

Guía de Estudio

GERMINACIÓN DE SEMILLAS
Cátedra de Fisiología Vegetal

FaCENA

Departamento: Biología.

Área: Botánica.

*Carreras: Profesorado y Licenciatura en
Biología.*

-UNNE-



Azul C. Courtis
2013

Corrección: Ing Agr. Maria A. Marasssi
Profesor adjunto A/C Fisiología vegetal

DESARROLLO DE LA SEMILLA

La SEMILLA es el óvulo fecundado, transformado y maduro. Constituye el órgano de dispersión y perpetuación de las angiospermas y representa la culminación de la evolución reproductiva de las plantas. Ésta se forma mediante la *embriogénesis cigótica*, que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y la maduración del embrión.

En las plantas con flores la fecundación es doble: de los gametos masculinos del grano de polen, uno fecunda el gameto femenino, célula huevo u ovocélula, formando el cigoto, y el otro gameto se une a los núcleos polares, formando el endosperma. (Fig. 1).

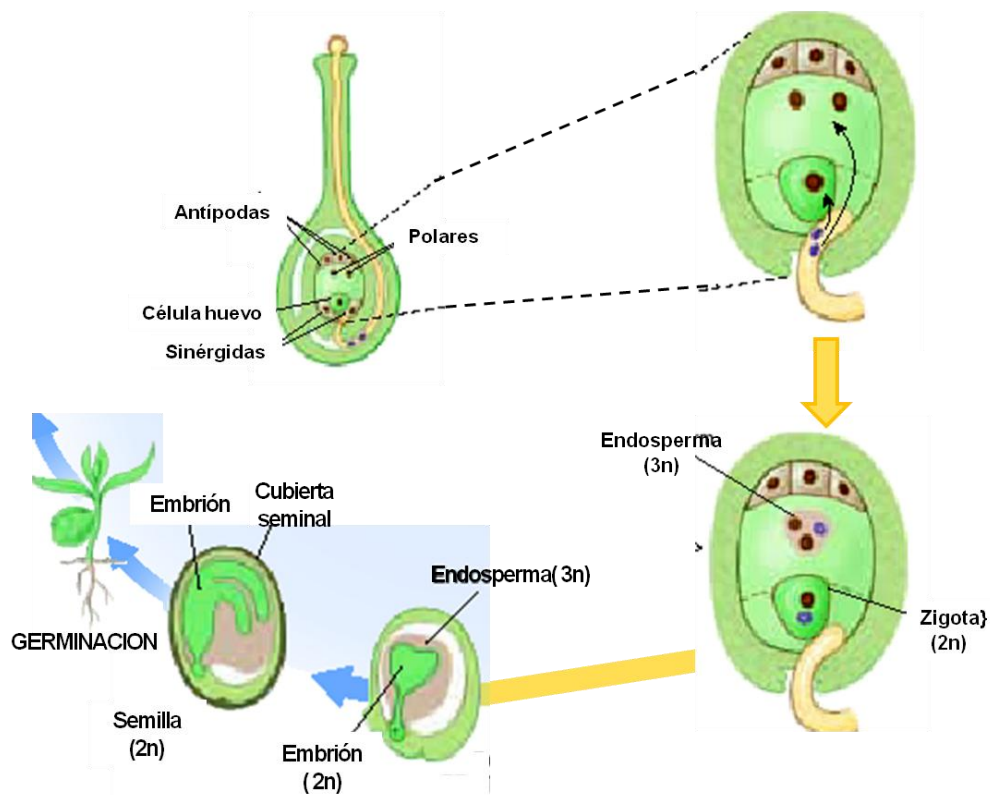


Fig. 1: Estructura del ovulo de una flor, fases de formación de una semilla y sus componentes en Angiospermas. (Modificado de Raven 2007 Introducción a la biología).

Las semillas estarán formadas por tres estructuras: un embrión, una cubierta seminal (que deriva de los tegumentos del óvulo) y una reserva alimenticia esto hace que la composición genética sea compleja: el embrión (1:1 masc.: fem.), endosperma (1:2 masc.: fem.) y los tejidos maternos (0:2 masc: fem). Este balance entre genotipos de los diferentes tejidos debe establecerse para el normal desarrollo de la semilla.

El cigoto sufre una serie de divisiones celulares que llevarán a la formación del embrión. El embrión se alinea en el eje chalaza-micrópila de las semillas, que se cree que es lo que determina los rasgos de polaridad en su desarrollo. Tras la fecundación, y una vez que ha crecido en forma unidireccional, el cigoto se divide transversalmente de forma asimétrica, originándose una célula pequeña (*célula apical*) que tras sucesivas divisiones dará origen al *embrión*; y otra célula largada (*célula basal*) que originará el *suspensor*, una estructura que actúa permitiendo el traslado de nutrientes desde el tejido materno hacia el embrión. Al comenzar la desecación de la semilla el suspensor degenera, y desaparece la conexión con la planta madre. La función del suspensor la adoptan entonces, los tejidos de reserva (*endosperma* y *cotiledones*).

El embrión se desarrolla como resultado de una serie de pasos y divisiones celulares en planos definidos pasando por una serie de estadios reconocibles y conocidos como globular, corazón y torpedo debido a sus formas.

A medida que el embrión se va desarrollando los cotiledones se expanden y varios cambios fisiológicos se van produciendo de manera de permitir al embrión ingresar al estado de dormancia y adquirir tolerancia a la desecación. El desarrollo de los cotiledones con el embrión varía marcadamente entre especies. Una de las diferencias más obvias es que los embriones de monocotiledoneas desarrollan solo un cotiledón (el escutelo *Poaceas*) mientras que aquellos de las eudicotiledóneas típicamente contienen dos. El embrión en desarrollo es alimentado por el endosperma que lo circunda. El endosperma persiste en la semilla madura rodeado de la capa de aleurona, mientras que los cotiledones permanecen relativamente pequeños (en *Poaceas* incluyendo maíz y otros cereales) o puede ser enteramente absorbido por los cotiledones (por ej. en poroto *Phaseolus vulgaris* o arveja *Pisum sativum*) por lo que la mayoría de la semilla queda ocupada por los cotiledones como es el caso común en *Eudicotiledoneas*. Generalmente los cotiledones o el endosperma actúan como reserva de carbohidratos, lípidos y proteínas que darán la energía para el desarrollo de la plántula durante la germinación. En algunas especies otras partes del embrión sirven también como reservorios.

Las semillas en desarrollo (y los fruto) son destinos muy fuertes de carbohidratos que son llevados como sacarosa vía floema. Las enzimas sucrolíticas (invertasas) y /o sacarosa sintasa metabolizan la sacarosa formando y manteniendo un gradiente de concentración en el tejido en crecimiento.

Hay una gran diversidad de proteínas, carbohidratos y lípidos en las semillas. Las semillas que almacenan almidón son de importancia agronómica incluyendo monocotiledoneas (maíz, arroz, trigo) y dicotiledóneas como poroto arveja. En contraste otras semillas de interés económico como el sésamo, y la canola almacenan lípidos. En muchas de las semillas una alta proporción de peso seco son sustancias proteicas (hasta del 40% en soja).

El almidón se almacena en los amiloplastos, ya sea en el endosperma (*Poaceas* o poroto) o en los cotiledones. La síntesis se produce en el interior de los amiloplastos donde se sintetiza ADP glucosa. Este es el sustrato para la almidón sintasa la cual cataliza la síntesis de amilosa.

Los ácidos grasos, precursores del aceite también son sintetizados en los plástidos donde unidades de dos átomos de carbono se van uniendo secuencialmente a un carrier de acetyl hasta construir cadenas de ácidos grasos saturados. La síntesis de los aceites se produce en el retículo endoplasmático (RE) en el citoplasma. Cuando los lípidos de reserva se formaron se acumulan en cuerpos lipídicos que se liberan del RE.

Las semillas también contienen cantidades variables de proteína, pueden ser proteínas estructurales y metabólicas, vitales para las funciones celulares pero además contienen proteínas de reserva que sirven como fuente de nutrientes (especialmente N y S) y a veces como protectoras. Las proteínas de reserva, que representan un 50% del total de proteínas de la semilla, se encuentran en cuerpos proteicos de membrana simple, derivados de la deposición de proteínas en pequeñas vacuolas o mas raramente en el RE. Los tres tipos principales de proteínas de reserva fueron identificados, inicialmente por sus solubilidades y actualmente por comparación de las secuencias de ADN de los genes que las codifican son: **albúminas** solubles en agua, **globulinas** solubles en soluciones salinas diluidas y **prolaminas** solubles en alcohol.

Tras la fecundación el desarrollo de la semilla se ha dividido en tres fases: histodiferenciación, expansión, maduración y desecación:

Fase de histodiferenciación

La **fase de histodiferenciación**, también denominada período embriogénico temprano o inicial,

Esta fase de crecimiento está asociada con altas concentraciones de reguladores de crecimiento tales como auxinas, citocininas y giberelinas. La división celular en el embrión cesa, en forma general, cuando alcanza el estado de corazón, cuando las estructuras esenciales se han formado, y el crecimiento posterior es principalmente debido a una expansión celular y acumulación de sustancias de reserva. Generalmente, la invertasa ácida está relacionada con las fases iniciales del desarrollo. La cubierta seminal en fase de histodiferenciación determina, vía invertasa ácida, la concentración y la composición de azúcares en la vacuola del endospermo y afecta el desarrollo del embrión.

Fase de expansión

Durante la **fase de expansión**, el crecimiento por división celular desaparece y es sustituido por un crecimiento debido mayormente a la elongación celular. Existe un contenido elevado de *auxinas* en su forma libre y conjugada. y de *giberelinas* libres y conjugadas, las *citocininas* tienden a desaparecer y no se detecta todavía *ácido abscísico*.

Durante esta fase también se produce la acumulación de sustancias de reserva de las semillas. La embriogénesis lleva a la aparición de tejidos muy bien organizados para desempeñar funciones muy concretas en la semilla. Como por ejemplo, la síntesis coordinada y acumulación de proteínas, lípidos e hidratos de carbono en diferentes períodos de la embriogénesis y en diversos órganos de la semilla (cotiledones y endosperma). El crecimiento del cotiledón comprende dos fases de desarrollo celular: en la primera el

crecimiento de se produce fundamentalmente por mitosis (aumento en el número de células); en la segunda, predomina la expansión celular (aumento de volumen). En cambio, el patrón de desarrollo del endospermo comprende de: a) divisiones nucleares en la célula madre del endospermo en ausencia de síntesis de paredes celulares; b) vacuolización próxima a estos núcleos; c) aparición de células individualizadas una vez producida la síntesis de la pared celular; d) expansión celular para que se depositen en la región central del endospermo las sustancias de reserva (almidón y proteínas principalmente); y e) formación y diferenciación de las capas aleuronares.

Las gimnospermas acumulan fundamentalmente lípidos y proteínas, que almacenan en las principales partes del megagametofito (haploide) y del embrión (diploide) en desarrollo. En cambio, las semillas de angiospermas acumulan sustancias de reserva en *cuerpos proteicos* (vacuolas especializadas formadas por el retículo endoplasmático), *cuerpos lipídicos* y *amiloplastos*.

Las *proteínas* de las semillas se han clasificado en tres grupos según su función fisiológica: enzimas, en su mayor parte implicadas en la movilización de las reservas; proteínas de reserva, las cuales son utilizadas para alimentar a la plántula antes que se convierta en un organismo autótrofo; y proteínas estructurales.

Los *hidratos de carbono* de la semilla proceden de la actividad fotosintética que tiene lugar después de la antesis, y mayoritariamente son importados vía floema desde las hojas mediante un típico proceso de descarga de fotoasimilados. Sin embargo, no hay conexiones vasculares entre la parte vegetativa de la planta y los órganos de reserva de la semilla; si acaso acceden a la parte externa de la semilla (cubierta seminal). Por consiguiente, los fotoasimilados deben ser descargados en el apoplasto, que está en contacto con la cubierta seminal, y posteriormente enviados al órgano de reserva.

En las semillas los *lípidos* son almacenados en los cuerpos lipídicos, cuya membrana es una monocapa lipídica con la cabeza polar dirigida hacia el citoplasma.

Fase de maduración y desecación

Al iniciarse esta fase el suspensor degenera, y desaparece la conexión con la planta madre. La función del suspensor la adoptan entonces, los tejidos de reserva (*endosperma* y *cotiledones*).

Esta última fase en el desarrollo de la semilla implica un periodo de **maduración y desecación** en presencia de niveles elevados de *ácido abscísico* (*ABA*). Al inicio de la maduración se estimula la detención del ciclo celular. Durante este periodo se detecta la presencia de niveles elevados de *ABA-libre*, un descenso del peso fresco de la semilla debido a una notable pérdida de agua, la tolerancia a la desecación, y la ausencia de alteraciones en el peso seco. El *ABA* es el responsable de que, en la planta madre, la semilla no pase directamente de la embriogénesis a la germinación y, por lo tanto, de que adquiera y mantenga la *dormición primaria*. Además también es el responsable de la morfogénesis del embrión y de la tolerancia a la desecación por su implicación en la síntesis de proteínas LEA y otras proteínas relacionadas con el estrés.

En el periodo de maduración no se detectan *citocininas*, *AIA* ni *GAs* en sus formas libres, sí aparecen en cambio, sus formas conjugadas, que en algunos casos pueden convertirse en sus formas libres en el proceso de germinación mediante la hidrólisis de los correspondientes conjugados.

Las etapas finales del desarrollo seminal se caracterizan por la inhibición de gran número de procesos metabólicos, entre ellos la actividad respiratoria, la cual adquiere valores a penas detectables con el fin de mantener una serie de orgánulos de la semilla (por ejemplo, mitocondrias), y a la propia semilla en un estado metabólico basal que algunos autores denominan *quiescente*. A diferencia de la semilla durmiente, la semilla quiescente puede germinar si se dan las condiciones óptimas para ello.

La constitución de la semilla, una vez madura, varía si corresponde a una eudicotiledonea o a una monocotiledonea (Fig. 2).

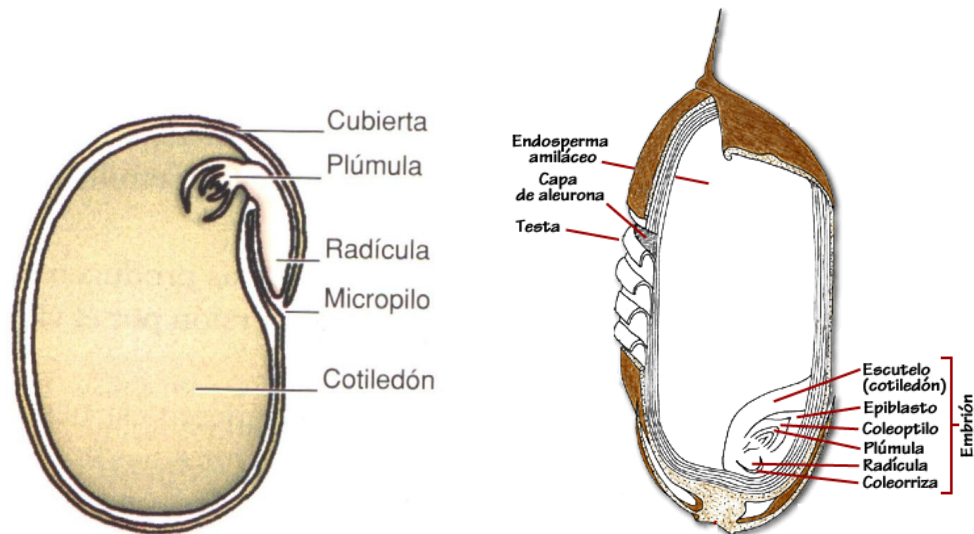


Fig. 2: Anatomía de la semilla de una eudicotiledónea y de una monocotiledónea.

El embrión maduro de las plantas con flor está formado por un eje con apariencia de tallo que lleva uno o dos *cotiledones*. Los cotiledones que en algunas ocasiones reciben el nombre de hojas seminales, son las primeras hojas del esporofito joven. Los meristemas apicales de tallo y raíz están situados en los polos opuestos del eje embrionario. En el embrión el meristema apical del tallo se localiza en el extremo del *epicótilo*, el eje caulinar que se halla por encima de los cotiledones. El epicótilo junto a las hojas jóvenes recibe el nombre de *plúmula*.

El eje con apariencia de tallo que está situado por debajo de los cotiledones recibe el nombre de *hipocótilo*. En el polo inferior del hipocótilo se encuentra el meristemo radicular a partir del cual desarrollara la raíz embrionaria o *radícula*.

GERMINACIÓN

La germinación es el conjunto de fenómenos por los cuales el embrión, que se halla en estado de vida latente dentro de la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula.

Para la germinación de una semilla deben cumplirse tres condiciones de acuerdo a Hartman y Kester, que el embrión sea viable (que esté vivo), que los factores externos sean favorables y que no presente factores internos que impidan la germinación.

La germinación comprende cuatro etapas principales:

1. La imbibición de agua;
2. La síntesis y activación de los sistemas enzimáticos;
3. Degradación de las sustancias de reserva
4. Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula

1. Imbibición

En un suelo adecuadamente provisto de agua existe un gradiente muy pronunciado de ψ entre éste y la semilla. Esta diferencia de ψ crea un flujo de agua hacia ella, con mucha fuerza, en ocasiones de 100 MPa. Este fenómeno de entrada de agua se denomina imbibición y es puramente físico. La cantidad que penetra depende de las especies, pero es por lo general muy alta. En los cereales es del 40 al 60% del peso de la semilla seca y en algunas leguminosas, como la arveja, asciende al 180%. La cantidad de agua absorbida por las diferentes especies depende del tipo de sustancias de reserva que contengan, aquellas con endosperma amiláceo tienen un grado de hidratación menor que las que presentan endosperma proteico, altamente hidratable.

El agua penetra a través de los tegumentos, la micrópila, la lente (estrofiolo), las paredes y las membranas celulares y se liga por uniones de hidrógeno a los coloides y otras sustancias eléctricamente cargadas.

Al inicio el ingreso de agua es rápido. Las macromoléculas y estructuras se rehidratan y recuperan sus formas funcionales, durante este periodo, los solutos de bajo peso molecular pueden perderse desde la semillas.

El ingreso de agua en una semilla tiene tres fases o etapas: una fase I rápida inicial, una fase II meseta (Ψ_{H_2O} entre -1 y -1.5 MPa) y una fase III rápida, que se corresponde con el periodo de elongación del embrión o de la radícula (Fig. 5).

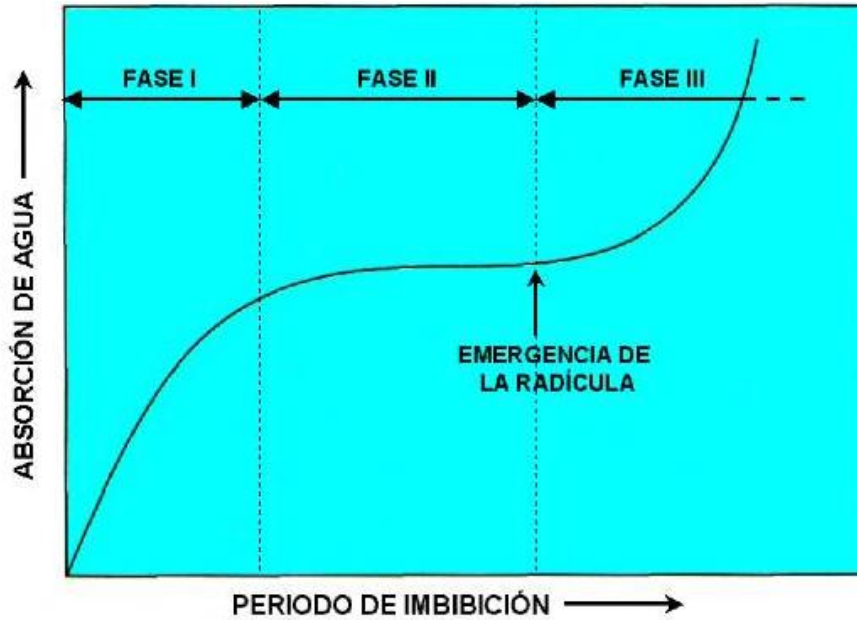


Fig. 5: Curva de absorción de agua en semillas. Las líneas verticales representan la duración aproximada de cada fase de hidratación

La duración de cada fase va a depender de las características de la semilla (tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de oxígeno, etc.).

Paralelamente a la imbibición y como consecuencia de esta se reactiva la actividad respiratoria en la semilla

La tasa de imbibición se ve afectada por varios factores que pueden determinar la respuesta a la germinación de las semillas.

1. Permeabilidad de la cubierta seminal

El caso más evidente es el de semillas cuyas cubiertas son totalmente impermeables al agua, ej. Semillas duras de leguminosas, de algodón, etc. Sin embargo, también se dan ejemplos en que la penetración de agua es restringida y no impedida.

2. Concentración de sales del agua

En general, la imbibición es más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que cuando el agua contiene solutos. El principio que opera es el de presión de difusión del agua. De aquí que las semillas absorben agua más lentamente en suelos secos o salinos, no solo porque hay menos agua, sino que también es causa de una menor presión de difusión del agua.

3. *Temperatura*

El calor es una forma de energía. Cuando se calienta el agua que está en contacto con la semilla, parte de la energía suministrada se invierte en aumentar la difusión de agua, por lo tanto, aumenta la tasa de absorción de agua, dentro de ciertos límites. Se ha encontrado experimentalmente que un aumento de 10°C en la temperatura duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de imbibición.

4. *Presión hidrostática*

Conforme el agua penetra en las semillas, ésta provoca un aumento de volumen y presión en las membranas celulares. Igualmente, las membranas celulares oponen resistencia de igual magnitud, la que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión hacia afuera y por lo tanto disminuyendo la tasa de absorción de la semilla.

5. *Área de la semilla en contacto con agua*

Considerando otros factores constantes, la tasa de absorción de agua es proporcional a la magnitud del área de las semillas en contacto con el agua. En algunas clases de semilla ciertas regiones son más permeables que otras. Ejemplo: el hilo en las semillas de leguminosas.

6. *Fuerzas intermoleculares*

Son en general fuerzas de naturaleza eléctrica. Cualquier aumento en estas fuerzas disminuye la presión de difusión del agua y por tanto la tasa de absorción de las semillas. El efecto de estas fuerzas es más evidente en el suelo. Suelos de bajo contenido de agua sujetan tenazmente la humedad mediante fuerzas intermoleculares.

7. *Absorción diferencial por órganos de la semilla*

Las semillas están compuestas de diversos órganos. Estos se pueden agrupar, arbitrariamente en las siguientes categorías:

- a) Cubierta seminal (testa, pericarpo, etc.)
- b) Tejidos nutritivos de reserva (cotiledones, endosperma, perisperma, etc.)
- c) Eje embrionario (compuesto de radícula, plúmula y estructuras asociadas).

Estos componentes absorben agua a diferentes velocidades y magnitudes. Se ha hallado que en semillas de algodón, maíz y poroto la máxima hidratación ocurre en las primeras 24 horas de imbibición, y que: (a) la cubierta seminal funciona como órgano de transporte de agua, con su curva característica de absorción; (b) el endosperma y los cotiledones absorben agua lentamente; actúan como reservorios de agua y no como estructuras activas de absorción; (c) el eje embrionario absorbe agua rápida y continuamente.

Respiración de la Semilla durante la Germinación

La respiración en las semillas embebidas ha sido diferenciada en cuatro etapas. La primera es un rápido aumento de la respiración, ya que las mitocondrias son activadas y la replicación mitocondrial se estimula, llevando al inicio de la glucólisis, seguida por el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias. Se cree que el sustrato es principalmente la glucosa. En la segunda etapa, la respiración se mantiene estacionaria alrededor de 15 a 20 horas desde el comienzo de la imbibición, debido a que el oxígeno no difunde con velocidad suficiente según la necesidad de la semilla y el camino metabólico se deriva a la fermentación. La restricción al rápido flujo de oxígeno al embrión es causada por la resistencia que le ofrecen los tegumentos. En la tercera etapa, la radícula ha crecido y alcanzado la testa que aparece con fisuras en varias partes. Esto facilita la entrada de oxígeno, lo que incrementa nuevamente la respiración, a la que contribuye el mayor número de mitocondrias y de enzimas activas. Comienza la síntesis proteica, inicialmente del ARNm pre almacenado, seguido de la transcripción y translación de nuevo ARNm a medida que los genes involucrados en la germinación se activan. En la cuarta fase, se produce una disminución de la respiración causado por el agotamiento de las reservas, que todavía la fotosíntesis de la plántula no compensa.

2. Síntesis y Activación de los Sistemas Enzimáticos

En esta fase ocurren dos fenómenos fundamentales para la germinación. El primero es la reactivación de las enzimas, inactivadas por la extrema desecación y, el segundo, la síntesis de otras inexistentes.

Para iniciar el crecimiento del embrión las reservas de la semilla se movilizan, convertidas de la forma insoluble a la soluble, o a formas derivadas transportable y/o metabolizables. El sistema mejor estudiado es indudablemente del endosperma de los cereales.

Durante la germinación, se producen enzimas como amilasas y maltasas las que romperán el endosperma amiláceo a glucosa. Estas enzimas son producidas en la capa de aleurona que rodea al endosperma. Las experiencias realizadas demuestran que el embrión sintetiza *Giberelinas* que desatan este proceso. Si el embrión se remueve de las semillas la degradación del endosperma no se produce aun bajo largos periodos de incubación. Sin embargo si el embrión aislado se coloca sobre una superficie de agar cercana al resto de la semilla, GA difunden a lo largo del agar y se produce la degradación del almidón. La aplicación externa de AG a semillas que se les extrajo el embrión también lleva a la degradación del almidón.

En los cotiledones de las semillas que almacenan lípidos, los ácidos grasos son liberados de los cuerpos lipídicos por lipoxigenasas, entran en los glioxisomas (pequeñas

organelas) donde sucesivos ciclos de oxidación generan acetyl-coA, que será usada para formar succinato en el ciclo del glioxilato. Este ácido orgánico ingresa a la mitocondria y al ciclo de Krebs. El oxalacetato obtenido del ciclo de los ácidos tricarbónicos actuará posteriormente como sustrato para la síntesis de sacarosa.

Los estudios en los granos de cereales han demostrado que el control de las enzimas que intervienen en la movilización de las reservas de las semillas es ejercido por el embrión. Si se elimina el embrión la degradación de las sustancias del endospermo no se produce. Las GAs desempeñan un papel muy importante en la germinación mediante la inducción de la síntesis de α -amilasa y su posterior secreción desde las capas aleurales al endospermo. Este proceso es inhibido por el ABA.

3. Degradación de las sustancias de reserva.

Las enzimas degradan las reservas de la semilla y ponen a disposición del embrión no sólo los nutrientes, sino también energía generada por la fermentación y la respiración de los sustratos solubilizados. Es así como los hidratos de carbono insolubles (almidón, inulina) son degradados por hidrolasas a monosacáridos solubles, como la glucosa, fructosa, etc. Los triglicéridos, principales lípidos de reserva de muchas leguminosas, son degradados en tres orgánulos: cuerpos lipídicos, mitocondrias y glioxisomas, son descompuestos a glicerol y ácidos grasos.

Las proteínas de reserva son hidrolizadas a aminoácidos por proteinasas. En los cereales y otras gramíneas, las proteínas de reserva se encuentran en forma de cuerpos proteicos en la capa de aleurona y en menor cantidad, en el endosperma

4. Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula

Al final de la fase III, el embrión dispone de suficientes nutrientes para crecer normalmente. Todos los productos de la hidrólisis nutren al embrión, para el inicio de su crecimiento.

FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACIÓN

Se puede considerar dos tipos de factores que afectan la germinación de las semillas: factores extrínsecos y factores intrínsecos. Entre los factores externos se encuentran: agua; gases; temperatura y luz:

Entre los internos se pueden citar: embriones fisiológicamente inmaduros; inhibidores; presencia de tegumentos duros; viabilidad de las semillas, que es el periodo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar y que es extremadamente variable, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y del tipo de semilla; su

longevidad, es decir, el tiempo que pueden permanecer viables; presencia de fitocromos; embriones rudimentarios; embriones anatómicamente inmaduros.

Factores Externos

Agua

El primer proceso que tiene lugar durante la germinación es el ingreso de agua por la semilla. La magnitud de la fase de imbibición está determinada por tres factores: composición química de la semilla, las semillas ricas en proteínas absorben gran cantidad de agua, mientras que las oleaginosas absorben menos; permeabilidad de la cobertura seminal y disponibilidad de agua en el ambiente. Es un proceso físico que de da ór gradientes de potencia lagua entre el ψ_w del suelo y el ψ_w de la semilla, sin ninguna relación con la viabilidad de las semillas, ya que ocurre igual en semillas vivas o en semillas muertas.

Contenido de humedad mínimo para que ocurra germinación

Cada especie necesita absorber un cierto mínimo de humedad para que ocurra germinación.

Se ha encontrado que las semillas con alto contenido de proteína necesitan un contenido de humedad mayor que semillas con niveles bajos de proteína; esto se puede observar en los siguientes ejemplos

Tabla 1. Contenido de humedad necesario para que ocurra la germinación de algunas semillas de especies cultivadas.

Cultivo	Contenido de humedad
Maíz (<i>Zea mays</i>)	30.5%
Soya (<i>Glycine max</i>)	50.0%
Remolacha (<i>Beta ssp.</i>)	31.0%
Algodón (<i>Gossypium spp.</i>)	50-55.0%
Higuerilla (<i>Ricinus comunis</i>)	32-36.0%
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	32-35.0%
Avena (<i>Avena sativa</i>)	32-36.0%
Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)	50-55.0%

Factores internos que afectan la absorción de agua.

Entre los más importantes se cuentan:

1. *Madurez.* Semilla de maíz cosechada en estado inmaduro absorbe agua más rápidamente que semillas en estados avanzados de madurez.
2. *Composición Química de la semilla.* Semillas con alto contenido de proteína absorben más volumen de agua y más rápidamente que semillas con contenidos altos de almidón. Semillas con altos contenidos de aceite, pero de bajo contenido de proteína se comportan parecido a semillas con almidón.
3. *Edad.* Conforme avanzan en edad, las semillas tienden a absorber agua más rápidamente. Este fenómeno se considera asociado a la pérdida de integridad de las membranas celulares.

El exceso de agua puede ser tan pernicioso para la semilla como la carencia. Si el nivel de agua llega a excluir o restringir la penetración de oxígeno a la semilla, la germinación se retarda o no ocurre, en un gran número de especies. En otras no se han observado daños. Ejemplo, la germinación de semilla de arroz se puede acelerar por inmersión; por el contrario, la inmersión de semilla de poroto por períodos relativamente largos puede causar daños irreversibles.

Gases

La germinación es un proceso que requiere un consumo considerable de energía. En las células vivas los principales procesos generadores de energía son la respiración y la fermentación. Ambos procesos implican un intercambio de gases CO_2 y O_2 entre las células y el ambiente, la germinación estará, por lo tanto, afectada por la composición de la atmósfera circundante. La mayoría de las semillas germinan sin problemas en atmósferas con 21% de O_2 y 0,03% de CO_2 . Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de O_2 por debajo del 20%. Los casos mejor conocidos son los de *Typha latifolia* y *Cynodon dactylon*, las cuales germinan mejor en presencia de un 8% de O_2 que en la atmósfera normal. Algunas semillas pueden resistir bien condiciones de anaerobiosis y así, el arroz, presenta un porcentaje de germinación igual al 80% en presencia de un 0,3% de O_2 . El efecto del CO_2 es el contrario al del O_2 . La mayoría de las semillas no pueden germinar si se aumenta la concentración del CO_2 .

Sin embargo, no se debe olvidar que entre el oxígeno y el agua se establece un proceso de competencia. Esta relación competitiva se origina de la baja solubilidad del oxígeno en agua y de las diferencias tan notables que existen entre los coeficientes de difusión del oxígeno en el agua y en el aire. La actividad respiratoria de la semilla puede controlarse por velocidad con que el oxígeno llega a las mitocondrias de las células fisiológicamente activas de las semillas. El efecto combinado de solubilidad y difusibilidad reduce la tasa de difusión de oxígeno de $0.205 \text{ ml/cm}^2 \times \text{seg.}$ a $6.7 \times 10^{-7} \text{ ml/cm}^2 \times \text{seg.}$ De

lo anterior es fácil deducir que el exceso de humedad en el sustrato de germinación (o en el suelo) reduce notablemente la disponibilidad de oxígeno a las semillas en germinación.

Las necesidades de oxígeno cambian con las diferentes fases de germinación. Se ha encontrado que la semilla de lechuga es indiferente a la presencia o ausencia de oxígeno durante la imbibición, pero requiere de oxígeno durante la emergencia de la radícula.

Temperatura

El proceso de germinación, como todos los procesos fisiológicos está afectado por la temperatura. Ésta afecta principalmente la actividad enzimática necesaria para la degradación de las sustancias de reservas

Para cada clase de semillas existe una temperatura mínima y una máxima en la que ocurre la germinación. Además, dentro del rango temperatura mínima-máxima, existe un punto en el que se obtiene máxima germinación y ésta ocurre más rápidamente; este punto corresponde a la temperatura óptima. Estas temperaturas se conocen como las temperaturas cardinales de germinación.

El límite inferior está alrededor de 0°C. El óptimo oscila entre los 25 y 31°C y el máximo entre 40 y 50°C.

Rango de temperaturas de germinación

1. *Temperatura mínima.* Por debajo de esta temperatura los procesos de germinación no se pueden detectar visualmente, dentro de un período razonable de tiempo.

Bajas temperaturas pero por encima del punto de congelación no son letales a las semillas.

2. *Temperatura máxima.* Es la temperatura por encima de la cual los mecanismos de germinación no operan y por lo tanto no se da crecimiento del embrión. En contraste con la temperatura mínima, la máxima es fácil de determinar ya que temperaturas superiores a la máxima causan daños irreversibles a las semillas (excepción a esta regla son las semillas que entran en latencia a altas temperaturas).

3. *Temperatura óptima.* Esta se puede definir como la temperatura a la cual se da el porcentaje máximo de germinación en un mínimo de tiempo.

Si representamos el rango de temperaturas en que ocurre germinación como línea. mínima óptima máxima se pueden hacer varias observaciones:

- a. En el rango temperatura mínima-óptima los porcentajes de germinación no son sustancialmente diferentes (siempre que el factor tiempo no sea limitante), pero la germinación ocurre más rápida mente conforme nos desplazamos hacia la temperatura óptima.
- b. Considerando el segmento temperatura óptima-máxima, los porcentajes de germinación tienden a disminuir conforme nos desplazamos hacia la temperatura máxima. Sin embargo, la velocidad de germinación también disminuye en las cercanías de la máxima.

Temperaturas cardinales de algunas semillas

Cultivo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Arroz	10-12	30-37	40-42
Maíz	8-10	32-35	40-44
Trigo	3-5	15-31	30-43
Tomate	20	20-35	35-40
Soja	8	32	40

Condición fisiológica de la semilla

A menudo el efecto de la temperatura sobre la germinación está íntima mente relacionada con la condición fisiológica de la semilla. Semilla recién cosechada presenta requerimientos muy específicos de temperatura para poder germinar. Por ejemplo, semilla de arroz recién colectada germina mejor a 32°C que a 25°C. Este fenómeno está relacionado con la latencia. Conforme se pierde la latencia, el óptimo de temperatura puede variar hacia temperaturas más altas o más bajas y el rango de temperaturas dentro de las que ocurre germinación se amplía. Con el deterioro, las semillas tienden a necesitar temperaturas específicas para que ocurra germinación.

Temperaturas alternas

En contraste con aquellas semillas que germinan inmediatamente al ser colocadas a la una temperatura determinada, están aquellas otras que requieren una alternancia periódica de temperaturas, como ocurre en *Oenothera biennis*, *Cynodon dactylon*, *Nicotiana tabacum*, etc.

Las semillas de muchas especies germinan mejor alternando bajas y altas temperaturas, como por ejemplo 20-30°C o 25-30°C, etc. Si esto lo realizamos para una

prueba de germinación de semillas, se acostumbra mantener la temperatura más baja durante 16 horas y la alta durante 8 horas.

Esta alternancia de temperaturas pretende duplicar las fluctuaciones diurnas de temperatura que se dan en la naturaleza.

Interacciones

Los efectos de la temperatura sobre la germinación tienen características muy especiales cuando se trata de semillas con dormancia o latentes. La germinación de algunas semillas mejora notablemente bajo condiciones de baja temperatura (método de romper latencia denominado estratificación); otras semillas responden favorablemente a tratamientos con temperaturas altas (Ejemplo: arroz).

Algunas semillas que necesitan luz para germinar ofrecen respuestas interesantes a la temperatura. Por ejemplo, la semilla de lechuga germina en la oscuridad a temperaturas menores de 20°C, pero necesitan de luz para germinar a temperaturas por arriba de 20°C.

Luz

La exposición a la luz estimula la germinación de semillas de muchas especies silvestres y agrícolas. En la gran mayoría de los casos se estimula la germinación mediante exposición a luz roja (660 nm = 6600 Å) y se inhibe con luz de 730 nm de longitud de onda. En esta reacción a condiciones lumínicas está involucrado el fitocromo. A este tipo de semillas se las denomina *fotoblásticas*.

Ya habíamos mencionado que en la respuesta a la luz influye también la temperatura de germinación.

Cuando la luz incide positivamente en la germinación, se dice que las semillas tienen *fotoblastismo positivo*; en cambio, si la germinación se ve inhibida en presencia de luz, estas tienen *fotoblastismo negativo*. Cuando la luz no afecta a la germinación se dice que las semillas son *no fotoblásticas*.

En un gran número de especies la necesidad por luz puede ser reemplazada por tratamientos con *ácido giberélico*

Cuando a una semilla viable y madura se le dan las condiciones óptimas de factores externos y no germina se dice que tiene **dormición o dormancia**

Los factores internos son los que llevan a la *dormición*.

FACTORES INTERNOS

Embrión fisiológicamente inmaduro

Este tipo de dormición se debe, fundamentalmente, a una disminución en la actividad enzimática de los embriones.

En los cereales este tipo de dormición es frecuente, impidiendo que las semillas germinen luego de cosechadas, aunque el embrión este perfectamente formado y durante el almacenaje en sitio seco van perdiendo esta dormición, lo que convierte a esta dormancia en un carácter fitotécnico deseable.

El período de duración de la dormancia puede variar desde algunas semanas hasta varios meses, de ahí que existen cultivares que germinan en planta (vivíparos) y otros permanecen inalterables aún en condiciones adecuadas para la germinación.

Existen métodos artificiales para romper esta dormancia, por ejemplo métodos térmicos, químicos.

Inhibidores de la germinación de semillas

Los inhibidores de la germinación de semillas son sustancias químicas pueden ser producidas en o traslocadas a la semilla y bloquean el crecimiento del embrión.

Son inhibidores:

- *Acido abscísico*: Regulador del crecimiento
- Sustancias derivadas del metabolismo secundario de la planta:
 - Compuestos orgánicos aromáticos (fenólicos, benzoicos, cofactores de AIA oxidasa, difenólicos);
 - Compuestos derivados de las lactonas (cumarina, escopoletina, juglona).
- Inhibidor β : Acido abscísico + inhibidor

En especies tropicales y subtropicales, los inhibidores se encuentran en el pericarpio e inhiben la germinación en las estaciones secas. La eliminación manual del pericarpio o la lixiviación de los frutos es suficiente para que se inicie la germinación de las semillas. En condiciones naturales, esto ocurre en las estaciones lluviosas. El efecto inhibitorio en la germinación se consigue también con la aplicación de reguladores del crecimiento, como el *ácido abscísico* o el *etileno*.

Presencia de Tegumentos Duros

En este caso, las semillas no pueden germinar o la germinación se ve retrasada por tener tegumentos duros.

Los tegumentos pueden ser duros por:

- Impermeabilidad al agua por presencia de cutinas, ligninas, quinonas, sustancias pécticas insolubles (Leguminosas);
- Impermeabilidad al oxígeno por presencia de fenoles sustancias ávidas de O_2 que lo atrapan y no permiten que llegue al embrión (*Xanthium*);
- Resistencia mecánica a la expansión del embrión por contener un estrato de esclereidas con paredes secundarias muy lignificadas (*Brassicas*);
- Impedir la difusión de los inhibidores fuera de la semilla (Guayule).

En tales casos, para romper el letargo de las semillas debido a los tegumentos duros, se puede recurrir a diferentes métodos ya sean mecánicos o químicos.

En la naturaleza esto se produce por la abrasión de las partículas de arena, la acción de insectos y/o microorganismos, las alternancias térmicas marcadas o el pasaje por el aparato digestivo de animales y aves que presentan sustancias ácidas.

DORMICIÓN

La dormición es una ventaja adaptativa, que provoca que la germinación se produzca cuando las condiciones ecológicas le sean favorables a la plántula para su supervivencia. En cambio, otras pueden germinar en la planta madre, fenómeno que se conoce como *viviparismo*. (Fig 6)



Fig 6: A germinación de plántulas de arroz en su misma inflorescencia B Germinación de plántulas de mango rojo (*Rhizophora mangle*) los frutos aun en la planta. (Tomada de: Bidlack, J. E. and S.H. Jansky. 2011. Stern's introductory plant biology. 12th ed.)

La dormición se divide en *primaria* o *secundaria*.

Dormición primaria

El *ABA* está implicado en la aparición de la dormición primaria, la cual se produce durante la maduración de los embriones posterior a la maduración del embrión y durante la desecación del mismo lo que lleva a que el embrión permanezca en estado latente con un metabolismo reducido.

Dormición secundaria

Está vinculada fundamentalmente a condiciones ambientales desfavorables y son el resultado de mecanismos de adaptación a dichas condiciones

Este estado de dormición es común en muchas especies silvestres y casi no existe en las cultivadas, en las que el mejoramiento genético ha logrado eliminar este estado fisiológico indeseable para la implantación de cultivos uniformes.

La dormición es causada por mecanismos diferentes según las especies y puede ser impuesta, por más de uno de ellos, en la misma semilla. Se debe a causas *estructurales* o *fisiológicas*. En el primer caso, se encuentran: tegumentos impermeables al agua y/o gases, opacos a la luz, que no permiten además, la salida de inhibidores, por su constitución química (ceras, cutina) o su espesor grueso, que por acción mecánica impiden, la salida de la radícula y la plúmula.

En condiciones naturales la germinación se produce luego que los tegumentos disminuyen su impermeabilidad por acción de la solución del suelo, microorganismos, por fluctuaciones de la temperatura y humedad, por el paso a través del tubo digestivo de aves o de otros animales, por la abrasión que producen las partículas del suelo durante las labranzas o por el movimiento del mismo por fenómenos naturales, como vientos fuertes o por lluvias copiosas. Las semillas que poseen este tipo de dormición se denominan *duras*. Se puede eliminar esta limitación mediante métodos artificiales, como la escarificación o tratamiento químicos con ácidos fuertes, como el sulfúrico.

En relación a las causas fisiológicas de la dormición, intervienen diferentes mecanismos que se localizan principalmente en el propio embrión (*dormición embrional*). La dormición embrional se debe a varias causas distintas:

1. Presencia de inhibidores;
2. Embriones inmaduros;
3. Requerimiento de un periodo de bajas temperaturas (5°C – 10°C);
4. Necesidad de un periodo de luz o un fotoperiodo determinado.

1. En el primer caso, los inhibidores como el *ácido abscísico* (ABA), cumarinas y sus derivados, bloquean la germinación por su acción sobre la desrepresión génica. La solución para promover la germinación (cuando esta es la causa) es el lavado de las semillas con agua corriente durante varias horas o el tratamiento de las mismas con soluciones con *Giberelinas*, que antagonizan el ABA.

2. En semillas en que el embrión no ha completado su desarrollo morfológico y que requiere de un periodo más prolongado para hacerlo, es conveniente estratificarlas embebidas en arena húmeda durante varias semanas a temperaturas relativamente bajas (10°C – 18°C). Durante este lapso, la diferenciación se completa facilitada por las bajas temperaturas que hacen más eficiente la transferencia de las reservas del embrión.

3. Las semillas con embriones completos que requieren de un periodo de bajas temperaturas para germinar corresponde a plantas de climas fríos o templados-fríos. El efecto del frío en la ruptura de la dormición no se conoce, ni tampoco la causa de este requerimiento pero se cree es la inactivación de sustancias inhibitorias. La germinación se

logra embebiendo las semillas en agua y, enfriándolas a una temperatura de 4°C a 6°C por un periodo que esta correlacionado con el clima de la región donde tuvo origen la especie.

4. La dormición de una gran número de especies se rompe luego de hidratadas sólo si se las ilumina con luz blanca, por lo que se denominan *fotoblásticas*. Esta ruptura es fisiológicamente compleja, pues los requerimientos son variados en las diferentes especies. Se pueden diferenciar las semillas fotoblásticas en los grupos siguientes:

- Semillas que germinan o son inhibidas luego de ser expuestas a la luz de muy baja energía durante un periodo de solo pocos minutos;
- Semillas que solo germinan si son sometidas a irradiaciones intermitentes;
- Semillas que germinan solamente bajo luz continua;
- Semillas que para germinar necesitan un fotoperiodo determinado;
- Semillas cuya germinación es promovida por cortos periodos de luz, pero inhibida por largos.

Algunas formas de evaluar la germinación de semillas

Tests de viabilidad

Prueba topográfica por Tetrazolio

Esta prueba de naturaleza bioquímica permite realizar en forma rápida un diagnóstico muy completo acerca de la calidad del lote de semillas. El test se basa en la actividad de las enzimas respiratorias (deshidrogenasas) de la semilla y utiliza las propiedades biológicas de la sal de Tetrazolio para comprobar la existencia, -a través de la diferenciación de colores- de los tejidos sanos, débiles o muertos de la semilla. Esta sal, actúa como indicador de óxido-reducción; al penetrar en las células vivas se reduce produciendo en las semillas una tinción en las partes donde se presenta la actividad enzimática. Las semillas son evaluadas como vivas (tinción rosada) o muertas (sin tinción).



Las semillas se acondicionan para la prueba mediante cortes en la misma, se introducen en una solución 0,1 % de la sal 2, 3, 5 cloruro trifenil tetrazolio preparada en solución buffer (ISTA, 1996). La diferencia de coloración, junto con otras consideraciones, permite establecer la naturaleza de las alteraciones en el embrión y demás partes de las semillas

Conductividad Eléctrica

Una prueba sensible y directa para evaluar la integridad del sistema de membranas es la conductividad eléctrica (Salinas et al., 2001). La medición de los electrolitos en el agua provee un simple y rápido método para determinar la liberación de solutos desde la semilla

durante la primera fase de la germinación. Una mayor liberación de solutos, medidos en $mS.cm^{-1}.g^{-1}$ o $mmhos.cm^{-1}.g^{-1}$ indicará algún proceso de deterioro de membranas, daño físico de semillas, daño por envejecimiento o también ser consecuencia de la inmadurez de las semillas. Powell (1988) consideró que la integridad de las membranas celulares determinada por los cambios bioquímicos deteriorativos y la capacidad para reorganizar y reparar daños, sería la causa fundamental de las diferencias en el vigor de las semillas, que son medidas en forma indirecta a través de la lixiviación de electrolitos durante la prueba de conductividad eléctrica (CE).

Cada muestra de semillas sin pericarpio, se sumerge durante 24 horas en 30 ml de agua destilada en un tubo de ensayo. Permanecen tapadas a una temperatura de $20^{\circ}C$ y pasadas 24 horas se realizan medidas con un conductivímetro. Los resultados se expresan como electroconductividad en microsiemens/cm a las 24 horas/gramos de semilla.

El test del índigo carmín (no está aceptado por la ISTA)

Frente al tetrazolio, tiñe las partes muertas de la semilla.

El ensayo se realiza sobre embriones escindidos necesitando eliminar el pericarpio, la testa y el endospermo. Una vez quitado el pericarpio se sumergen las semillas 18 horas en agua destilada para reblandecer el endospermo. Posteriormente se extraen los embriones y se sumergen en la preparación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavan y se clasifican en vivos (blancos o con pocas manchas azules nunca localizadas en la radícula), de vitalidad limitada (embriones con dudas), y muertos (zona de la radícula totalmente teñida y/o embrión teñido)



Poder germinativo

Indica el % de semillas germinadas en un tiempo dado. (7días, 14 días)

$$PG = \frac{N^{\circ} \text{ semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ semillas puestas a germinar}} \times 100$$

Energía germinativa: Es el número de días requeridos para conseguir un porcentaje determinado de semillas germinadas

Velocidad de germinación: definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación-

$$M = \sum \frac{(ni)}{t}$$

M = velocidad de germinación

ni = número de semillas germinadas al día i

t = número de días desde la siembra hasta la germinación de la última semilla

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon –Bieto, J & M. Talon (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.
- Barcelo Coll, J.; G. Nicolás Rodrigo; B. Sabater García and R. Sánchez Tames. (1992). Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide S.A. Madrid
- Bidwell, R.G.S., (1993). Fisiología Vegetal. Primera Edición en Español, AGT Editor S.A.
- Hopkins, W. G. (2006). Plant development. Infobase Publishing. New York. pp 160
- International Seed Testing Association (ISTA) 1996. International Rules for Seed Testing. Seed Sci. & Technol. Vol 24. Supplements Rules, 335 p
- Montaldi, E.R. (1995). Principios de Fisiología Vegetal. Ediciones Sur. Argentina.
- Powell, A.A. 1988. Seed vigour and field establishment. Advances in Research and Technology of Seeds, Wageningen 11(1):29-61
- Ö Pik, H. and S. A. Rolfe. (2005). The Physiology of Flowering Plants 4 ed (eds Ö Pik, H. and S. A. Rolfe) Cambridge University Press, New York. pp. 402
- Salinas, A. R.; A. M. Yoldjian; R, M. Craviotto and V. Bisaro. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. Pesq. agropec. bras., Brasilia, 36(2): 371-379