ml de agua para obtener 1 litro de esta solución.

#### 5.3 Preparación de solución Buffer o Tampón

Para obtener el rango correcto de pH, deberá proceder a preparar la solución buffer, preparando:

- Solución 1: disolver 9,078 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1.000 ml de agua destilada.
- Solución 2: disolver 9.472 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1.000 ml de agua destilada o disolver 11,876 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  por  $2\text{H}_2\text{O}$  en 1.000 ml de agua destilada.

Mezclar dos partes de la Solución 1 con tres partes de la Solución 2 y controlar el pH, el cual debe estar entre 6,5 a 7,5.

#### 5.4 Análisis de viabilidad al tetrazolio

El TDLSyCV recepcionará la muestra de semillas a ser analizada junto con el BI.

Verificará en la Regla ISTA Tabla 6A Parte 1 y 2: Detalles del método de análisis de viabilidad al tetrazolio.



## ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO

Código: PRO-DLSyCV-514  
Emisor: DGT-DL-DLSyCV  
Versión: 01  
Vigente: 19/05/2023  
Página: 4 de 6

**Nota 4:** El ensayo puede ser realizado también sobre semillas individuales que permanezcan latentes/no germinadas, finalizado el ensayo de germinación.

### 5.4.1 Preparación y tratamiento de la semilla

Las semillas deben ser humedecidas previamente, el periodo mínimo de humedecimiento es indicado según lo indicado en el Cap.6 Tabla 6A Parte 1 y 2, Columna 2 de la Regla ISTA para cada especie y pueden ser:

- a- Humedecimiento lento: Se embebe la semilla dejándola sobre o entre papel de acuerdo con el método usado para el análisis de germinación.
- b- Humedecimiento directo en agua: las semillas deben ser sumergidas completamente en agua y dejadas hasta que estén completamente embebidas. Si el periodo de imbibición supera las 24 horas, el agua debería cambiarse.

**Nota 5:** El humedecimiento directo en agua debe realizarse a una temperatura de 20°C.

### 5.5.2 Exposición de los tejidos antes del teñido

La manera de conseguir que los tejidos se tiñan está indicada en el Capítulo 6 Tabla 6A Parte 1 y 2, Columna 3 de la Regla ISTA para cada especie y pueden ser:

- a- Perforación de la semilla:  
Las semillas con humedecimiento previo o duras deberán ser perforadas en una parte no esencial de la semilla usando una aguja o un bisturí afilado.
- b- Corte longitudinal:
  - Por el medio del eje embrionario y aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes de la longitud del endospermo (en semillas de cereales y pasturas del tamaño de *Festuca* spp., o más grandes);
  - Por el medio de la mitad distal de las dicotiledóneas, dejando el eje embrionario sin cortar (semillas de dicotiledóneas sin endosperma y con un embrión recto: *Lactuca* spp., y otras *Asteraceae*);
  - Corte longitudinal a lo largo del embrión en semillas donde hay un embrión rodeado por tejido vivo (Fam. Apiaceae y coníferas).
- c- Corte transversal:
  - Corte cerca del embrión (eliminando glumelas): *Phalaris* spp, *Elytrigia* spp
  - Corte y descarte de un fragmento cuyo tamaño sea de un tercio a un quinto del extremo distal de los cotiledones (semillas de dicotiledóneas con un embrión recto y sin endosperma).
  - Corte transversal en ambos extremos de la semilla abriendo la cavidad seminal sin dañar al embrión (semillas en coníferas).
- d- Incisión transversal: método para semillas pequeñas de pasturas del tamaño de *Agrostis*, *Phleum* y *Poa*.
- e- Extracción del embrión: Teñir el embrión con el endosperma encima del escutelo desprendido del endosperma (*Hordeum*, *Secale*, *Triticum*).
- f- Eliminación de la cubierta seminal:
  - Tegumentos impermeables (*Helianthus* spp.)
  - Carozos con paredes duras (*Prunus* spp), romper los carozos, embeber las semillas 18 horas a 20°C, eliminar las cubiertas seminales.



## ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO

Código: PRO-DLSyCV-514  
Emisor: DGT-DL-DLSyCV  
Versión: 01  
Vigente: 17/05/2023  
Página: 5 de 6

### 5.5.3 Tinción

En la Tabla 6A Parte 1 y 2, Columna 4 y 5 del Capítulo 6 de la Regla ISTA se establece la concentración de la solución de tinción y los tiempos óptimos de tinción para cada especie.

**Nota 6:** Las temperaturas de tinción utilizadas pueden desviarse de las dadas en la Tabla 6A del capítulo 6 de las Reglas ISTA, pero deben estar dentro del rango de 20 - 40 °C. Si no se usa la temperatura de tinción óptima de 30 °C, entonces se deben hacer los ajustes adecuados en la duración de la tinción sabiendo que un aumento/disminución de 5 °C en la óptima de 30 °C reduce/aumenta el tiempo de tinción a la mitad.

**Nota 7:** Se debe cubrir completamente las semillas con la solución de tetrazolio y dejarlas en oscuridad para que no haya reducción de la sal de tetrazolio.

### 5.5.4 Evaluación

Se debe evaluar los tejidos seminales que ocasionan la emergencia y desarrollo de una plántula normal usando patrones de tinción y viendo la tonalidad de los mismos de acuerdo a la especie siguiendo las recomendaciones de la Tabla 6 A Parte 1 y 2, Columna 7 del Capítulo 6 de la Regla ISTA.

Las semillas son separadas en semillas viables y no viables.

**Nota 8:** Durante todos los procesos de análisis de viabilidad al tetrazolio es obligatorio para el analista utilizar equipos de protección (tapabocas, guárdapolvos y guantes de látex).

### 5.5 Calcúlo y expresión de resultados

Calcular el porcentaje promedio de semillas viables de las repeticiones redondeado al número entero más próximo y registrar los datos obtenidos en el BI.

**Nota 9:** El resultado será correcto si la diferencia entre la repetición más alta y más baja no excede la tolerancia presentada en la Tabla 6B del Capítulo 6 de la Regla ISTA.

Una vez finalizado el análisis y llenado el BI, el TDL SyCV deberá hacer entrega del BI al responsable para el llenado del CAS y dejará constancia de la fecha de entrega en el mismo.

## 6. CONTROL DE CAMBIOS

Ítem	Página	Cambios
NA	1	Proviene de un Sistema de Gestión de Calidad basado en la Norma NP-ISO/IEC 17025:2018. La DL adopta el SGCI del SENAVE en cumplimiento de la Resolución SENAVE N° 230/2023 "Control de documentos", versión 05.

## 7. REFERENCIAS

- 7.1 Capítulo 6: Análisis bioquímico para viabilidad: el análisis topográfico de tetrazolio, Reglas ISTA vigente.
- 7.2 Manual de ensayos al tetrazolio. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de vivero. Ministerio de Agricultura de España. 1986.
- 7.3 ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing Volume – Internacional Seed Testing Association (ISTA). 2011.
- 7.4 Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de vivero. Ministerio de Agricultura de España. 1980.



## ANÁLISIS DE VIABILIDAD AL TETRAZOLIO

Código: PRO-DLSyCV-514  
Emisor: DGT-DL-DLSyCV  
Versión: 01  
Vigente: 17/05/2023  
Página: 6 de 6

7.5 Resolución SENAVE N°230/2023 "Por la cual se actualiza el procedimiento para control de documentos, para la elaboración, verificación, aprobación y autorización de documentos relacionados al ámbito del sistema de gestión de calidad del Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas y se abroga la Resolución SENAVE N°042/23 de fecha 30 de enero del 2023.

### 8. DOCUMENTOS

Nombre del Registro	Formulario	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición final
Etiqueta de Identificación de Solución de Trabajo.	FOR-DLSyCV-527	DLSyCV	JDLSyCV	1 año	Eliminación
Boletín interno de análisis de viabilidad y vigor.	FOR-DLSyCV-537	DLSyCV	JDLSyCV	5 años	Eliminación

### 9. ANEXOS

#### 9.1 Flujograma del proceso de análisis de viabilidad al tetrazolio

