

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**“Estudios Histológicos y Bioquímicos del Brotado Pre-  
Cosecha en Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)”**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA LA**

**Biol. Exp. Alethia Angoli Avendaño Gómez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**TUTORA**

**Dra. Laura J. Pérez Flores**

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

**ASESORA**

**Dra. Helia Reyna Osuna Fernandez**

Universidad Nacional Autónoma de México

**ASESORA**

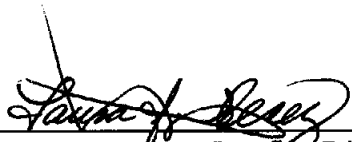
**Dra. Alicia Gamboa de Buen**

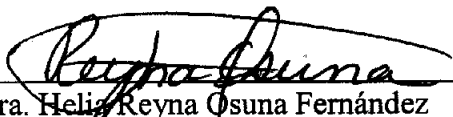
Universidad Nacional Autónoma de México

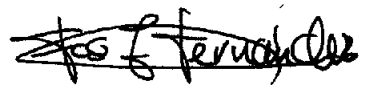
---

---

Lo integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 5 de Julio del 2005-06-22

  
Dra. Laura Josefina Pérez Flores  
Presidente

  
Dra. Helia Reyna Osuna Fernández  
Secretaria

  
Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Vocal

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del patrón de programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca otorgada por el CONACYT con número 169899

<b><u>1. Resumen</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2. Antecedentes</u></b>	<b><u>4</u></b>
<u>2.1</u> Importancia de las semillas	4
<u>2.2</u> Características de la planta de sorgo	5
<u>2.3</u> Desarrollo de la semilla	8
<u>2.4</u> Germinación	9
<u>2.5</u> “Priming” y germinación	12
<u>2.6</u> Latencia de las semillas	14
<u>2.7</u> Efectos climáticos sobre el desarrollo y la latencia de las semillas	18
<u>2.8</u> Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)	22
<u>2.8.1</u> En el desarrollo y la germinación	22
<u>2.8.2</u> En la latencia y en el almacenamiento de semillas	23
<u>2.9</u> Brotado Pre-Cosecha(BPC) o germinación prematura	24
<u>2.10</u> Participación de las hormonas vegetales en el BPC y la latencia	25
<u>2.10.1</u> Ácido Abscísico(ABA)	26
<u>2.10.2</u> Giberelinas (GAs)	28
<u>2.11</u> Movilización de Reservas como respuesta a Hormonas	31
<u>2.12</u> Medición de la actividad de la $\alpha$ -amilasa para la detección del BPC en cereales	36
<b><u>3. Justificación</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b><u>Objetivo General</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b><u>Objetivos Particulares</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b><u>Hipótesis</u></b>	<b><u>39</u></b>
<b><u>4. Materiales y Métodos</u></b>	<b><u>40</u></b>
<u>4.1</u> Cultivo de sorgo	40
<u>4.1.1</u> Cultivo de sorgo en condiciones ambientales	40
<u>4.1.2</u> Cultivo de sorgo en condiciones de invernadero	42
<u>4.2</u> IG de semillas recién cosechadas y almacenadas	43
<u>4.3</u> Estudio histológico e histoquímico	44
<u>4.4</u> Medición de la sensibilidad al ABA y GAs	45
<u>4.5</u> Velocidad de movilización de reservas	46
<u>4.6</u> Velocidad de toma de agua	47
<u>4.7</u> Análisis estadístico	48
<b><u>5. Resultados y Discusión</u></b>	<b><u>48</u></b>
<u>5.1</u> Semillas de sorgo cultivadas en México (Cosecha 2003 UAM y UNAM)	48
<u>5.2</u> IG y curvas de germinación de semillas cultivadas en distintas condiciones (México y Argentina) y almacenadas por distintos periodos	53
<u>5.3</u> Medición de la sensibilidad al ABA y las GAs	60
<u>5.4</u> Velocidad de movilización de reservas	62
<u>5.5</u> Estudio histológico e histoquímico	64
<u>5.5.1</u> Semillas maduras (más de 60 DPA)	65
<u>5.5.2</u> Semillas en desarrollo (22 DPA)	69

Indice de Figuras

<b><u>Fig.1</u></b> Mapa de distribución de cultivo de sorgo	5
<b><u>Fig.2</u></b> Anatomía de la planta de sorgo	6
<b><u>Fig.3</u></b> Anatomía de las semillas de sorgo maduras	6
<b><u>Fig.4</u></b> Cronograma del proceso de germinación	10
<b><u>Fig.5</u></b> IG de semillas con scBPC	11
<b><u>Fig.6</u></b> Biosíntesis de Giberelinas	30
<b><u>Fig. 7</u></b> Actividad de $\alpha$ -amilasa en semillas con scBPC	36
<b><u>Fig.8</u></b> Condiciones iniciales del Vivero Alto (UNAM)	40
<b><u>Fig. 9</u></b> Diagrama de distribución de cultivo de sorgo (UNAM)	41
<b><u>Fig.10</u></b> Cultivar del vivero alto (UNAM) primeras etapas	41
<b><u>Fig. 11</u></b> Temperaturas máximas, mínimas y precipitación	42
<b><u>Fig. 12</u></b> Panojas de sorgo en los primeros días de antesis	43
<b><u>Fig. 13</u></b> Cronograma del desarrollo del cultivo en Argentina y México	50
<b><u>Fig. 14</u></b> Cultivo en el Vivero Alto (UNAM) en la segunda siembra	50
<b><u>Fig. 15</u></b> Curva de Germinación de las semillas de la cosecha 2003 cultivadas en la UAM y la UNAM	54
<b><u>Fig.16</u></b> IG para ambas líneas de sorgo en diferentes años de cosecha	55
<b><u>Fig.17</u></b> Curva de germinación de las semillas de ambas líneas (cosecha 1999 Arg) y almacenadas por distintos periodos (Mex)	57
<b><u>Fig.18</u></b> ÍG de las semillas de ambas líneas a los 2 año y 4 años de ser cosechadas (1999)	58
<b><u>Fig. 19</u></b> Curva de sensibilidad al ABA y las GAs	61
<b><u>Fig. 20</u></b> Actividad de $\alpha$ -amilasa en semillas maduras (cosecha2003)	63
<b><u>Fig. 21</u></b> Corte longitudinal de semillas maduras (Redland B2) técnica: safranina-verde rápido	65
<b><u>Fig. 22</u></b> Cortes longitudinales de semillas de ambas líneas maduras técnica: Safranina-verde rápido	66
<b><u>Fig. 23</u></b> Corte longitudinal de semillas maduras (Redland B2) técnica: tinción de Shiftt	67
<b><u>Fig. 24</u></b> Corte longitudinal de semillas maduras (Redland B2) técnicas: Azul Negro de naftol y permanganato de potasio	68
<b><u>Fig. 25</u></b> Corte longitudinal de las semillas maduras (Redland B2) técnica: Rojo oleoso	69
<b><u>Fig. 26</u></b> Corte longitudinal de las semillas inmaduras (22 DPA) de ambas líneas técnica: Safranina-verde rápido	71
<b><u>Fig. 27</u></b> Velocidad de toma de agua en semillas maduras (cosecha 2003) de ambas líneas	72

### **Lista de Abreviaturas**

**ABA**: Acido abscísico

**BPC**: Brotado Pre – Cosecha

**DPA**: Dias Post – Antesis

**GAs**: Giberelinas

**PSV**: Vacuolas de almacenamiento de proteínas

**scBPC**: Susceptibilidad Contrastante al BPC

**EROS**: Especies Reactivas de Oxígeno

**HR**: Humedad Relativa







## 1. RESUMEN

Las semillas son un componente vital en la dieta mundial. Los granos de cereales comprenden el 90% de todas las semillas cultivadas y contribuyen con la mitad del abastecimiento de energía por persona. En particular, el sorgo es el quinto cereal de mayor importancia a nivel mundial. En México, el cultivo de sorgo ocupa el tercer lugar en cuanto a magnitud de superficie cosechada con riego.

El Brotado Pre-Cosecha (BPC) es un problema muy común en cereales, sobre todo cuando el periodo de cosecha coincide con condiciones de humedad ambiental muy elevada, causando grandes pérdidas económicas y agrícolas. Estudios previos en sorgo indican que el grado de latencia, y por lo tanto la susceptibilidad al BPC depende, entre otros factores, del balance hormonal entre el Ácido Abscísico (ABA) que inhibe la germinación y las Giberelinas (GAs) que promueven la germinación. El balance hormonal se ha estudiado en términos de la sensibilidad de los tejidos a estas hormonas, así como de los niveles endógenos de éstas. En reportes previos se encontró que las semillas resistentes al BPC (línea IS9530) tienen un mayor grado de latencia (impuesta en gran medida por la cubierta) que las semillas susceptibles (línea Redland B2). Asimismo, se encontró que la línea resistente al BPC tenía una mayor sensibilidad al ABA.

El objetivo general de este trabajo fue analizar las bases histológicas y bioquímicas del BPC en dos líneas de sorgo (IS9530 y Redland B2) cultivadas en diferentes condiciones, así como estudiar el efecto del almacenamiento por diversos intervalos de tiempo en la velocidad de germinación de dichas semillas.

Se utilizaron semillas cosechadas en Argentina en los años 1997, 1998, 1999 y 2002, almacenadas por seis, cinco, cuatro y un año respectivamente y semillas cosechadas durante la ontogenia o maduras en 2003 (cultivadas en México). Por antecedentes de nuestro grupo de trabajo se sabe que las semillas cultivadas en Argentina presentaron durante la ontogenia susceptibilidad

contrastante al BPC (scBPC), siendo Redland B2 susceptible e IS9530 resistente al BPC. Este comportamiento se mantuvo en las semillas maduras, presentando una mayor velocidad de germinación la línea Redland B2. En este estudio se encontró que el almacenamiento de las semillas cosechadas en 1997, 1998 y 2002 provocó un cambio en la velocidad de germinación. En este sentido, las semillas de IS9530 almacenadas germinaron con igual o mayor velocidad que las de Redland B2. Las semillas cosechadas en 1999 y almacenadas por 4 años mantuvieron el comportamiento de las semillas recién cosechadas, presentando una mayor velocidad de germinación para la línea Redland B2. Sin embargo, se observó que las diferencias en la velocidad de germinación entre ambas líneas fue disminuyendo con el tiempo de almacenamiento.

Con respecto al efecto de las condiciones climáticas de la zona de cultivo en la susceptibilidad al BPC de las líneas de sorgo estudiadas, se observó que las semillas de Redland B2 cultivadas en México (cosecha 2003), no presentaron BPC durante la ontogenia. También se observó en las semillas maduras recién cosechadas que la velocidad de germinación fue significativamente mayor en la línea IS9530 con respecto a la de la línea Redland B2 ( $p > 0.05$ ). Al analizar la velocidad de toma de agua de las semillas maduras, se encontró que aunque es ligeramente superior para Redland B2 en las primeras horas de imbibición, a tiempos más largos no hay diferencias significativas entre ambas líneas que expliquen las diferencias observadas en la velocidad de germinación.

Por otra parte, se realizaron las comparaciones histológicas e histoquímicas de las semillas de 22 días post – anthesis (DPA) y maduras ( $> 60$  DPA) recién cosechadas (cosecha 2003, cultivadas en México). Se encontró que la anatomía general para las semillas maduras de ambas líneas es: pericarpio, cutícula, aleurona, endospermo con almidón, epidermis monoestratificada, escutelo con almidón y eje embrionario. Se determinó por medición del grosor de los estratos que la cubierta en semillas de 22 DPA es significativamente mayor en IS9530 ( $442.07 \pm 25.48$ ) que en Redland B2 ( $376.20 \pm 14.67$ ). También se observaron diferencias durante la ontogenia de las semillas, encontrándose un desarrollo más rápido del embrión en Redland B2 que en

IS9530; mientras que en IS9530 se desarrollaron más rápido las capas de cutícula que en Redland B2. En las semillas maduras no se encontraron diferencias histológicas significativas.

Estos resultados permitirían explicar la mayor susceptibilidad al BPC de la línea Redland B2. Por otra parte, las características histológicas sugieren que debido a su temprano desarrollo embrionario y poca protección inicial, las semillas de Redland B2 son más susceptibles al BPC y probablemente a daños durante etapas avanzadas del desarrollo y durante su almacenamiento. Sin embargo, para que el BPC se exprese son determinantes las condiciones climáticas en que se desarrolla la semilla. A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias morfológicas determinantes en las semillas maduras recién cosechadas (2003) y después del almacenamiento que expliquen los cambios observados en la velocidad de germinación.

Por otro lado, se midió la sensibilidad al ABA y GAs, así como la actividad de la alfa-amilasa en las semillas maduras de ambas líneas cosechadas en el 2003. IS9530 presentó un incremento en la sensibilidad a las GAs y una disminución en la sensibilidad al ABA. Los cambios en la sensibilidad a estas hormonas explican los cambios en la velocidad de germinación que presentan estas semillas. En las semillas maduras sin imbibir o imbibidas no se encontraron diferencias significativas en la actividad de alfa-amilasa entre ambas líneas.

Los resultados anteriores sugieren que las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan las semillas de las líneas estudiadas son determinantes para modificar el grado de latencia, susceptibilidad al BPC y velocidad de germinación y podrían participar en la susceptibilidad al deterioro durante el almacenamiento de estas semillas. Otros factores que podrían participar en los cambios en la velocidad de germinación de las semillas son entre otros, los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), la duración y condiciones de almacenamiento, los niveles de agua de la semilla así como sus características morfológicas (desarrollo embrionario y grosor de las cutículas).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Importancia de las Semillas**

Las plantas con semillas son la vegetación dominante en la mayor parte de los campos naturales e incluyen las plantas cultivadas. En las plantas con reproducción sexual, las semillas se consideran como la unidad fundamental de dispersión para su sobrevivencia. La semilla está estructural y fisiológicamente equipada (embrión, tejido de reserva, testa, etc.) para poder sobrevivir durante todo el proceso de la germinación (el cual inicia con la imbibición y termina con el alargamiento y la protusión de la radícula) hasta el establecimiento de un organismo autotrófico (Duffus y Slaughter, 1985).

Las semillas forman parte primordial de la dieta humana mundial. Los granos de cereales comprenden el 90% de todas las semillas cultivadas, contribuyendo a la mitad del abastecimiento de energía por persona. En particular, el sorgo es el quinto cereal de mayor importancia en el mundo después del trigo, arroz, maíz y cebada, y es uno de los alimentos básicos en China, India y África, además de utilizarse en la elaboración de cerveza y como planta forrajera para la alimentación del ganado (principalmente en Estados Unidos de Norteamérica y Australia). Recientemente, en Estados Unidos de Norteamérica se ha utilizado incluso para la producción de materiales de empaquetamiento biodegradables.

En el año 2004, el área global de cultivo de sorgo fue aproximadamente de 44 millones de hectáreas. La producción total de sorgo en este mismo año fue de 60 millones de toneladas métricas. En América, los principales productores de sorgo son los Estados Unidos de Norteamérica, México y Argentina. En México la producción de sorgo en el 2004 fue de 6 millones de toneladas métricas, su cultivo ocupa el tercer lugar en cuanto a magnitud de superficie cosechada, superado únicamente por el maíz y el frijol. Dada la importancia agronómica del sorgo, se considera como uno de los indicadores de crecimiento económico (Salisbury y Ross, 1994; <http://faostat.fao.org/database>).

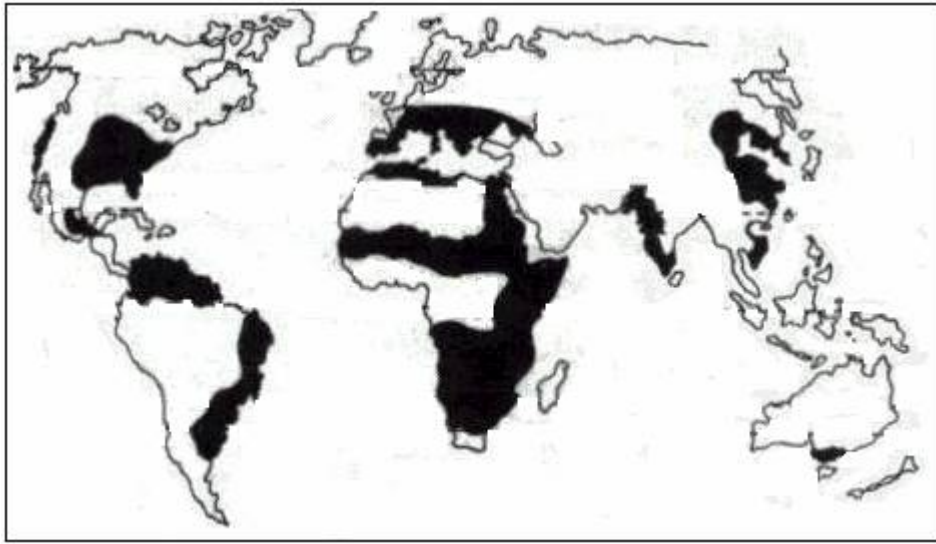


Figura 1. Distribución de cultivo de sorgo a nivel mundial. Las partes sombreadas indican las zonas con mayor cultivo de sorgo.

## 2.2 Características de la planta de sorgo

El sorgo pertenece a la familia de las gramíneas, actualmente denominada *Poaceae*, a la subfamilia *Panicoideae* y al género *Sorghum spp.* L. En este trabajo se utilizó la especie *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

El sorgo es un pasto anual que mide entre 0.5 y 5 metros de altura, produce varios retoños, los cuales emergen inicialmente de la base y subsecuentemente de los nodos del tallo (Fig. 2). La inflorescencia es una panícula de racimos con o sin pedúnculos, con un raquis central que puede estar completamente escondido o totalmente expuesto por la densidad de las ramas de la panícula. Florea de arriba hacia abajo. La excerción de la panícula es importante para la cosecha mecanizada y para la tolerancia a pestes y enfermedades. La panícula es compacta y elíptica, puede contener como mínimo cerca de 400 granos. El pedúnculo, generalmente tiene una excerción media, aunque ésta se ve afectada por la cantidad de agua (ver [http://www.cgair.org/research/res\\_sorghum.html](http://www.cgair.org/research/res_sorghum.html))

El sistema radical adventicio fibroso se desarrolla de los nudos más bajos del tallo. La profundidad del enraizado es de 1 a 1.3 m con el 80% de las raíces en

los primeros 30 cm. Los depósitos de sílice en la endodermis de la raíz probablemente la fortalecen y la hacen soportar presiones altas durante las épocas de sequía. El diámetro basal tiene aproximadamente una pulgada haciéndose más delgado a la altura de la inflorescencia (ver [http://www.cgair.org/research/res\\_sorghum.html](http://www.cgair.org/research/res_sorghum.html) ).

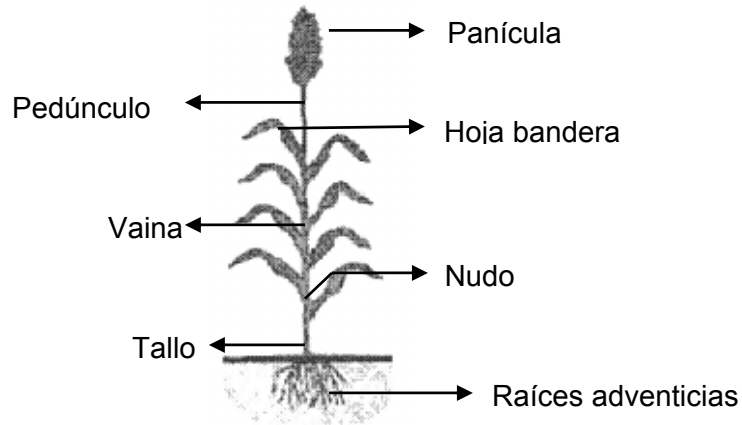


Figura. 2. Planta de sorgo

El grano de sorgo tiene las estructuras típicas que caracterizan a los cereales, tales como cariopse que contiene: tegumentos o testa, aleurona, endospermo, eje embrionario, como se muestra en la siguiente figura (Fig. 3)

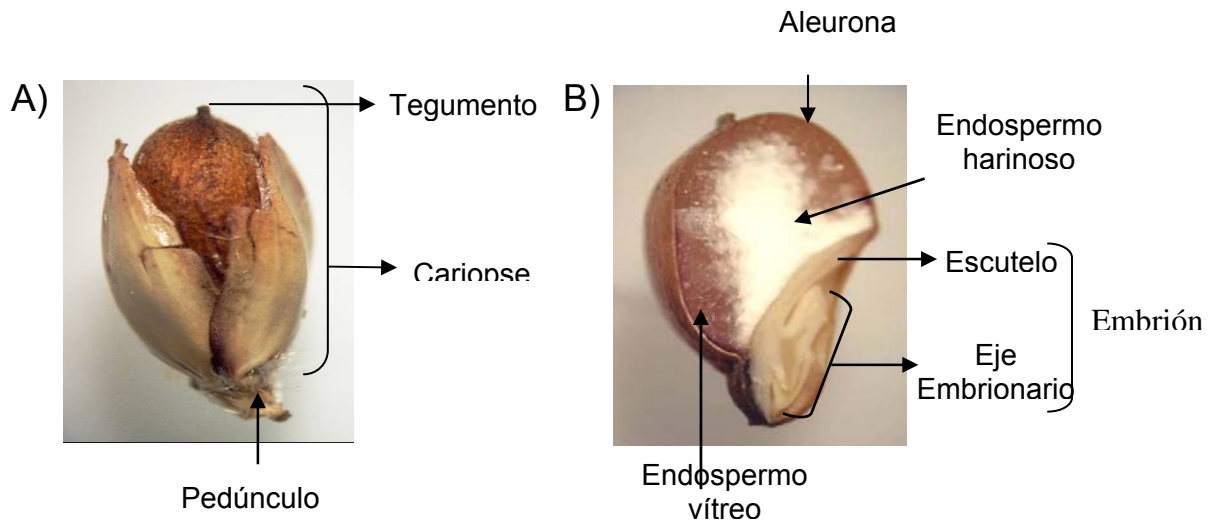


Figura. 3. Semillas de sorgo maduras. A) Vista longitudinal, B) Corte longitudinal

Las semillas, en general, alcanzan el máximo valor de biomasa (acumulación máxima de peso seco), viabilidad, germinación y vigor cuando llegan a la madurez fisiológica, o sea, cuando la acumulación de metabolitos cesa porque

el floema es bloqueado con mucílago y compuestos pécticos, formándose una capa de restos celulares en la región placento-calazal. Durante el desarrollo de la semilla de sorgo (y otros cereales como el trigo) la dinámica de acumulación de biomasa sigue una tendencia sigmoide, al final de la cual ocurre una pequeña disminución debido a las pérdidas originadas por la respiración del embrión. Las semillas fisiológicamente inmaduras, o sea, aquellas que no han alcanzado el valor máximo de biomasa, germinación y vigor, pueden germinar por una mayor difusión de giberelinas a través del embrión y una menor biosíntesis de ácido abscísico en el escutelo. En las semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) la madurez fisiológica promedio está entre los 35 y 39 DPA. En estudios previos realizados con dos líneas de sorgo (IS9530 y Redland B2, resistente y susceptible respectivamente a la germinación prematura, previa a la madurez fisiológica) se determinó que el comportamiento de susceptibilidad de la línea Redland B2 está relacionada con la interrupción prematura de la latencia. (Benech-Arnold y col., 1995a; Carrari y col., 1998; Mora y col., 2000).

En cuanto a las características de las semillas quiescentes deshidratadas se sabe que su endospermo se encuentra en estado vítreo, el cual posee una alta viscosidad. Existen moléculas que favorecen la formación del estado vítreo; entre ellas los oligosacáridos, las proteínas y algunos azúcares de cadena larga. Es importante mencionar que la mayoría de las semillas ortodoxas contienen una mezcla de sacarosa con rafinosa o con otros oligosacáridos en elevadas concentraciones (Leopold y col., 1994)

El estado vítreo de las semillas proporciona estabilidad física y en conjunto con otras características, las protege contra algunas reacciones de deterioro. En este sentido, durante el proceso de desecación protege a las proteínas (por ejemplo enzimas) de la desnaturalización y también protege la integridad de las membranas. Se sugiere que las características antes mencionadas participan en la estabilidad de las semillas al someterse a almacenamiento por largos periodos. (Leopold y col., 1994)

Por otro lado, se ha reportado que el pericarpio (o testa) es un posible causante de la latencia en las semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), ya que se ha observado que la escarificación mecánica o tratamientos con agua caliente permiten la rápida germinación de la semilla latente de sorgo, de forma tal que el pericarpio puede actuar como barrera al intercambio gaseoso o bien como una barrera mecánica para la germinación. De igual forma se observó en experimentos previos que al germinar los embriones aislados de los dos tipos de semillas de sorgo antes mencionados (Redland B2 e IS9530), la velocidad de germinación se iguala sugiriendo que las cubiertas participan en la latencia de estas semillas. Asimismo, se ha reportado que no hay inhibidores solubles en el pericarpio de las semillas latentes (Clark y col., 1968; Steinbach y col., 1997).

### **2.3 Desarrollo de la Semilla**

El proceso de formación de la semilla comienza a partir del término del proceso de polinización en las estructuras reproductoras de la planta. De tal forma que se distinguen tres fases de desarrollo de la semilla: 1) Comienza con el desarrollo del embrión. Después de la fusión sexual, se produce una rápida división celular y al final de este estado el embrión, que será el que dará lugar a una nueva planta durante la germinación de la semilla, está casi completamente formado. El contenido de humedad en esta primera etapa es bastante alto, así como la actividad respiratoria. 2) Continúa con la acumulación de reservas alimenticias, las cuales se sintetizan en diversas partes de la planta y son transportadas a la semilla en desarrollo. Estas reservas se depositan fuera del embrión, formando el endospermo de la semilla. En las semillas llamadas no endospérmicas, el material de reserva es absorbido en el embrión y almacenado en hojas especiales llamadas cotiledones. Durante esta segunda fase, el contenido de humedad desciende hasta un 50 % aproximadamente, al mismo tiempo que disminuye la actividad respiratoria. Al final de esta etapa, se puede decir que la semilla está estructuralmente completa. 3) Última fase de maduración de la semilla. Durante esta fase las semillas ortodoxas, prácticamente no aumentan el contenido de



materia y la humedad desciende hasta un 10-20 %. Se separa la conexión con la planta madre, cortando el suministro de agua y formando un punto de debilidad estructural del que se puede separar fácilmente la semilla madura. La pérdida de humedad de la semilla está acompañada normalmente por cambios de coloración, tanto de la semilla como del propio fruto, degradándose la clorofila y adquiriendo tintes entre amarillo, marrón y negro, dependiendo de las especies. En algunas especies hay también cambios en la textura del endospermo, tornándose duro y firme (Ting, 1982)

Existen muchas variaciones en la duración de cada etapa del desarrollo de una semilla, ya que se requiere de tiempos variables y condiciones particulares que dependen de las especies y de las condiciones ambientales imperantes durante el desarrollo.

## **2.4 Germinación**

El proceso de germinación inicia cuando la semilla se rehidrata. La rehidratación o imbibición de una semilla ocurre en tres etapas. En la fase I se lleva a cabo la absorción inicial del agua y es consecuencia principalmente del potencial mátrico dado por las macromoléculas constituyentes de las semillas. Esta etapa ocurre tanto en semillas viables (latentes o no), como en las no viables. Es independiente de la actividad metabólica de la semilla y se inicia rápidamente al entrar la semilla en contacto con el agua. La fase II corresponde a un periodo en que prácticamente no hay ganancia de peso fresco, no obstante, es un periodo de metabolismo activo que prepara la germinación. Esta etapa incluye la reactivación de las enzimas y otras moléculas hidratadas (hay un rápido aumento en la actividad respiratoria, se forman los polisomas usando primero los ARNm almacenados y se incrementa la transcripción y la síntesis de proteínas). Los ribosomas extraídos de las semillas imbibidas son muy activos en la síntesis de proteínas y se requiere una respiración activa en la cual se utilizan las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas del embrión que contribuyen al crecimiento hasta el establecimiento de la plántula autotrófica (Bewley, 1997). La germinación (protusión de la radícula) ocurre entre las fases II y III. La Fase III

ocurre después de la germinación y sólo la presentan las semillas viables no latentes (Fig. 4) (Moreno, 1996; Bewley, 1997).

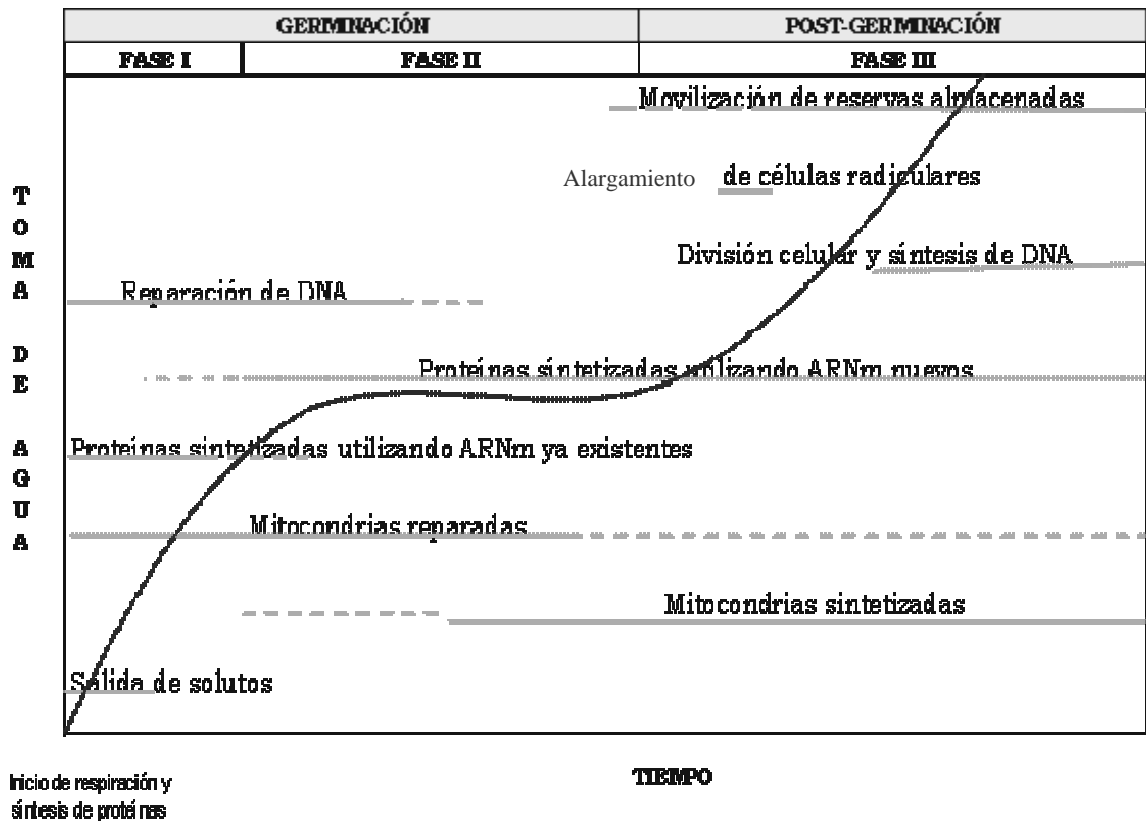


Figura 4. Cronograma del proceso de germinación. Se muestran los eventos más importantes asociados con la hidratación de una semilla (tomado de Bewley, 1997)

Durante esta última fase la actividad metabólica es alta, incluye el inicio de la movilización de las reservas almacenadas en el endospermo por parte de las hidrolasas sintetizadas en la capa de aleurona. Tal proceso se inicia con la exportación de minerales y la secreción de hidrolasas y termina cuando los remanentes de las células son digeridos por las enzimas apoplásticas. Se sabe que hay una variedad de factores internos u orgánicos (dadas las características propias de la semillas) y factores físicos o ambientales que controlan la germinación en las semillas (Baskin y Baskin, 1998).

La imbibición permite que el embrión libere GAs, que se difunden a la capa de aleurona donde inducen la secreción de un espectro amplio de hidrolasas

(nucleasas, amilasas, etc.) que degradan al almidón del endospermo. Los productos de la actividad hidrolítica, tales como la glucosa, maltosa y péptidos son transportados al escutelo donde son modificados antes de que lleguen al embrión en crecimiento. Además de la aleurona, el escutelo también secreta enzimas hidrolíticas para ayudar a la movilización de las reservas, ya que en cebada se ha observado que los genes de amilasa que son regulados por GA en la aleurona también son expresados en el escutelo. Se ha observado que inhibidores de la biosíntesis de GAs no inhiben el incremento en la producción de amilasa durante la germinación sugiriendo que el embrión moviliza precursores de GAs ya almacenados más que sintetizar GA's *de novo* (Ritchie y col., 1999).

En estudios previos realizados con ambas líneas de sorgo, se determinó que la susceptibilidad al BPC de la línea Redland B2 está relacionada con la interrupción prematura de la latencia. Es decir, que las semillas susceptibles (Redland B2) presentan altas tasas de germinación al alcanzar la madurez fisiológica. En la figura 5 se muestra el comportamiento contrastante antes mencionado del índice de germinación (IG) de las semillas de la línea Redland B2, el cual se incrementa a partir de los 35 DPA con relación al de las semillas de la línea IS9530 que inicia hasta los 55 ó 60 DPA (Benech-Arnold y col., 1995a; Carrari y col., 1998)

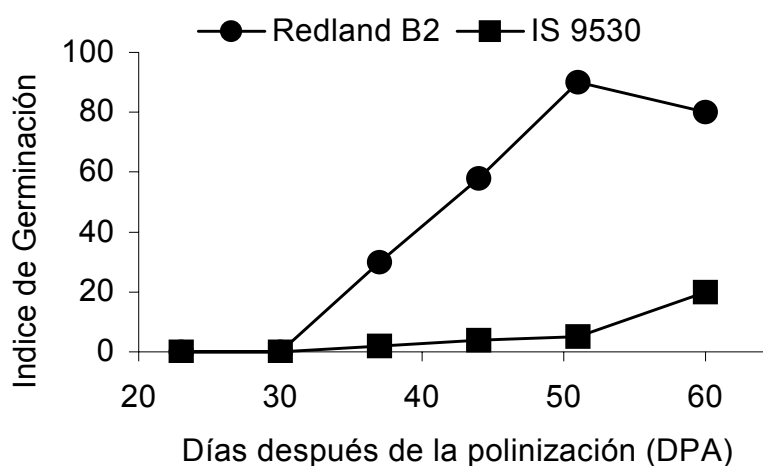


Figura 5. Índice de Germinación de semillas con scBPC. Se observa el comportamiento diferencial del índice de germinación durante la ontogenia de

las líneas IS9530 (resistente al BPC) y Redland B2 (susceptible al BPC) (Benech-Arnold y col., 2000).

## 2.5 “Priming” y Germinación

La adecuada germinación de las semillas es importante para la horticultura y la agricultura, como ya se había mencionado anteriormente. Un IG irregular llevaría a varios problemas para el tiempo de cosecha, por lo que existen varios métodos para poder homogenizar tanto la velocidad como el tiempo de germinación, que consisten en tratamientos químicos o físicos. Tal procedimiento se denomina “priming”.

Existen varios tratamientos por ejemplo: “priming”-osmótico (osmo-“priming”), en el cual se utilizan soluciones osmóticas para controlar la entrada de agua; “priming”-mátrico (matrix“priming”) donde se utilizan acarreadores sólidos de agua, por ejemplo mezclas de arcilla y agua; “priming”-hídrico (hydro“priming”) en donde se agregan consecutivamente cantidades específicas de agua a las semillas; y finalmente “priming” térmico (thermocure treatment) el cual fue propuesto por la empresa INCOTEC y que consiste en aumentar el límite de temperatura crítica (10°C más que la temperatura promedio) para la germinación, de tal forma que se puede establecer una elevada velocidad de germinación a pesar de las condiciones climáticas cálidas (<http://www.voeding.tno.nl>; <http://www.incotec.com>)

El objetivo principal de cualquier método de “priming” es dar a la semilla un pretratamiento que provea agua a la semilla de una forma controlada recordando que las diferentes actividades fisiológicas y/o de desarrollo dentro de la semilla, ocurren en distintos niveles de humedad. Esto permite activar las primeras etapas del proceso germinativo es decir, que se acorta la fase lag o metabólica (correspondiente a la segunda fase en el cronograma del proceso de germinación de Bewley, Fig. 4). Tal fase metabólica se da después de que la semilla se ha imbibido completamente y antes de la protusión de la radícula. En las semillas que recibieron el pretratamiento de “priming” y que avanzaron

por esta fase intermedia, desarrollan al rehidratarse el metabolismo retenido que alcanzaron en dicho pretratamiento, por lo que el tiempo de germinación puede ser reducido hasta un 50% (<http://www.voeding.tno.nl>; <http://www.incotec.com>)

Dentro de los beneficios lógicos del proceso de “priming” se destacan el que se elimina o disminuye el grado de latencia y se incrementa la velocidad de germinación, ya que las plántulas emergen más rápido del suelo y por tanto no se exponen por mucho tiempo a las adversidades climáticas.

Sin embargo, el proceso de “priming” tiene la gran desventaja de reducir la longevidad de las semillas ya que éstas se vuelven más sensibles al daño si después del tratamiento se almacenan. Se han realizados varios experimentos con la finalidad de contrarrestar estos efectos en semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) y de la flor “pensamiento” (*Viola x wittrockiana*); y se observó que al someter las semillas a un estrés moderado post-“priming”, se podía reducir el daño en la longevidad de las semillas. Tal estrés consiste en incubaciones en PEG (polietilenglicol) en la etapa previa a la germinación, deshidrataciones por exposición al aire con 75% de humedad relativa (HR) e incubaciones en altos porcentajes de HR ambiental; además de tratamientos de calor (30°C) por tres horas. La duración óptima y el grado del estrés aplicado son dependientes de la temperatura y de la especie manejada (Bruggink y col., 1999; <http://veghome.ucdavis.edu>).

Por otra parte, se ha demostrado que la longevidad de las semillas y la tolerancia a la desecación están relacionadas. Ya que se asume que los métodos de inducción de tolerancia a la desecación confieren longevidad durante el mismo proceso de desecación de la semilla (Bruggink y col., 1999).

La similitud en los métodos de longevidad (arriba mencionados) y de los métodos de tolerancia a la desecación, indican que se encuentran involucrados los mismos mecanismos bioquímicos y fisiológicos. Es decir, que ambos procesos tiene la finalidad de activar tres sistemas biológicos importantes en la

semilla: las enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos, las proteínas especializadas en la protección contra la desecación (proteínas LEA), y enzimas antioxidantes. Tanto los osmolitos como las proteínas LEA contribuyen a la estabilización de las membranas y las proteínas confiriendo hidratación preferencial en etapas de desecación moderada y reemplazando el agua en etapas de extrema desecación. Los osmolitos también contribuyen al ajuste osmótico y actúan como secuestradores del radical hidroxilo (Serrano y Montesinos, 2003).

Considerando el objetivo fundamental del proceso de “priming”, así como los procesos bioquímicos que involucra, se puede considerar que aunque esté definido como un proceso post-cosecha inducido, se puede dar un proceso similar al “priming” por procesos indirectos como: aumento en la humedad relativa ambiental (como consecuencia de las condiciones climáticas), una morfología protectora incompleta o deficiente en las semillas en desarrollo o por un inadecuado almacenamiento de las semillas maduras, teniendo como resultado en cualquier caso alteraciones en el comportamiento natural de las semillas ocasionado por los mecanismos bioquímicos activados.

## **2.6 Latencia de las semillas**

La latencia, se define como la incapacidad de una semilla viable para completar la germinación en condiciones favorables (Bewley, 1997).

La latencia que resulta de algunas características de la semilla, que previenen la germinación, se llama latencia orgánica. Se considera que existen dos tipos de latencia orgánica: la endógena, en la que alguna característica del embrión previene la germinación; y la exógena, donde algunas características de las estructuras que cubren el embrión (incluyendo el endospermo, la testa, el pericarpo, etc.) previenen la germinación; por ejemplo, cuando la impermeabilidad de la testa y/o del exocarpo previene la germinación (Baskin y Baskin, 1998).

A su vez, la latencia endógena y exógena se subdividen en:

#### Latencia Endógena

- Latencia Fisiológica: Es causada por un mecanismo de inhibición fisiológica del embrión, aunque no se descarta la participación tanto del endospermo como de la testa y las paredes de los frutos indehiscentes. Se distinguen tres niveles: no-profunda, intermedia y profunda.
- Latencia Morfológica: Está relacionada con la inhibición de la germinación durante la etapa de desarrollo y crecimiento del embrión (maduración), es decir, inhibición por características morfológicas.
- Latencia Morfofisiológica: Es una combinación de latencia morfológica y fisiológica y se presenta en semillas con embriones rudimentarios.

#### Latencia Exógena

- Latencia Física: Está relacionada con la impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua o gases, dada generalmente, por la presencia de células lignificadas en la testa.
- Latencia Física y Fisiológica: Existe en algunas semillas que presentan cubiertas impermeables y embriones latentes.
- Latencia Mecánica: Es causada por la presencia de un exocarpo duro y/o leñoso.
- Latencia Química: Se debe a la presencia de inhibidores producidos en, o translocados a, la semilla que bloquean el crecimiento del embrión. Estos inhibidores de la germinación se han encontrado en el embrión, endospermo, testa y, en algunas especies, en las estructuras que se dispersan junto con las semillas. Una complicación en el estudio de la latencia química es que sus causas pueden ser de dos tipos: 1) que el embrión se vuelva más sensible a los inhibidores de la germinación, 2) que se dejen de producir sustancias promotoras de la germinación (por

ejemplo GAs que contrarrestan los efectos de los inhibidores). Se han realizado investigaciones donde se ha observado que cuando se aplica exógenamente ABA y GAs a las semillas de *Corylus avellana*, el ABA antagoniza a las GAs. Por otro lado, se ha observado que las GAs superan los efectos inhibitorios del ABA en cariopses intactos de *Hordeum vulgare* pero no en los embriones aislados (Bradbeer y Pinfield 1966, Dunwell, 1981)

La latencia confiere a las semillas ventajas adaptativas que amplían y optimizan la distribución espacio-temporal de la germinación dentro de una población de semillas. Así, algunas pueden persistir por muchos años en el suelo antes de germinar. Se ha observado que las funciones celulares y metabólicas, que ocurren antes de que se complete la germinación en semillas sin latencia, también ocurren en aquellas con latencia. Por lo tanto, las semillas latentes pueden realizar la mayoría de los procesos metabólicos para germinar pero aún no se conocen las causas de que el eje embrionario no crezca y no se complete la germinación (Bewley, 1997)

La latencia representa un problema para los productores de cultivos de importancia agronómica (en particular en cereales) donde se requiere una germinación y crecimiento rápidos y homogéneos, ya que la latencia retrasa la germinación. Además de que si se trata de una población de semillas con distinto grado de latencia, la germinación es heterogénea lo que también ocasiona problemas en la cosecha. A pesar de estas desventajas de la latencia en la agricultura intensiva, es necesario un cierto grado de latencia en las semillas para prevenir la germinación precoz o BPC de los granos mientras todavía se encuentran en la planta parental (Bewley, 1997).

Un gran número de estudios indican que las semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) son latentes durante las primeras etapas de maduración. En 1967, Clark y colaboradores trabajaron con tres variedades de semillas de sorgo (*Martin*, *Combine Kafir-60* y *Teterita*) y propusieron tres mecanismos involucrados en la latencia: uno asociado con la cantidad de agua inicial de la



semilla: ya que al realizar una curva de germinación con semillas recién cosechadas de las tres variedades de sorgo antes mencionadas, sin pasar por un proceso de deshidratación, se observó que todas tuvieron un IG bajo. Tal comportamiento es justificado debido a que cuando las semillas tienen un alto contenido de humedad, la relación osmótica dentro de éstas puede prevenir que el embrión se imbibiera, evitando que tomen suficiente agua para germinar, disminuyendo de esta forma el IG. Este impedimento de entrada de agua al embrión puede resultar de la naturaleza del endospermo, por lo que si se disectan los embriones se removería el ambiente interno desfavorable para la germinación. Se considera entonces que el proceso de deshidratación es necesario ya que llevaría a una pérdida del contenido de agua debajo del 25% teniendo como consecuencia cambios en las propiedades del endospermo generando una relación osmótica favorable para la imbibición subsecuente.

El segundo mecanismo está asociado con el crecimiento activo de las semillas y funciona hasta que se completa o cesa el crecimiento alcanzando la acumulación máxima de peso seco; y el tercer mecanismo está influenciado por la velocidad de desarrollo de la semilla, ya que se ha observado que el desarrollo acelerado de las semillas está asociado con un mayor grado de latencia.

En particular en sorgo se ha observado que la susceptibilidad diferencial al BPC de ambas líneas se pierde cuando se germinan embriones aislados o semillas que se han almacenado por más de tres años (Benech-Arnold, 1995b). En concordancia con estos resultados se detectaron diferencias en la expresión del gen de la GA 20 oxidasa en las semillas de ambas líneas, ya que se encontraron altos niveles de expresión en los embriones de las semillas con baja latencia mientras que casi no se detectaron en los embriones latentes. Asimismo se encontró que el ABA inhibe la expresión de este gen disminuyendo los niveles de GAs (Pérez-Flores y col., 2003) Estos resultados sugieren que la latencia diferencial de ambas líneas pudiera deberse a la existencia de un factor en la cubierta que regula la expresión de este gen y que

podiera ser, por ejemplo el ABA. Otra causa de la latencia pudiera ser las características de la testa (grosor, presencia de células lignificadas, etc.).

## **2.7 Efectos Climáticos sobre el desarrollo y la latencia de las semillas**

El problema actual en cuanto al cambio climático es que las actividades del hombre están agudizando el efecto invernadero, llevando a cambios significativos en la temperatura y en todo el sistema del clima. Cuando se revisa el promedio de la temperatura global de la Tierra durante el último siglo, es notorio que las temperaturas han subido 0.5°C. La década de los 90 del siglo XX ha registrado las temperaturas más altas. Aunque es difícil aportar pruebas concluyentes de que el incremento de CO<sub>2</sub> esté provocando el calentamiento de la Tierra, se cree que las dos tendencias – mayor dióxido de carbono y temperaturas más elevadas – están relacionadas (<http://www1.ceit.es>)

La agricultura depende, principalmente, del clima, ya que el calor, la luz y el agua son los factores que más afectan al crecimiento de las plantas. Los efectos que ejercen son más evidentes en unas zonas que en otras. Son especialmente sensibles aquellas zonas donde los suelos, el terreno y el clima son extremos o tienen cambios constantes, de forma tal que es más difícil que el cultivo se adapte a dichos cambios; además existen otros factores en países menos desarrollados, donde no se dispone de la tecnología suficiente para prevenir los efectos devastadores de las sequías y las inundaciones (<http://www1.ceit.es>).

Se ha demostrado que hasta una sola planta produce semillas con distintos grados de latencia innata, es decir, una distribución discontinúa de los periodos de latencia. En algunos casos los diferentes tipos de semillas producidos por plantas de la misma constitución genética pueden estar relacionadas con las condiciones ambientales a las cuales fue sometida la planta parental durante el periodo de formación y maduración de la semilla (Roberts, 1972).

Se ha reconocido por diferentes autores que los efectos maternos contribuyen substancialmente al fenotipo (latencia, dispersión y velocidad de germinación) de un individuo. Tales efectos pueden ser considerados en tres niveles: 1) los compuestos del citoplasma genético, tomando en cuenta que varios organelos (por ejemplo plastidios, mitocondrias) son transferidos directamente de la planta materna durante la formación y desarrollo del óvulo; 2) el endospermo nuclear, ya que la formación de éste implica 2 núcleos de origen materno y uno de origen paterno; y finalmente 3) el fenotipo materno, que implica el genotipo y/o el ambiente (temperatura, humedad, nutrientes, luz) en el que se encuentran, las plantas parentales. La influencia de este último factor puede ocurrir en dos niveles:

- Estructural, ya que los tejidos que rodean el embrión en desarrollo son de origen materno, estos tejidos (los integumentos del óvulo y la pared celular del ovario) eventualmente forman la cubierta de la semilla. Se ha observado en experimentos previos que la temperatura y la duración del día afecta el tamaño de la semilla.
- Fisiológico, debido a que el contenido de hormonas varía dependiendo de las condiciones ambientales, por ejemplo el contenido de ABA aumenta cuando hay un estrés hídrico y disminuye cuando hay bajas temperaturas al igual que es alterado por la nutrición de la planta parental. Se ha determinado que la temperatura afecta tanto la velocidad de acumulación de peso seco (madurez fisiológica) como el periodo de desarrollo de la semilla. También se ha demostrado en varias semillas que la exposición a cambios de temperatura resultan en una disminución de la latencia (Roach y Wulff, 1987; Allen y Meyer, 1998).

Se sabe que las semillas de diferentes poblaciones o bien, de diferente origen geográfico, generalmente varían en los requerimientos para germinar y en el nivel de latencia. Es más, en algunas especies de plantas que se transfieren de una latitud a otra muestran una influencia directa de su nuevo ambiente en la

inhibición de la germinación por modificación de la testa. Sin embargo, una respuesta general implica que cuando las semillas son cosechadas y cultivadas en un hábitat distinto al hábitat original, las semillas germina, ya sea muy rápido (por ejemplo de un ambiente cálido a uno de invierno severo) o muy tarde (por ejemplo de un ambiente frío a un ambiente templado) (Roberts, 1972; Roach y Wulff, 1987; Allen y Meyer, 1998).

Al mismo tiempo, la latencia de las semillas en la planta madre es afectada por el fotoperiodo (duración del día). La latencia de semillas de avena (*Avena fatua*) producidas en plantas crecidas con un fotoperiodo de 12 hrs. durante la emergencia de las panículas, es mucho mayor que las producidas en plantas con un fotoperiodo de 18 hrs. De hecho, en estas mismas semillas se determinó que las semillas cultivadas en latitudes hacia el sur tenían menor producción de panículas que aquellas que tuvieron su origen en zonas hacia el norte (Somody y col., 1984)

De igual forma, se determinó en experimentos realizados con distintas variedades de avena (*Avena fatua*) que tienen distinto lugar de origen y/o características de crecimiento, que las características morfológicas no se relacionan necesariamente con la fecha de brotado de panículas o con el grado de latencia, sino que el brotado de panículas se relaciona con la latitud de origen y la producción de panículas con los fotoperiodos largos. Concluyendo que la influencia del ambiente en la morfología y la latencia es dependiente de la especie y el lugar de origen de ésta (Somody y col., 1984).

Cómo se había mencionado anteriormente, el nivel de latencia de las semillas es determinado por varios factores que incluyen origen genético, ambiente materno durante la maduración, la edad de la planta madre durante la maduración y posición de la semilla en la planta. En adición a esto, las diferentes condiciones durante la estratificación natural causa un mayor o menor grado en el nivel de latencia. Tales condiciones participan en la variación del porcentaje de germinación entre poblaciones; así como

diferencias en la germinación entre semillas cosechadas en diferentes años (Anderson y Milberg, 1998).

Al realizarse experimentos con semillas de cuatro especies diferentes (*Silene noctiflora*, *Sinapis arvensis*, *Spergula arvensis* y *Thlaspi arvense*), cosechadas en tres zonas cada una en 1994 y 1995; se observaron variaciones en la latencia de las semillas en todos los niveles (entre individuos, entre zonas y entre semillas cosechadas en diferentes años). Aunque no se pueden atribuir las diferencias de latencia entre poblaciones a los diferentes ecotipos (ya que fueron cultivadas en un área restringida), es posible, que a pesar de que las plantas estuvieron cercanas y por tanto sometidas a las mismas condiciones, tengan respuesta distinta o tengan distinta disponibilidad de nutrientes en el suelo. Por otra parte, pequeñas diferencias en el tiempo de desarrollo pueden causar que las semillas maduren a diferentes temperaturas o a diferentes condiciones de humedad (Andersson y Milberg, 1998).

Por otro lado, la variación del grado de latencia entre años de cosecha se explica como una adaptación de las poblaciones a climas desfavorables. Lo que sugiere que las poblaciones de ambientes más favorables pero también impredecibles muestran mayor variación en las características de germinación entre años que aquellas de ambientes extremos pero predecibles (Andersson y Milberg, 1998).

Independientemente del factor que influya en la germinación de las semillas, el destino de las semillas bajo condiciones naturales depende de su capacidad para germinar con la finalidad de que se maximice la sobrevivencia de la plántula.

Otras investigaciones respecto a las condiciones de desarrollo se llevaron a cabo por Romagosa y colaboradores, (2001) quienes utilizaron semillas de cebada Triumph y TL43. La línea TL43 presentaba una germinación acelerada, una disminución de la latencia y toleraba un incremento de diez veces más en los niveles de ABA antes de que se inhibiera su germinación (es decir, era diez

veces menos sensible al ABA) que la línea Triumph. Ambas líneas fueron cultivadas en ambientes de alta y baja inducción de latencia en los años 1997, 1998 y 1999 en España; y 1998 y 1999 en Escocia. Ambas líneas fueron completamente latentes en las primeras dos semanas post-antesis, subsecuentemente TL43 se liberó de la latencia primaria en las primeras etapas de llenado de la semilla. En España la línea TL43 disminuyó su latencia y las semillas germinaron precozmente durante su desarrollo en comparación con las de la línea Triumph. Mientras que al llegar a la madurez TL43 presentó un mayor porcentaje de germinación. Aunque los autores no definen una relación entre la concentración de ABA y las diferencias en el grado de latencia, sí determinaron que la disminución de la latencia, la insensibilidad al ABA y la similitud al fenotipo *abi* (mutantes insesibles al ABA) son parte de un fenómeno común, más que eventos fenotípicos independientes.

Finalmente, existe una relación funcional entre la latencia y la viabilidad. Barton (1961) en Roberts 1972 señaló: “La latencia del embrión es importante para la germinación y por lo tanto, en las pruebas de viabilidad, pero no hay una relación directa con la longevidad”. Por otro lado, existen evidencias de que las especies cultivadas, muestran menor latencia que las especies silvestres, por lo tanto, también presentan un periodo reducido de viabilidad bajo condiciones ambientales comparables (Roberts, 1972)

## **2.8 Especies Reactivas de Oxígeno**

### **2.8.1 En el desarrollo y la germinación**

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son consideradas como moléculas tóxicas, cuya acumulación lleva a daños celulares, y por tanto, a alteraciones en el proceso de desarrollo de la semilla y germinación (Bailly, 2004).

Existen varios procesos que generan intermediarios altamente reactivos ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot -}$ ), en particular en las semillas, son los cambios dramáticos en la humedad y en la actividad metabólica. En el caso de las semillas ortodoxas, la

respiración es considerablemente alta durante los primeros estados de la embriogénesis, subsecuentemente disminuye durante la fase de desecación en la planta parental y es prácticamente nula cuando la semilla es quiescente. Por otro lado, la germinación está asociada con un alto incremento en la actividad respiratoria y una mayor producción de EROS. Existen mecanismos de detoxificación de EROS (sistemas antioxidantes) que incluyen mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa, etc.) y no enzimáticos (ácido ascórbico, glutatión, flavonas, carotenoides, etc.) (Bailly, 2004).

Se sabe que la tolerancia a la desecación o los daños celulares durante la desecación en semillas ortodoxas están relacionados con procesos oxidativos, es decir, que los procesos de deshidratación y rehidratación de las semillas están asociados con cambios en el balance de contenido de EROS y de actividad de enzimas antioxidantes (Bailly, 2004).

### **2.8.2 En la latencia y almacenamiento de semillas**

Las semillas se deterioran y pierden su viabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento. Los dos factores ambientales mas importantes que influyen en la velocidad de los procesos deteriorativos en el envejecimiento de las semillas son la humedad relativa, la cual controla el contenido de humedad, y la temperatura. Se sabe que estos factores tienen consecuencias devastadoras en casi todos los procesos fisiológicos de la célula, en particular, el ADN y ARN son degradados, las membranas también muestran un incremento en la permeabilidad y aumentan los niveles de EROS.

Se ha demostrado que el aumento en los niveles de EROS está involucrado en la regulación de la expresión de varios genes responsables del cambio de un estado en desarrollo a un estado germinativo. Una de las posibilidades propuestas es que las EROS activen factores de transcripción por cambios en el estado redox. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce ciento trece genes e inhibe otros sesenta y dos (Bailly, 2004).

Por otro lado, experimentos en semillas de cebada y arroz sugieren que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la germinación eliminando así la latencia de éstas. Wang y colaboradores (1995) en Bailly (2004) demostraron que el tratamiento de las semillas de cebada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaba en un decremento en los niveles de ABA endógeno.

La acumulación de EROS ha sido considerada como uno de los principales factores de daño celular durante el almacenamiento de las semillas. Smith y Berjak (1995) en Bailly (2004) sugieren dos fases en las que las EROS afectan a las semillas. Una primera fase es durante el almacenamiento, las semillas ortodoxas usualmente contienen bajos niveles de agua, sin embargo, este nivel puede dar lugar a reacciones de auto-oxidación y por tanto a la producción de radicales libres. En esta primera etapa *in vivo*, las actividades enzimáticas de detoxificación son casi nulas y por tanto no se puede remover las EROS, llevando a un efecto deletéreo directo en los componentes celulares (lípidos, enzimas, estructuras protéicas, ácidos nucleicos) o a ser atrapados en estructuras intracelulares. Una segunda etapa es durante la imbibición y germinación de las semillas previamente almacenadas, ya que es en éste momento cuando se expresan las disfunciones celulares resultantes de la acumulación de EROS. Las células entonces tienen que disminuir el estrés oxidativo cuya intensidad depende de las condiciones de almacenamiento; es en este proceso cuando las semillas pueden aumentar su tiempo de germinación (Bailly, 2004)

## **2.9 Brotado Pre-Cosecha (BPC) o Germinación Prematura**

El BPC ocurre generalmente durante la maduración de las semillas, cuando todavía se encuentran en la panícula de la planta parental, si en el ambiente existen altos niveles de humedad ambiental (por ejemplo cuando la cosecha coincide con la época de lluvias) (Kermode, 1990).



El BPC produce grandes pérdidas económicas en la industria agrícola debido a las siguientes razones:

1. La pérdida de la viabilidad de las semillas como resultado de la desecación subsecuente, cuando el proceso de germinación ha avanzado más allá del "punto de no retorno" (Castor y Frederick, 1997),
2. La hidrólisis de almidón en el endospermo, que resulta en la disminución del peso del grano (con la subsecuente pérdida de rendimiento), así como en un aumento en la susceptibilidad al ataque de hongos saprófitos
3. Un acortamiento significativo en la longevidad de las semillas (Benech-Arnold, 1995a)

Las bases fisiológicas y moleculares de la resistencia al BPC han sido estudiadas intensamente por el grupo de Benech-Arnold y colaboradores (1995 a, 1995b, 2000), en particular en dos líneas de sorgo granífero con distinta susceptibilidad contrastante al BPC dependiendo de las condiciones del cultivo. Estas líneas son IS9530 la cual muestra un comportamiento de resistencia al BPC, y Redland B2 que es susceptible al BPC en condiciones de alta humedad.

Recientemente se ha aplicado el mapeo de QTLs para identificar regiones del genoma que afectan la latencia y BPC en cereales. También se han aplicado estrategias de genética comparativa con los resultados obtenidos anteriormente tomando como base la sintenia en cereales (Gale y col., 2002; Wilkinson y col., 2002)

## **2.10 Participación de las Hormonas Vegetales en el BPC y la Latencia**

Las diferencias en la susceptibilidad al BPC se han atribuido, en primera instancia a los niveles de ABA y/o a la sensibilidad de los tejidos a esta hormona vegetal. En estudios previos en sorgo se observó que no hay diferencias significativas en la cantidad de ABA endógeno presente en las dos

líneas de IS9530 (resistente al BPC) y Redland B2 (susceptible al BPC). Sin embargo, sí se encontró diferencia entre las dos líneas en su sensibilidad al ABA siendo diez veces más sensible IS9530 que la línea Redland B2. A pesar de esto, la participación del ABA no explica en su totalidad la susceptibilidad al BPC (Benech- Arnold y col., 1995a).

Recientemente se ha demostrado que el grado de latencia en las semillas en desarrollo de sorgo, depende de la capacidad con la que la acción del ABA es contrarestanda por el efecto de las GAs. Existen evidencias que indican la participación de las GAs en el grado de latencia de las semillas. Por ejemplo, en experimentos realizados por el grupo de Benech-Arnold y colaboradores (1995a), aplicando paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de GAs) en etapas tempranas (7 DPA) se observó un alto grado de latencia en cariopses en desarrollo de la línea susceptible al BPC (Redland B2); también existe evidencia de que al aplicar fluridone, un inhibidor de la biosíntesis del ABA, en etapas tempranas del desarrollo de la semilla se disminuye la latencia en la línea resistente al BPC (IS9530). Por otro lado, la aplicación de GAs estimula la germinación de granos en desarrollo latentes. Estos estudios indican que los procesos involucrados en el control del BPC en sorgo, dependen del balance entre los dos tipos de hormonas vegetales: el ácido abscísico (ABA), el cual es un inhibidor de la germinación, y las giberelinas (GAs) que la promueven. El balance hormonal estará determinado por los niveles endógenos de estas hormonas y/o por la sensibilidad de los tejidos a ellas (cantidad de receptores y/o afinidad de éstos por las hormonas).

### **2.10.1 Ácido Abscísico (ABA)**

El ABA es un sesquiterpenoide de 15 carbonos sintetizado en forma parcial en cloroplastos y otros plástidos por la ruta del ácido mevalónico. Esta fitohormona participa en varios procesos dentro de la planta, tales como las respuestas a distintos tipos de estrés (hídrico, salino, térmico, etc.). El ABA endógeno se acumula en etapas tempranas de maduración de la semilla además de que puede inducir la síntesis de proteínas de almacenamiento en semillas e inhibir

proteínas relacionadas con la movilización de reservas (evento post-germinativo) (Zeiger y Taiz, 1998; Bewley, 1997).

Los niveles de ABA en las semillas generalmente se incrementan durante la primera mitad del desarrollo de la misma, cuando el peso seco está aumentando, y disminuyen en la segunda parte cuando el contenido de agua está declinando (Baskin y Baskin, 1998).

El papel directo del ABA en la latencia no es claro. Se ha reportado en estudios previos que una alta concentración de ABA no necesariamente induce la latencia, es decir que el ABA no es necesario para mantener la latencia secundaria y que cuando los niveles de ABA disminuyen no siempre se rompe la latencia. Por lo que estas observaciones han llevado a la conclusión que los efectos del ABA pueden estar influenciados tanto por los niveles de esta hormona como por la temperatura de incubación y/o por la variación en la sensibilidad del tejido embrionario al ABA en los diferentes estados del desarrollo (Walker-Simmons 1987, Welbaum y col., 1990).

Las evidencias más interesantes y sugerentes para el papel del ABA en el control de la germinación de las semillas en desarrollo se encuentra en diversos casos de viviparidad. Esta condición se caracteriza, por la germinación del embrión en la planta parental, esto es, que no hay una etapa definida de quiescencia (interrupción entre la maduración de la semilla y la germinación) además de que hay poca o ninguna deshidratación (Kermode, 1990).

La causa de la viviparidad puede ser debida a la ausencia de ABA o la insensibilidad al mismo durante el desarrollo de la semilla y resulta en la germinación precoz de las mismas. Se han aislado diversas mutantes vivíparas en maíz que son deficientes en ABA (por ejemplo *vp5*, *vp2*, *vp7*, *vp9*), o insensibles al ABA (*vp1*), así como en jitomate (mutantes *sit*), y en Arabidopsis mutantes deficientes en ABA (*aba*) e insensibles al ABA (*abi1*, *abi3*) (Xu y col., 1995; Bewley, 1997)

Uno de los mutantes vivíparos mejor caracterizado en maíz es el mutante *vp1* que presenta una sensibilidad reducida al ABA y un fenotipo de germinación precoz. A partir de estudios con estas mutantes se ha encontrado que el gen *vp1* codifica para la proteína VP1, un factor transcripcional que junto con el ABA participa en la regulación de la expresión de distintos genes. En particular VP1 y ABA inducen la expresión de genes de maduración (por ejemplo *Em*) e inhiben la expresión de genes de germinación o postgerminativos (por ejemplo la  $\alpha$  amilasa) (White y Rivi, 2000).

Asimismo, se han observado en maíz que los genes *Vp1* y *O2* (Opaco 2, factor de transcripción que controla la expresión de grupos específicos de proteínas de almacenamiento) también están involucrados en el comportamiento del embrión y del endospermo durante la maduración de las semillas (Ritchie y col., 1999).

Los genes antes mencionados también participan en la tolerancia a la desecación, uno de los pasos finales en el desarrollo de la semilla. La deshidratación no solo lleva a que el grano pueda tolerar ambientes extremos y tener baja actividad metabólica, sino que también parece ser importante para la capacidad subsecuente de la aleurona para responder a las GAs y producir niveles normales de amilasa. (Ritchie y col., 1999).

### **2.10.2 Giberelinas**

Las giberelinas son una familia de hormonas vegetales que participan durante todo el ciclo de vida de la planta. Controlan múltiples procesos de crecimiento y desarrollo, tales como la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la floración y la fructificación; por lo que están presentes en la mayoría de los tejidos vegetales y florales a bajas concentraciones (0.1-100 ng g<sup>-1</sup> de peso fresco) y sus enzimas biosintéticas se encuentran en cantidades similares. Paleg (1960) y MacLeod y colaboradores (1964) demostraron que las giberelinas inducen en las células de la aleurona de cebada la producción de

varias enzimas hidrolíticas que inician la degradación del almidón (Chiang y col., 1995; Hedden y Phillips, 2000a).

Se descubrieron inicialmente en el aislado de un hongo (*Gibberella fujikuroi*) que infecta a la planta de arroz promoviendo un crecimiento aberrante. Posteriormente, se demostró que eran sintetizadas en las plantas. Las GAs son isoprenoides derivados del esqueleto del ent-giberelano; se han identificado aproximadamente 116 estructuras diferentes de GAs pero pocas de ellas se consideran biológicamente activas, entre las características particulares de las GAs activas están, que contienen 19 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en el carbono 3 $\beta$  ó un átomo de carbono 3 insaturado (Lange, 1998).

La biosíntesis de las giberelinas se divide en tres etapas. La etapa I es la biosíntesis del ent-kaureno. La etapa II es la biosíntesis de GA<sub>12</sub> a partir de ent-kaureno, todavía no se sabe cuántas monooxigenasas están involucradas en esta etapa. La etapa III es de gran importancia dado que es en ésta donde se sintetizan las GAs con actividad biológica. Esta etapa involucra la oxidación de la GA<sub>12</sub> aldehído para producir GA<sub>12</sub> por una oxidación en el C7, después la GA 20 oxidasa cataliza varias oxidaciones sucesivas en el carbono 20; además de que también cataliza la pérdida del C20 del precursor aldehído y, por lo tanto, es responsable de la formación de GAs de 19 carbonos, por lo que esta última oxidación se considera un sitio clave en la regulación de la producción de giberelinas con actividad biológica. Eventualmente la 3  $\beta$  hidroxilasa también participa en la activación de algunas GAs de 19 carbonos inactivas las cuales son subsecuentemente inactivadas por la 2  $\beta$  hidroxilasa (Fig. 7).

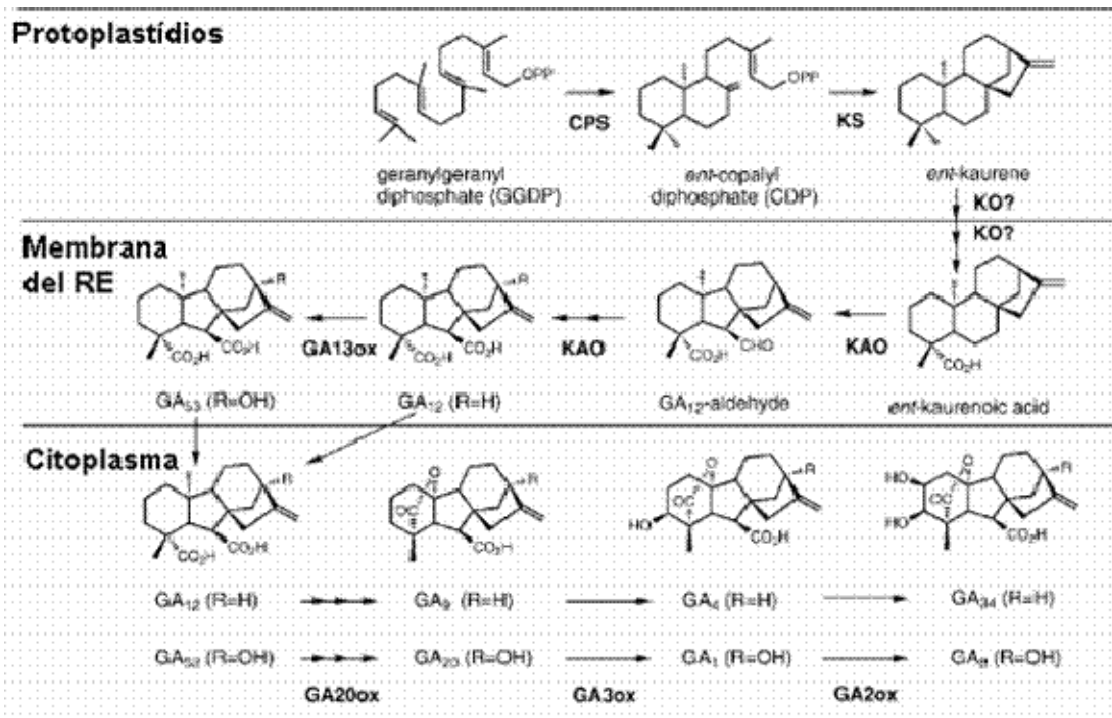


Figura 6. Biosíntesis de las GAs en plantas superiores (Olszewski y col., 2002)

Debido a las diferentes funciones en las que participan las GAs en el desarrollo de la planta se sugiere que la regulación de sus niveles es muy compleja, y en ella participan las enzimas: GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$  hidroxilasa. Otros factores que influyen en el metabolismo de las GAs son: el tipo de tejido, etapa del desarrollo, luz y/o otras hormonas, e incluso una autorregulación por las mismas GAs, ya que se ha observado que existe una retroalimentación negativa de la expresión de los genes de la GA 20 oxidasa y GA 3 oxidasa por las GAs. También se ha observado que la expresión del gen de la GA 20 oxidasa es regulada por la auxina AIA (ácido indol-3-acético) (Lange, 1994,1998; Hedden y Phillips, 2000b).

En particular, la GA 20 oxidasa, es una enzima que limita la velocidad en la síntesis de GAs activas catalizando los últimos pasos de la biosíntesis en el citosol. Esta enzima está codificada por una familia de multigenes. En *Arabidopsis* existen por lo menos tres genes que la codifican (*AtGA20oxi1*, *oxi2* y *oxi3*). Estas enzimas son reguladas por diversas señales incluyendo la calidad de la luz, la duración del día y los niveles de las mismas GAs (Jones y col., 2000).

Por otro lado, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo hay resultados que sugieren que el ABA inhibe a nivel transcripcional la expresión del gen de la GA 20 oxidasa durante la imbibición de las dos líneas de sorgo estudiadas (IS9530 y Redland B2) (Pérez-Flores y col., 2003).

## **2.11 Movilización de reservas como respuesta a hormonas**

En el lapso de tiempo entre la germinación y el establecimiento del crecimiento autotrófico, las plántulas dependen de los nutrientes almacenados en el endospermo de la semilla. Rodeando al endospermo se encuentra una capa de células altamente especializadas que permanecen viables en la semilla madura. La capa de aleurona ayuda a movilizar las reservas de las semillas durante la germinación, sintetizando y secretando una variedad de enzimas hidrolíticas que participan en la degradación de proteínas, lípidos y paredes celulares del endospermo. La segunda estructura relacionada con la movilización de las reservas del endospermo es el escutelo. En monocotiledóneas, éste es un cotiledón altamente modificado que transporta hormonas, produce enzimas digestivas y transporta nutrientes del endospermo al embrión (Ritchie y col., 1999). Entre las hidrolasas más abundantes responsables de la degradación del almidón están las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa. La síntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa es dependiente de GAs esta enzima (Lovegrove y Hooley, 2000).

La capa de aleurona de los cereales ha sido uno de los tejidos más estudiados de las plantas, debido a su importancia en el proceso de malteado y de fermentación. Puede que exista sólo una capa (avena, maíz, trigo) o bien varias capas (cebada y arroz) de células altamente diferenciadas y uniformes que conformen la capa de aleurona. La capa de aleurona es un tejido diferenciado que no se divide, no es fotosintético y se diferencia de las células del endospermo a los 8 ó 10 días después de la polinización (DPA). Cuando el grano de cereal madura todas las células del endospermo mueren pero las células de la capa de aleurona permanecen viables. El citoplasma de estas

células se caracteriza por las numerosas vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSVs) que ocupan la mayor parte de la célula. Éstas también funcionan como el principal almacenamiento de minerales en forma de un complejo cristalino insoluble de K, Mg y Ca con ácido fítico (inositol hexafosfato) llamado fitina en granos de cereales (Bethke y col., 1997).

Se ha observado que las giberelinas estimulan y regulan la producción de  $\alpha$ -amilasa en los granos de cebada sin embrión, así como en las semillas de arroz y trigo (Bethke y col., 1997). Se propone que el receptor de GAs en la aleurona de las semillas de avena silvestre está en la superficie de la célula. Se han identificado dos polipéptidos en la membrana plasmática (18 y 68 KDa) (Ritchie y col., 1999). También se ha encontrado que la sensibilidad de la capa de aleurona a las GAs (en particular GA<sub>3</sub>) se incrementa mientras el pH disminuye de 6 a 3.7. Estos bajos niveles de pH se dan cuando el endospermo de un grano de cereal se imbebe, ya que tienen altos niveles de ácido málico. Este bajo pH se mantiene después de la germinación por ácido fosfórico y cítrico liberado por la aleurona en respuesta a las GAs. El metabolismo de las GAs en la capa de aleurona es rápido, lo que sirve como un mecanismo para la remoción de la señal de las GAs, por lo que la propagación de la señal continuará siempre y cuando la percepción de las GAs activas sea continúa.

La vía de transducción de señales aún no se ha dilucidado del todo; sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que una proteína G heterodimérica podría estar involucrada en la señalización de GAs en las células de aleurona (Gilroy y Jones, 1994; Jones y col., 1998).

La percepción de GAs induce cambios en el Ca<sup>2+</sup> citosólico, se ha observado que la transcripción y síntesis de  $\alpha$ -amilasa no es dependiente de Ca<sup>2+</sup> pero en cambio éste si es necesario para su liberación y el adecuado funcionamiento de la enzima. La  $\alpha$ -amilasa es sintetizada en los ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplasmático (RE) y el Ca<sup>2+</sup> se une a la enzima en el lumen del RE; este proceso se ve facilitado por las proteínas



de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulinas(CaM) y las grandes cantidades presentes del mismo (Schuurink, 1996).

Los resultados sugieren que hay una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  después de un estímulo de GAs, a través de la membrana plasmática mediante un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  aún no identificado (Ritchie y col., 1999; Bethke y col., 1997).

Estas alteraciones en la concentración de calcio y el hecho de la que los niveles de calmodulina sean aumentados 2 o 4 veces más cuando son estimulados por GAs, y que cuando son estimulados por ABA disminuyen, sugieren que el sistema  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM está participando (Lovegrove y Hooley, 2000). Tal incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es más rápido en algunas células que en otras probablemente debido a la heterogeneidad en la sensibilidad de las células individuales de la aleurona. Otra posibilidad es que el calcio sea liberado de los almacenamientos endógenos, ya que hay evidencia de que las GAs causan una elevación de  $\text{IP}_3$  en la aleurona, un reconocido segundo mensajero (Lovegrove y Hooley, 2000). El elemento de respuesta a GAs (GARE) ha sido identificado en cebada como una región del promotor *Amy 1/6-4*, que se une con proteínas nucleares inducidas por GAs. La expresión de GAMYB es estimulada por GA, la cual induce la expresión de los genes  $\alpha$ -*Amy 1* (Lovegrove y Hooley, 2000).

La promoción por GAs de la expresión de  $\alpha$ -amilasa es mediada por factores de transcripción específicos, al parecer las GAs estimulan la expresión de un gen GA-MYB (los genes MYB son factores de transcripción que modulan el crecimiento y desarrollo), que regula a su vez la expresión de  $\alpha$ -amilasa y probablemente sea activado por fosforilación (Skriver y col., 1991; Gluber y Jacobsen, 1992).

Los aminoácidos requeridos para la síntesis *de novo* de proteínas provienen de la degradación de las proteínas almacenadas en vacuolas de la aleurona. Estas vacuolas también almacenan grandes cantidades de lípidos neutros en oleosomas especializados, ocupando cerca del 25-30% del volumen celular. Se

piensa que en las etapas tempranas de la movilización de reservas, la obtención de energía y sustratos para la síntesis y secreción de hidrolasas por la capa de aleurona de cereales es dependiente de la vía de la  $\beta$ -oxidación y el ciclo del glioxalato. Estos procesos también son inducidos por las GAs (Faith y col., 2001).

El ABA inhibe la síntesis de enzimas hidrolíticas que son esenciales para la movilización de las reservas en las semillas por ejemplo  $\alpha$ -amilasa actuando en forma antagónica a las GAs. Existe poca información del ABA como regulador endógeno de la función principal de la aleurona en cereales. Existe un receptor de ABA en la membrana plasmática de las células de la aleurona en cebada. Sin embargo, también se ha comprobado la presencia de un receptor citoplasmático (Lovegrove y Hooley, 2000). En diversos experimentos se ha comprobado que la unión del ABA al receptor de la membrana plasmática, provoca una regulación negativa (down-regulation) de la expresión del gen de la  $\alpha$ -amilasa (inducido por GAs); mientras que el otro receptor dentro de la célula lleva a una regulación positiva del gen *Em* (inducido por ABA). Existen evidencias de la participación de las proteínas G en la vía de señalización del ABA. De igual forma, se ha propuesto la participación de los cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática, los cuales pueden ser utilizados para modular las actividades de los canales iónicos regulados por voltaje o transportadores acoplados a  $H^+$  (Bethke y col., 1997).

Se ha encontrado que el ABA está presente en las capas de aleurona y en los embriones de cebada y trigo; en particular en cebada, la cantidad de este regulador es mayor en las semillas latentes. En cebada, el ABA previene el incremento en calcio estimulado por GAs, y en la ausencia de GAs se ha propuesto que una alta concentración de ABA disminuye el calcio por la activación de una  $Ca^{2+}$ -ATPasa en la membrana plasmática (Lovegrove y Hooley, 2000).

En las células de la aleurona, tanto la percepción hormonal como los eventos de transducción de señales tempranos ocurren en la membrana plasmática.

Estas señales se deben propagar a través del citosol donde las señales ( $\text{Ca}^{2+}$ , CaM, cGMP,  $\text{H}^+$ , etc) se deben coordinar con el fin de sintetizar y secretar las hidrolasas eficientemente (Bethke y col., 1997).

El ABA actúa modificando la expresión de genes mediado por proteínas unidas al ADN similares a dedos de leucina (bZIP); asimismo, se han caracterizado varios elementos de respuesta a ABA (secuencias ABREs). Por otro lado, se sabe que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el principal subproducto de la  $\beta$ -oxidación y se ha comprobado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una de las principales especies reactivas de oxígeno (EROS) que llevan a la muerte celular programada (PCD) de la aleurona. Asimismo, se sabe que las EROS son destruidas por varias enzimas incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT). Se ha demostrado que el ABA mantiene una alta actividad de la CAT, APX y SOD impidiendo de esta forma la PCD, mientras que las GAs producen una rápida reducción de la actividad enzimática promoviendo la muerte celular (Faith y col., 2001).

Una vez que se han degradado los azúcares, el escutelo absorbe los productos de la hidrólisis y los transporta al embrión. Se ha observado que el pH del endospermo debe mantenerse alrededor de 5 para una eficiente toma de aminoácidos y azúcares por el epitelio del escutelo, ya que éste se realiza de manera dependiente de un gradiente de protones. La liberación de ácido málico estimulada por ABA y de ácido fosfórico y ácido cítrico por GAs a partir de la degradación de compuestos almacenados en las vacuolas, mantiene la acidificación del medio (Drozdowicz y Jones, 1995).

Por antecedentes se sabe que las variedades de sorgo con susceptibilidad contrastante al BPC tienen diferentes niveles de actividad de  $\alpha$ -amilasa durante el desarrollo de las semillas. Se observó que los cariopses de IS9530 (variedad resistente) presentaron muy baja cantidad de  $\alpha$ -amilasa durante todo el periodo de desarrollo; en contraste con la línea Redland B2 que mostró una actividad de amilasa incrementada cerca de la madurez fisiológica (Pagano y col., 1997).

La alta actividad enzimática en cariopses no-incubados de Redland B2 en etapas tempranas del desarrollo indica que la hidrólisis del almidón en estas semillas se inicia sin la necesidad de alguna señal de germinación. Esto significa que se esperaría que la calidad del grano se perdiera cada vez que el agua esté disponible (Pagano y col., 1997).

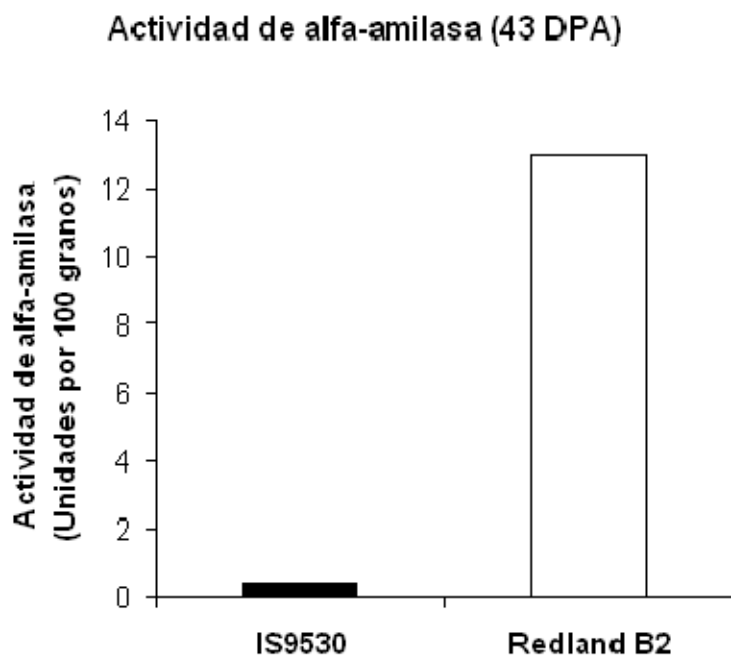


Figura 7. Actividad de  $\alpha$ -amilasa. Se utilizaron semillas que expresan la susceptibilidad contrastante de 43 DPA sin imbibir (Pagano y col., 1997).

### **2.12 Medición de la actividad de $\alpha$ -amilasa para la detección del BPC en cereales**

Como se menciona anteriormente, diversos factores además de la humedad o la precipitación pluvial determinan el BPC de los granos de cereales. Estos incluyen el cultivar la etapa de madurez, los patrones de temperatura y precipitación pluvial durante el desarrollo de cosecha, la humedad, nubosidad, drenaje y tipos de suelos. Por lo que la susceptibilidad al BPC es muy difícil de predecir. Recientemente se han desarrollado diversos métodos basados en la actividad de enzimas hidrolíticas (específicamente  $\alpha$ -amilasa) para determinar la extensión del BPC en cereales (Skerritt y Heywood, 2000; Humphreys y Noll, 2002)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido al aumento en el consumo de los cereales como fuente de alimentación es necesario que la producción sea suficiente para satisfacer las demandas alimenticias, por lo que es necesario que los cultivos sean de rápida germinación y crecimiento. Sería deseable que las semillas de cereales no tengan un nivel muy elevado de latencia que evite su rápida germinación en el campo pero que sí tengan un nivel de latencia suficiente para impedir la germinación en la planta parental también conocida como Brotado Pre-Cosecha (Bewley, 1997).

El BPC es un problema muy común en cereales como el trigo, el maíz, el sorgo y la cebada, sobre todo, cuando el periodo de cosecha coincide con condiciones de humedad ambiental muy elevada, causando grandes pérdidas económicas y agrícolas. Por lo antes mencionado, resulta de gran relevancia profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y fisiológicas del BPC que permitan lograr un mejor manejo del cultivo sobre bases más sólidas que las hasta ahora utilizadas.

El conocimiento de los mecanismos que controlan el BPC podría contribuir a encontrar una estrategia para disminuir las pérdidas económicas y materiales que ocasiona.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar las bases histológicas y bioquímicas de la expresión de la susceptibilidad contrastante al BPC en dos líneas de sorgo (IS9530 y Redland B2) cultivadas en diferentes condiciones y determinar el efecto del almacenamiento por distintos periodos en la germinación de estas semillas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar el índice de germinación en las líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) IS9530 y Redland B2 cultivadas en diferentes condiciones (México y Argentina)
- 2) Determinar el índice de germinación en las líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) IS9530 y Redland B2 cultivadas en Argentina y almacenadas por distintos periodos de tiempo.
- 3) Comparar las características histológicas e histoquímicas de semillas de ambas líneas de 22 DPA cultivadas en México (cosecha 2003).
- 4) Comparar las características histológicas e histoquímicas de semillas maduras (más de 60 DPA) de ambas líneas cultivadas en Argentina (cosecha 1999).
- 5) Comparar la velocidad de toma de agua en semillas maduras (más de 60 DPA) de ambas líneas cultivadas en México (cosecha 2003).
- 6) Medir la sensibilidad al ABA en semillas maduras (más de 60 DPA) de ambas líneas cultivadas en México (cosecha 2003).
- 7) Medir de la sensibilidad a las GAs en semillas maduras (más de 60 DPA) de ambas líneas cultivadas en México (cosecha 2003).

- 8) Medir la velocidad de movilización de reservas a través de la actividad de  $\alpha$ -amilasa en semillas maduras (más de 60 DPA) de ambas líneas cultivadas en México (cosecha 2003).

## **HIPÓTESIS**

Si la expresión del BPC depende de las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan las semillas, entonces se esperará observar diferencias en el IG entre las semillas cultivadas en Argentina y las cultivadas en México.

Si la velocidad de germinación de las semillas depende de las condiciones y/o duración del almacenamiento, entonces se esperaría observar diferencias en la velocidad de germinación de las semillas almacenadas por distintos periodos de tiempo.

Si la expresión de la susceptibilidad contrastante al BPC y la velocidad de germinación de las semillas de sorgo de ambas líneas depende del balance hormonal entre ABA y GAs, se esperaría observar cambios en la sensibilidad a estas hormonas vegetales asociados a los cambios en la velocidad de germinación.

Si la expresión de la susceptibilidad contrastante al BPC depende de la estructura morfológica de la semilla entonces se esperaría observar diferencias en las características histológicas e histoquímicas entre las semillas de ambas líneas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODO

### 4.1 Cultivo de Sorgo

Se realizó la propagación de las dos líneas de sorgo en México para determinar el IG y compararlo con el de las semillas que fueron cultivadas en Argentina y almacenadas por distintos periodos en México.

#### 4.1.1 Cultivo de Sorgo en Condiciones Ambientales

Se realizó en el Vivero Alto del Jardín Botánico en la Universidad Nacional Autónoma de México bajo condiciones ambientales en los meses de marzo a diciembre del 2003. Se efectuó una limpieza del área (12.6 m de largo x 5 m de ancho, (Fig. 9), asimismo, se colocó una cama de tierra para la siembra y una cerca de alambre de púas. El terreno fue regado dos veces por semana.



Figura 8. Fotografía de las condiciones iniciales del terreno para la siembra de sorgo en el Vivero Alto del Jardín Botánico de la UNAM.

Las semillas se sembraron con el esquema siguiente: tres bloques con tres hileras de cada línea (IS9530 y Redland B2), las hileras estaban separadas entre sí por 70 cm. de distancia con 20 cm. de distancia entre planta y planta (Fig. 10). Recién sembradas las semillas fueron cubiertas con una malla como



protección contra aves de rapiña hasta que emergieron las plántulas, dos semanas después de la siembra (Fig. 11).

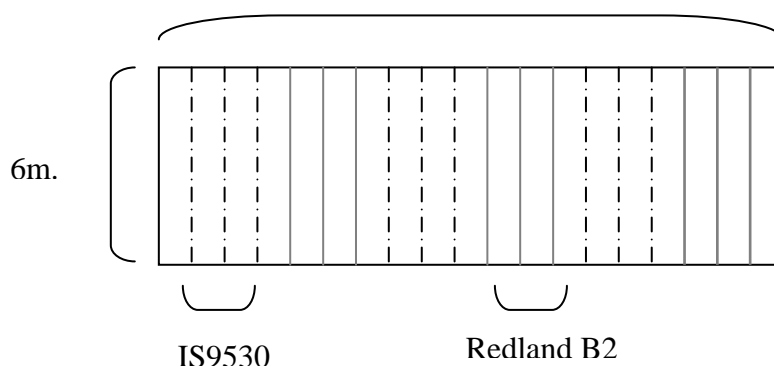


Figura 9. Diagrama de la distribución del cultivo de sorgo, IS9530 (----) y Redland B2 (—), en el vivero alto en la UNAM.



Figura 10. Cultivo de Vivero Alto (UNAM). Se muestran las plántulas de sorgo en desarrollo cubiertas con una malla para protección contra aves de rapiña.

Las condiciones ambientales (temperaturas máximas, mínimas, precipitación) en las cuales se desarrollo el cultivo en la UNAM a lo largo del año 2003, fueron obtenidas del Instituto Metereológico de la UNAM (Fig. 12)

### Condiciones Climáticas (UNAM 2003)

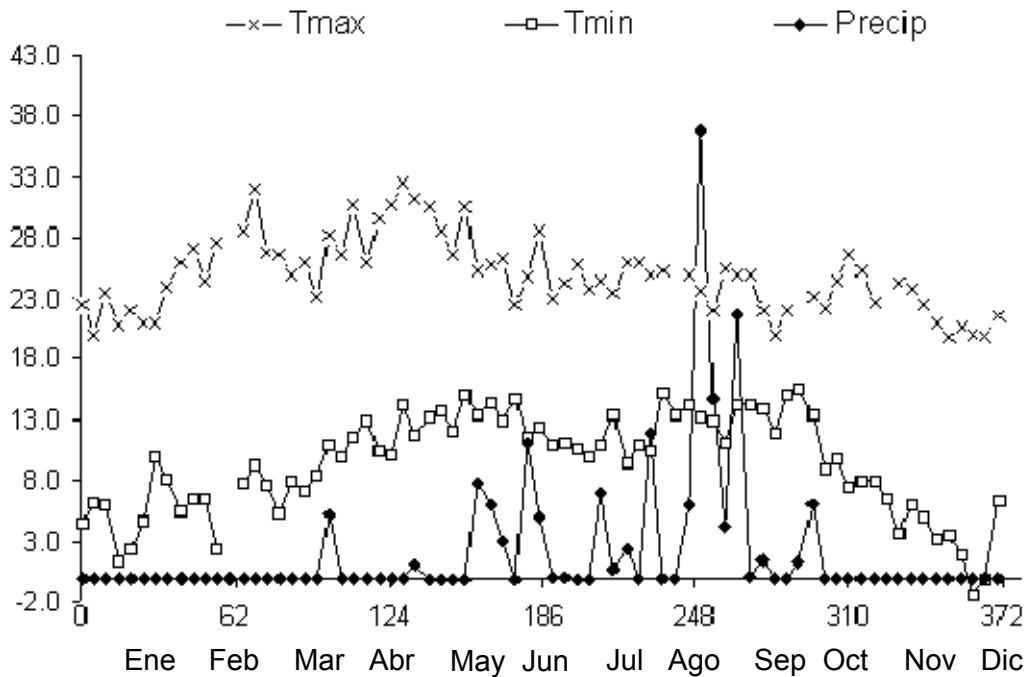


Figura 11. Temperaturas máximas y mínimas; precipitación registradas en el Observatorio Meteorológico del Colegio de Geografía (UNAM), durante los meses de enero a diciembre del 2003

#### 4.1.2 Cultivo de sorgo en condiciones de invernadero

Se realizó el cultivo en la UAM en un invernadero con temperatura de 28-32°C, con riego automático de tres o cuatro veces por semana durante los meses de noviembre en adelante. Las semillas se sembraron primero en bolsas de plástico pequeñas y después de germinadas se trasplantaron a bolsas grandes con capacidad de 5 Kg. cada una, se colocaron un promedio de 2 plantas por bolsa.

En ambos cultivos, tanto el de la UNAM como el de la UAM, las plantas se trataron contra plagas con *Pitón 27* en una concentración de 13.58 g/L (sulfato de cobre pentahidratado), se fertilizaron con urea (4.30 gr por planta aproximadamente) y micronutrientes, *Miracle-Gro*. Las plantas se mantuvieron limpias de malezas. Cuando surgieron las panojas se empezaron a contar los

días a partir del cual se inició la antesis (es decir, la apertura de las flores que deja sus órganos disponibles para la polinización). Esta etapa se identificó cuando se observaron pequeños filamentos amarillos en más de la mitad de la panoja (Fig. 13A), una vez que se empezaron a formar las semillas se utilizaron bolsas de tela de tul para proteger a las semillas en desarrollo de aves de rapiña o insectos.

Estas bolsas se retiraron en el tiempo de cosecha (Fig. 13B); y se rotularon con etiquetas plastificadas que indicaban el número de planta, la fecha de antesis y la línea de sorgo a la cual correspondían.



Figura 12. A) Panoja de sorgo en los primeros días de antesis, B) Panoja de sorgo cubierta con una bolsa de tela, se utilizó tul de color claro para permitir el intercambio gaseoso y la entrada de luz.

#### **4.2 IG de las semillas recién cosechadas y almacenadas**

Se realizaron pruebas de germinación (Índice de germinación, IG) en las semillas tanto cosechadas en Argentina (años 1997, 1998, 1999, 2000 y 2002) y almacenadas en México (durante 7, 6, 5, 4 y 1 años respectivamente), como las cultivadas y cosechadas en México (2003).

Para realizar la medición del IG se tomaron 100 semillas al azar de cada línea. Cada grupo de semillas se lavaron con etanol al 70% (2 lavados), se enjuagaron con agua estéril y se dejaron por 10 min. en hipoclorito al 5 v/v para después lavarse con agua destilada estéril. Las semillas se pusieron en cajas petri con papel absorbente con 6 ml. de agua estéril, en una estufa a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad.

Para determinar el IG se realizó el siguiente cálculo utilizado por Reddy y col., (1985), donde  $n_1, n_2 \dots n_{12}$  son el número de semillas germinadas en el día 1, día 2, etc. En este cálculo se le da más peso a las semillas que germinan primero y menos a las que germinan al final:

$$GI = (12 \times n_1) + (11 \times n_2) + \dots + (1 \times n_{12})$$

### **4.3 Estudio Histológico e Histoquímico**

Un lote de semillas maduras se imbibió en cajas petri con agua por 12 hrs, otro lote se mantuvo seco. Posteriormente, en ambos lotes se conservó el grano completo y por otro lado, se disectó el embrión para facilitar su inclusión, ambos se fijaron con FAA (Formaldehído [3.7% v/v], Etanol [50% v/v], Ácido Acético [5% v/v] y Agua) por 1 hr. para el embrión y 24 hrs. para el grano completo a temperatura ambiente.

Las muestras se deshidrataron debido a que el agua del tejido debe ser removida antes del proceso de inclusión dado que el medio de inclusión (la matriz sólida de soporte a los tejidos) es hidrofóbica. Las series de deshidratación fueron etanol al 30, 50, 70, 85, 96 y 100% v/v de 2 y 3 hrs cada uno, dependiendo del tejido (fraccionado o completo respectivamente). Después se realizó la preinclusión en series de etanol/xilol 1:1 por 30 min., xilol/paraplast 1:1 por 24 hrs., xilol/paraplast 1:2 por 24 hrs. Finalmente la muestra se incluyó en paraplast 100% por 48 hrs., para proporcionar una estructura de soporte antes de seccionar. Subsecuentemente se realizaron los

cortes histológicos de 10 a 12 micras aproximadamente en microtómo de rotación.

Se realizaron las siguientes técnicas histoquímicas:

- Safranina- Verde Rápido: La Safranina tiñe núcleos y suberina mientras que el verde rápido tiñe paredes celulares de tal forma que se puede obtener una imagen de la histología en general.
- Reactivo de Schiff: Tiñe polisacáridos insolubles (gránulos de almidón). El principio de la tinción radica en la unión 1,2-glicol dentro de la molécula de azúcar de los carbohidratos con el agente oxidante, ácido peryódico, y produce dos grupos aldehídos libres. Los aldehídos reaccionan con la leucofusina produciendo complejos altamente coloridos.
- Azul- Negro de Naftol: Tiñe de color negro los cuerpos proteínicos.
- Permanganato de Potasio: Tiñe diferentes polifenoles (taninos no específicos)
- Vainillina: Tiñe polifenoles condensados (Taninos específicos)
- Rojo Oleoso: Tiñe capas de cutina

Finalmente se obtuvo la imagen en microfotografía.

#### **4.4 Medición de la sensibilidad al ABA y GAs**

El experimento se realizó por triplicado de acuerdo a la técnica descrita por Benech-Arnold y colaboradores (1995a). Se sembraron semillas maduras de la cosecha del 2003 (cultivadas en México). Se incubaron 10 embriones disectados en cajas petri con 6 ml de agua destilada con ABA o GA a 23°C. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes tanto de ABA como de Gas (GA<sub>1</sub>): 0.05, 0.15, 0.5, 5 y 50 µM. Diariamente durante 12 días se registró la germinación o protusión de la radícula. Se realizó el cálculo del índice de germinación de cada caja y se obtuvo un promedio de las tres.

#### 4.5 Velocidad de la movilización de reservas

Se formaron lotes de 10 semillas de cada línea, se desinfectaron superficialmente como se indicó anteriormente. Se realizó la determinación de actividad de la  $\alpha$ -amilasa mediante la hidrólisis enzimática del almidón a las 0, 48, 72 y 120 hrs. Se disectaron los embriones del endospermo y se procesaron por separado. Se maceró el tejido con 5 ml del amortiguador de succinato –  $\text{CaCl}_2$  (Ácido succínico 0.02M,  $\text{CaCl}_2$  0.02N, pH 5), el homogenado se paso a un tubo de centrífuga y se lavó el mortero con otros 5 ml del amortiguador que se unió al homogenado anterior. Se centrifugó a 5000 g durante 20 min. a 4°C y se recuperó el sobrenadante, del cual se realizaron las siguientes diluciones :

Tiempo de Imbibición	Dilución
0	Sin diluir
	1 a 10
48	1 a 10
	1 a 100
72	1 a 10
	1 a 100
120	1 a 10
	1 a 100

Se tomaron 0.25 ml de cada dilución, se pasaron a tubos de vidrio y se agregaron 0.25 ml de la solución de almidón (almidón 20 mg/ml, preparado el mismo día, cuidando de disolverlo en agua hirviendo y enfriándolo con agitación constante para que no se formaran grumos). Por otro lado, se preparó la curva patrón de maltosa. En la cual se tomaron 6 tubos (tomando como 0 el blanco) con cantidades crecientes de la solución patrón de maltosa (maltosa 500  $\mu\text{g/ml}$ ), como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Blanco (0)	1	2	3	4	5
ml de maltosa	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
ml de agua	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0

Después de rotular todos los tubos, tanto los de la curva patrón como los de las muestras, se dejaron incubar en un baño de agua a 25°C por 10 min. Pasado este tiempo, se les agregó 0.5 ml del Reactivo I (preparado antes de usarse, se mezclaron 1 ml de Sulfato cúprico (30g de cobre pentahidratado en 200 ml de agua y 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado), con 25 ml de la solución de Tartrato doble de sodio y potasio (25g de carbonato de sodio anhidro, 25g de Tartrato de sodio y potasio, 20g de bicarbonato de sodio y 200g de sulfato de sodio anhidro, aforado a 1 lt)).

Se incubaron los tubos por 20 min en baño de agua hirviendo, al finalizar se enfriaron en el chorro de agua corriente por 5 min. Se agregaron 0.5 ml del Reactivo II, se agitaron vigorosamente y se agregaron 8.5 ml de agua y se leyó a 520 nm.

El reactivo II se preparo disolviendo 25 gr de molibdato de amonio en 450 ml de agua que contenían 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, por separado se disolvieron 3 gr. de arsenato de sodio heptahidratado en 25 ml de agua y se agregaron a la solución anterior con agitación constante; se aforó a 500 ml, se incubó en un baño de agua a 55°C durante 30 min.

Se realizaron los cálculos de acuerdo a las lecturas obtenidas interpoladas de la curva patrón de maltosa, considerando que una unidad de amilasa se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1.0 mg de maltosa de almidón en tres minutos a pH 4.8 a 20°C (Pagano y col., 1997).

#### **4.6 Velocidad de Toma de Agua**

Se formaron lotes de 10 semillas de cada línea y se pesaron en una balanza analítica sobre un pedazo de papel parafilm. Una vez que se anotó el peso inicial se pasaron a un recipiente pequeño (cartuchos de fotografía) y se les colocó 15 ml. de agua destilada, tapando el recipiente. Una vez pasados 30 minutos se les vació el agua cuidando que no se perdiera alguna semilla, se les

quitó el excedente de agua con papel absorbente y se volvieron a pesar. Este procedimiento se repitió cada 30min durante 6 hrs.

#### **4.7 Análisis estadístico**

En los estudios de determinación del IG de las diferentes cosecha (tanto de México como de Argentina) se realizó un análisis de ANOVA y una prueba de T para determinar si había diferencia significativa. De la misma manera se realizaron pruebas de T para los resultados obtenidos de la determinación de la velocidad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio así como se obtuvo la desviación estandar.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1 Semillas de sorgo cultivadas en México (Cosecha 2003 UNAM y UAM)**

Las semillas utilizadas para la siembra en México tanto en la UNAM como en la UAM (IS9530 y Redland B2), provenían de plantas cultivadas en Argentina. Se tenían antecedentes que conservaban diferencias en la velocidad de germinación (cosecha 1999).

En primera instancia, se observaron diferencias durante el desarrollo de los cultivos en ambas zonas. Durante la primera etapa (■) que abarca desde la siembra de las semillas hasta la aparición de las primeras panojas en las plantas, el cultivo realizado en Argentina tuvo una duración aproximada de 3 meses, en condiciones ambientales (Diciembre -Febrero); esta misma etapa en la UNAM, en condiciones ambientales, tardó 6 meses (Marzo – Agosto, 2003); mientras que en el cultivo desarrollado en la UAM en invernadero (bajo condiciones ambientales controladas) tardo 5 meses (Octubre – Febrero, 2002-2003).

La segunda etapa (□) es el intervalo en el cual las panojas se encuentran al inicio de la antesis hasta el desarrollo de los granos. En el cultivo de Argentina



tal etapa duro 3 meses aproximadamente (Febrero - Abril), mientras que en la UNAM duro 4 meses (Septiembre – Diciembre) y en la UAM duro 3 meses (Marzo – Mayo).

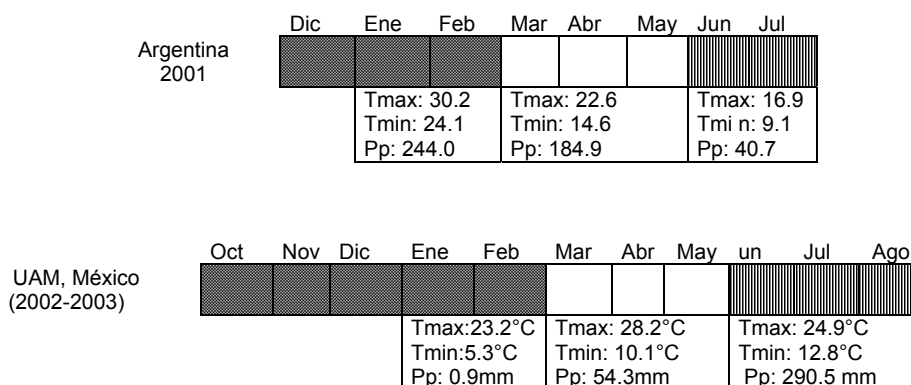
Finalmente la tercera etapa ( IIII) de senescencia del cultivo, en la que éste se remueve y se prepara la tierra para otro ciclo. En Argentina esta última etapa duro 2 meses al igual que en la UNAM, pero en la UAM, a diferencia de las anteriores, hubo brotado de nuevas panojas de las mismas plantas antes de llegar a la senescencia (Fig. 14).

Por otra parte, hubo dificultades al realizar los cultivos. Por un lado cuando se realizó el primer cultivo en condiciones ambientales en la UNAM (Septiembre, 2002) no se pudo completar la etapa de marcaje de la antesis, ya que las bajas temperaturas de Noviembre del mismo año impidieron el desarrollo de las panojas y causaron la muerte del cultivo, por lo que se repitió la siembra en Marzo del 2003 (Fig. 14 y 15).

**A)**

	1 <sup>er</sup> Etapa (# de meses)	2 <sup>da</sup> Etapa (# de meses)	3 <sup>er</sup> Etapa (# de meses)
Argentina	3	3	2
UNAM	6	4	2
UAM	5	3	continuo

**B)**



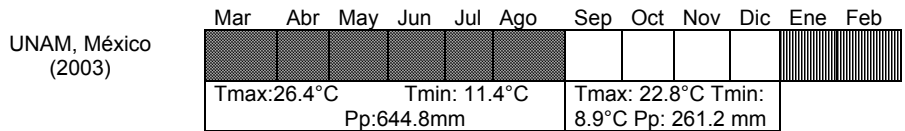


Figura 13. Cronograma del desarrollo del cultivo en Argentina y México, (A) por duración en meses. (B) Por etapa indicando el promedio de las condiciones climáticas.



Figura 14. Cultivo en el Vivero Alto (UNAM) en la segunda siembra (2003)

Con base en los promedio de temperaturas máximas y mínimas, así como de precipitación en el año 2003 (Fig 14B), obtenidos del Observatorio Metereológico del Colegio de Geografía de la UNAM, se observó que en el cultivo realizado en la UNAM la temperatura máxima promedio durante la primera etapa de desarrollo del cultivo (26.4°C) está dentro de la temperatura óptima de desarrollo de una planta de sorgo (>25°C), de igual forma el nivel de precipitación fue alto ya que en esta etapa quedaron incluidos los meses de mayor precipitación pluvial (julio y agosto) (644.8mm). Durante la segunda etapa la temperatura máxima fue menor (22.8°C), igualmente disminuyeron tanto la temperatura mínima (8.9°C) como el nivel de precipitación (261.2mm). Estas temperaturas se encuentran por debajo de la temperatura óptima requerida para el cultivo del sorgo y coincidieron con la etapa de llenado de

grano del cultivo, lo cual pudo afectar el desarrollo de los mismos. Se sabe por antecedentes que la temperatura máxima alcanzada en Argentina durante la primera etapa del cultivo podía alcanzar temperaturas máximas de alrededor de los 40°C con condiciones de humedad muy elevadas durante todo el desarrollo del cultivo, y en la etapa de llenado de grano no se presentaban temperaturas por debajo de los 25°C. Estas diferencias entre las condiciones ambientales de la UNAM-México y UBA-Argentina, dadas principalmente por la humedad y la temperatura, podrían determinar diferencias durante el desarrollo de los granos que se reflejaron en su respuesta de germinación, como se observó en las curvas de germinación e IG que se presentan en el siguiente apartado.

Por otro lado, se mencionó en los antecedentes que los niveles de ABA, una de las principales fitohormonas que determinan el nivel de latencia y de germinación, responde a los niveles de agua (ya que aumenta cuando hay estrés hídrico) y a la temperatura (disminuyendo cuando hay bajas temperaturas), así como la estructura de las semillas también responde a la temperatura (disminuyendo el tamaño y calidad de la semilla). Lo que implica que estos cambios en la temperatura y los niveles de precipitación principalmente, son suficientes para modificar el fenotipo original de las semillas (susceptibilidad al BPC, velocidad de germinación, nivel de latencia, calidad de las semillas, tamaño de la planta, etc). Sin embargo, los cambios en el fenotipo de las semillas producidas que resultan como consecuencia del lugar de siembra y por tanto, de las condiciones climáticas en que se desarrolla el cultivo depende de la especie, así como de las condiciones climáticas en que se produjeron las semillas originales (Roberts, 1972; Somody y col., 1984; Roach y Wulff, 1987; Allen y Meyer, 1998; Romagosa y col., 2001).

Con respecto al cultivo desarrollado en la UAM, se consideró que las condiciones climáticas externas al invernadero a lo largo del año fueron similares a las alcanzadas en la UNAM, ya que se encuentran dentro de la misma entidad federativa. Aunque la temperatura promedio alcanzada en el invernadero (32°C) es más cercana a la alcanzada en Argentina, al igual que el

nivel de precipitación, debido a que el riego era diario en comparación del cultivo de la UNAM. Sin embargo, hubo otras variables, tales como el espacio restringido de crecimiento radicular, la susceptibilidad a un mayor ataque de plagas debido a la alta HR, fluctuaciones entre las temperaturas máximas y mínimas, etc.) que también afectaron el fenotipo de las semillas cosechadas. Otros factores que pudieron afectar el cultivo son la incidencia luminosa y el fotoperiodo que no se controlaron en este estudio.

En el cultivo en invernadero las plantas tuvieron un espacio limitado de crecimiento radicular por haberse sembrado en bolsas de plástico con capacidad máxima de 5 kilos. Las condiciones de temperatura en el invernadero de la UAM fueron en promedio de  $32 \pm 4$  °C, pero hubo una excepción en uno o dos días a finales de diciembre, en que hubo una baja considerable de la temperatura (a 20°C aproximadamente) debida a las bajas temperaturas externas. Esta última temperatura se encuentra por debajo del rango óptimo para cultivo de sorgo ( $>25$ °C) (Alam y col., 2001) Estas condiciones en conjunto, probablemente sometieron a las plantas a un estrés moderado y como consecuencia tuvieron un tiempo de desarrollo mayor al esperado, además de que existió una constante renovación de las panojas. Este último evento implicó que la calidad de las semillas disminuyera conforme las panojas iban creciendo ya que se tuvo un menor tamaño disminuyendo el número de semillas.

Se determinó que los cultivos realizados tanto en condiciones ambientales como en condiciones de invernadero fueron sometidos a un cambio radical en las condiciones ambientales (principalmente en la temperatura y en el nivel de precipitación) en las que se desarrollo la planta. Estas condiciones de cultivo de acuerdo a los antecedentes de la literatura, provocan alteraciones a nivel fisiológico y bioquímico en las semillas en general que se hicieron evidentes al imbibir las semillas para su germinación.

Se propone que la combinación de estos factores (principalmente humedad y temperatura) son los determinantes en la expresión de la susceptibilidad al

BPC. En Argentina, Redland B2 presentó susceptibilidad al BPC durante el desarrollo de las semillas alcanzando porcentajes de germinación más elevados. En las semillas cultivadas en México, no se presentó BPC y la velocidad de germinación de las semillas, se invirtió ya que IS9530 alcanzó mayores porcentajes. Es decir, el efecto de las condiciones climáticas durante el desarrollo afectó la expresión de la latencia (Fig. 5 y Fig. 15).

El efecto de la humedad y la temperatura en la velocidad de germinación se puede dar a diferentes niveles. Por un lado, se observó una ausencia de la susceptibilidad al BPC en las semillas inmaduras cultivadas en México a diferencia de las cultivadas en Argentina. Se propone que este cambio podría deberse al grado de latencia, que se da durante la ontogenia de la semilla. Esto se ha observado en otros estudios como los experimentos realizados por Somody y colaboradores (1984) con semillas de avena (*Avena fatua*), estos autores observaron que la influencia del ambiente en la morfología y la latencia depende de la especie y el lugar de origen de ésta. Romagosa y colaboradores (2001) trabajaron con dos líneas de cebada con velocidad de germinación contrastante y cosechadas en diferentes años y lugares (Escocia y España). Estos autores observaron cambios en la latencia de las semillas y en la sensibilidad al ABA (Somody y col., 1984; Roach y Wulff, 1987; Allen y Meyer, 1998; Romagosa y col., 2001).

## **5.2 Índice de Germinación y curvas de germinación de semillas cultivadas en distintas condiciones (México y Argentina) y almacenadas por distintos periodos**

Se determinó la curva de germinación de las semillas cosechadas en México con más de 60 DPA (UAM cosecha 2003) en condiciones de invernadero, y en la UNAM (UNAM cosecha 2003) en condiciones al aire libre (Fig. 16 A y B). En general, se observó que el porcentaje y la velocidad de germinación aumentó significativamente en las semillas de la línea IS9530 tanto para las semillas del cultivo realizado en la UAM como en el de la UNAM, mientras que las semillas de Redland B2 disminuyeron su velocidad de germinación y su capacidad

germinativa, alcanzando porcentajes de germinación por debajo de los alcanzados por IS9530 (Fig.5). Este comportamiento es contrario al observado en las semillas originales con scBCP, donde la línea Redland B2 germinaba más rápido que la IS9530 y los granos de 60 DPA de IS9530 no rebasaron el 20% de índice de germinación (Benech-Arnold y col., 2000).

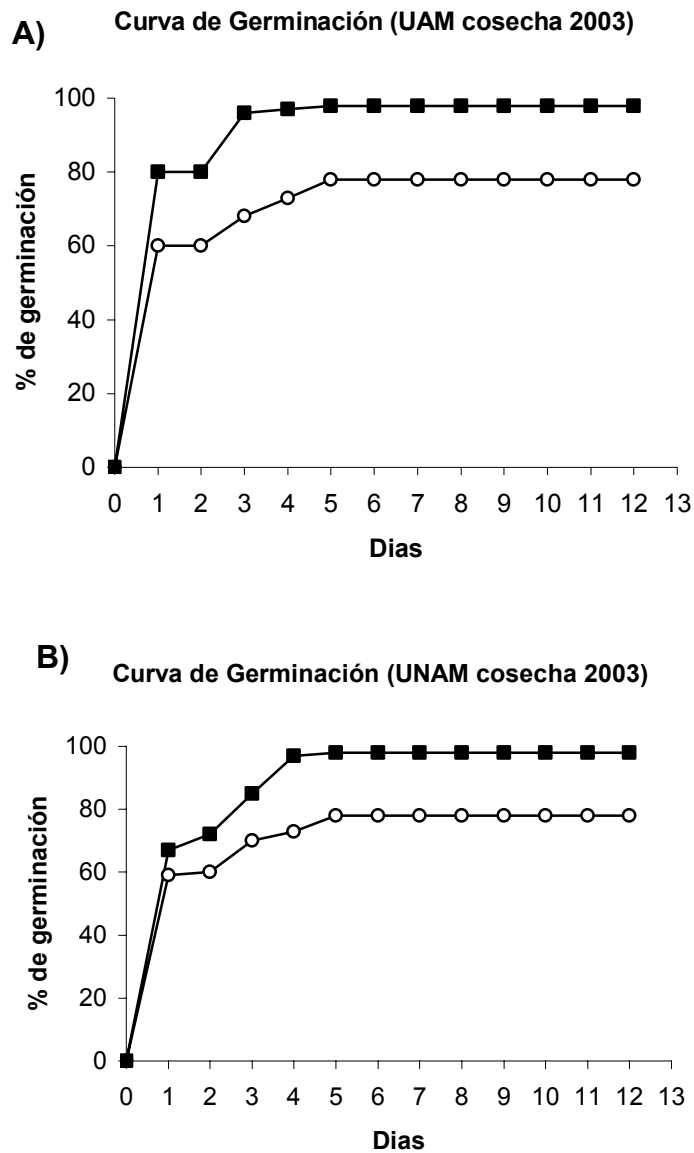


Figura 15. Curva de Germinación de las semillas de la cosecha 2003 cultivadas en la UAM (A) cultivadas en la UNAM (B). Donde (■) corresponde a IS9530 y (○) corresponde a Redland B2. La desviación estándar se encuentra incluida dentro del área del símbolo.

Asimismo, se determinó el índice de germinación (IG) tanto de las semillas recién cosechadas de plantas cultivadas en México, así como de semillas cultivadas en Argentina y almacenadas a 4°C por distintos periodos. En general, el IG de las semillas cultivadas en Argentina y México fue similar. A excepción del IG de las semillas de la línea IS9530 del año 1999 fue menor, indicando que estas semillas aún conservan una menor velocidad de germinación.

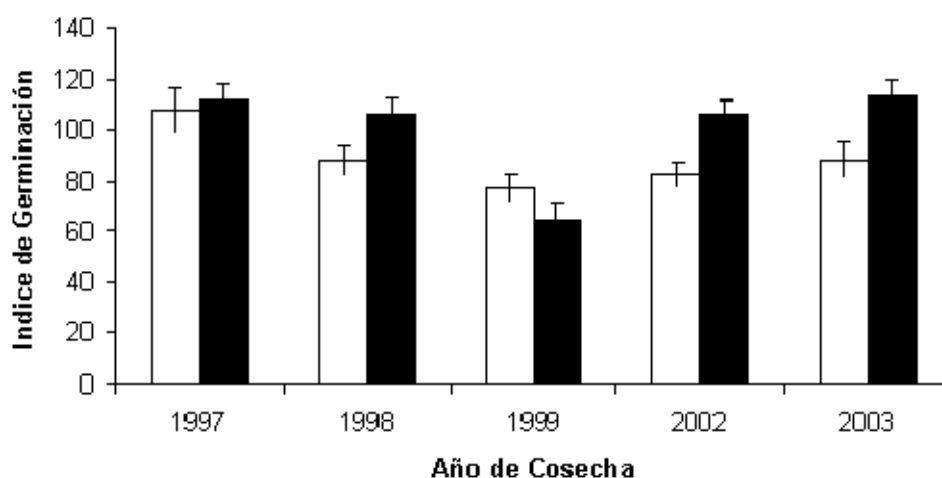
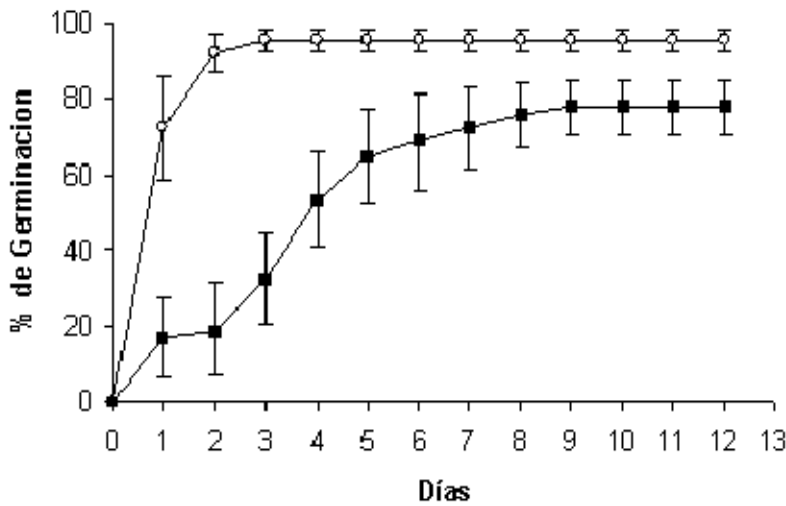


Figura 16. Índice de Germinación determinado en agosto del 2003 para las semillas IS9530 (■) y Redland B2 (□), de los diferentes años de cosecha. Las semillas fueron cultivadas en los campos experimentales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina excepto las del 2003 que fueron cultivadas en México (UAM).

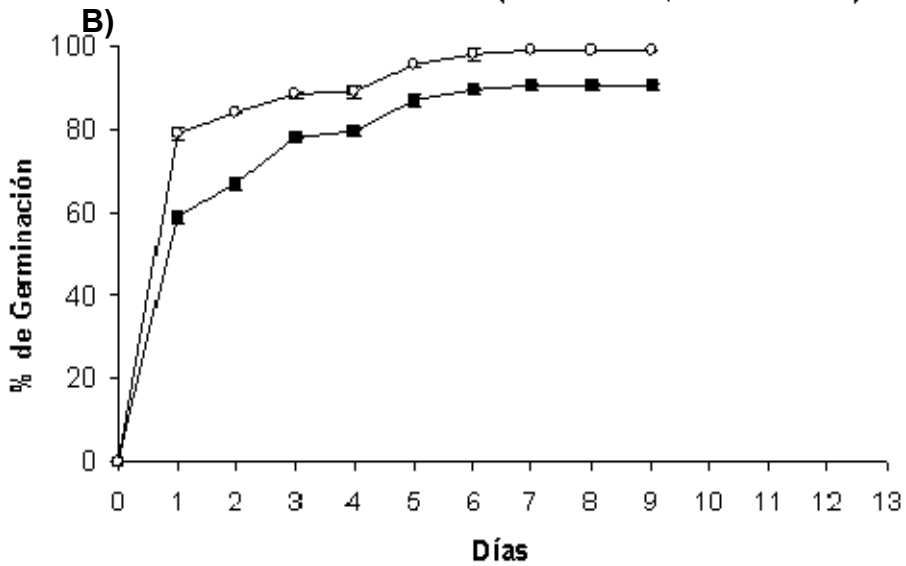
En la Figura 16 se observa que en general los IG de las semillas cultivadas en Argentina y almacenadas por distintos periodos, y las cultivadas en México presentaron un cambio en la velocidad de germinación con respecto a las semillas recién cosechadas en Argentina. Es decir, que las semillas de la línea IS9530, originalmente resistente al BPC y que por tanto germinaban más lento, después del almacenamiento invirtieron su velocidad de germinación, siendo inclusive más rápido que las de Redland B2. Esta última línea se vió afectada por los diferentes tiempos de almacenamiento y por las condiciones en las cuales se desarrollaron los granos en México.

La única excepción al comportamiento antes mencionado fueron las semillas de la cosecha del 1999, donde Redland B2 alcanzó mayores porcentajes de germinación respecto a IS9530. Por otra parte, se obtuvieron para estas mismas semillas las curvas de germinación en el año 2001 así como en Febrero y Agosto del año 2003 para analizar el comportamiento de velocidad de germinación con respecto al tiempo de almacenamiento para semillas de una misma cosecha (1999) (Fig. 18).

**A) CURVA DE GERMINACIÓN (Año 2001, Cosecha 1999)**



**B) CURVA DE GERMINACION (Febrero 2003, Cosecha 1999)**





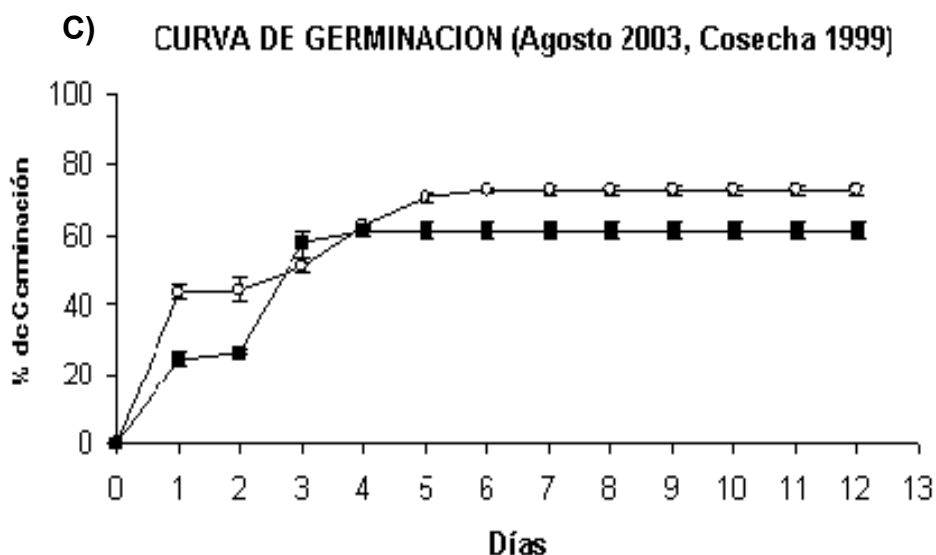


Fig. 17. Curva de germinación de las semillas de Redland B2 (○) e IS9530 (■) cosechadas en el año 1999 en Argentina y almacenadas por distintos periodos. La germinación se determinó en A) en el año 2001 (dos años de almacenamiento), B y C) en Febrero y Agosto del 2003 (cuatro años y cuatro años 6 meses de almacenamiento, respectivamente). Las desviación estandar se encuentra dentro del área del símbolo.

En la figura 18A se observa que las semillas de la cosecha 1999 almacenadas por dos años, mantienen las diferencias en la velocidad de germinación sobre todo en los primeros días de germinación. Por otra parte, en las semillas de la misma cosecha almacenadas por cuatro años (Fig. 18B) se observó una velocidad de germinación ligeramente mayor para Redland B2 que para IS9530, aunque las diferencias en la germinación entre ambas líneas fueron notoriamente menores a las observadas a los dos años de almacenamiento. En la figura 18C, se presentan las curvas de germinación de semillas almacenadas por cuatro años y medio. Se observa una disminución notable en la viabilidad de las semillas de ambas líneas, aunque se mantiene una velocidad de germinación ligeramente superior para Redland B2 con respecto a IS9530.

### Índice de Germinación

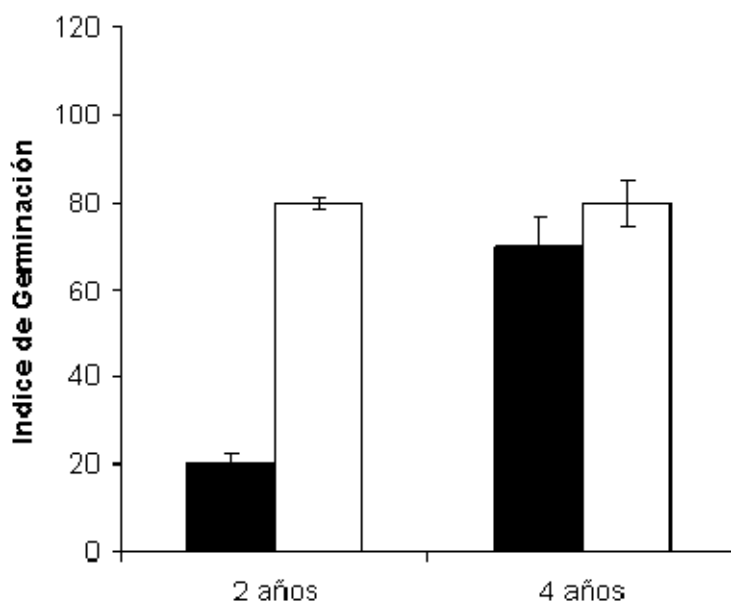


Fig. 18 Índice de Germinación de las semillas de la cosecha 1999, a los 2 años y 4 años de ser cosechadas en Argentina y almacenadas en México, donde Redland B2 (□) e IS9530 (■).

En la figura 19 se presentan los valores de IG de las semillas de ambas líneas, cosecha 1999 almacenadas durante dos y cuatro años (febrero 2003). Se puede observar que a los dos años de almacenamiento el IG de Redland B2 es aproximadamente cuatro veces mayor que el de IS9530. Después de cuatro años de almacenamiento el IG de IS9530 se incrementó considerablemente.

Se propone que el efecto de las condiciones climáticas durante el desarrollo de las semillas en Argentina pudiera expresarse en términos de un aumento diferencial en la sensibilidad de ambas líneas a daños durante almacenamiento (Fig. 15).

Al almacenar en frío los granos que se desarrollaron bajo diferentes condiciones en Argentina, las semillas de IS9530 perdieron la latencia (germinando más rápido), mientras que las de Redland B2 disminuyeron su viabilidad (Fig. 15 y 16). Como se había mencionado, la acumulación de EROS

ha sido considerada como uno de los principales factores que dañan a las semillas durante su almacenamiento. A pesar de que las semillas ortodoxas usualmente contienen bajos niveles de agua durante el almacenamiento, ocurren reacciones de auto-oxidación y producción de radicales libres, llevando a un efecto deletéreo directo de los mismos en los componentes celulares o bien son atrapados en estructuras intracelulares (Bailly, 2004).

Tales aseveraciones son apoyadas por los antecedentes que muestran que las semillas de Redland B2 (que son susceptibles al BPC) presentan una alta actividad metabólica desde los 43 DPA de la ontogenia, mucho mayor que la de IS9530, dando lugar a una mayor acumulación de EROS que permanecen durante el almacenamiento y por lo tanto resultan en una menor viabilidad como consecuencia del daño celular durante la imbibición (Fig. 6 y 15) (Pagano y col., 1997).

Como se mencionó anteriormente el IG de las semillas de IS9530 almacenadas se incrementó considerablemente. Este incremento pudiera deberse a una pérdida de la latencia de estas semillas durante el almacenamiento. De acuerdo a los antecedentes y a la relación que existe entre el grado de latencia y la sensibilidad de los tejidos al ABA y GAs, se analizó en este trabajo la sensibilidad de los embriones aislados de ambas líneas de sorgo al ABA y a las GAs. También se analizó la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa en las semillas de ambas líneas de la cosecha 2003 cultivadas en la UAM, en las que se observaron cambios en su velocidad de germinación. Estos resultados se muestran a continuación.

Cabe mencionar que los experimentos de sensibilidad a fitohormonas se realizaron con semillas maduras de ambas líneas de la cosecha 2003 (México) al igual que el análisis de la actividad enzimática a diferencia de el estudio histológico e histoquímico el cual se llevó a cabo con semillas de ambas líneas de la cosecha 1999 almacenadas (Argentina) y 2003 durante la ontogenia (México). La variabilidad de las semillas utilizadas fue debido a la poca disponibilidad de semillas almacenadas de diferentes cosechas y de diferentes

etapas de la ontogenia, además de las dificultades para procesar el material biológico, principalmente en los estudios histológicos e histoquímicos.

### 5.3 Medición de la Sensibilidad al ABA y las GAs

Se realizaron las pruebas de sensibilidad al ABA y GAs en semillas maduras de la cosecha 2003 (México) en presencia de diferentes concentraciones de ABA (a partir de 0.05 hasta 50  $\mu\text{M}$ ). De esta forma, en el caso de la curva de sensibilidad al ABA, se determinó la concentración a la cual se abatió por completo el índice de germinación de los embriones disectados; mientras que en la curva de sensibilidad a las GAs se determinó la concentración a la cual se llegó al punto máximo de IG en los embriones disectados de ambas líneas.

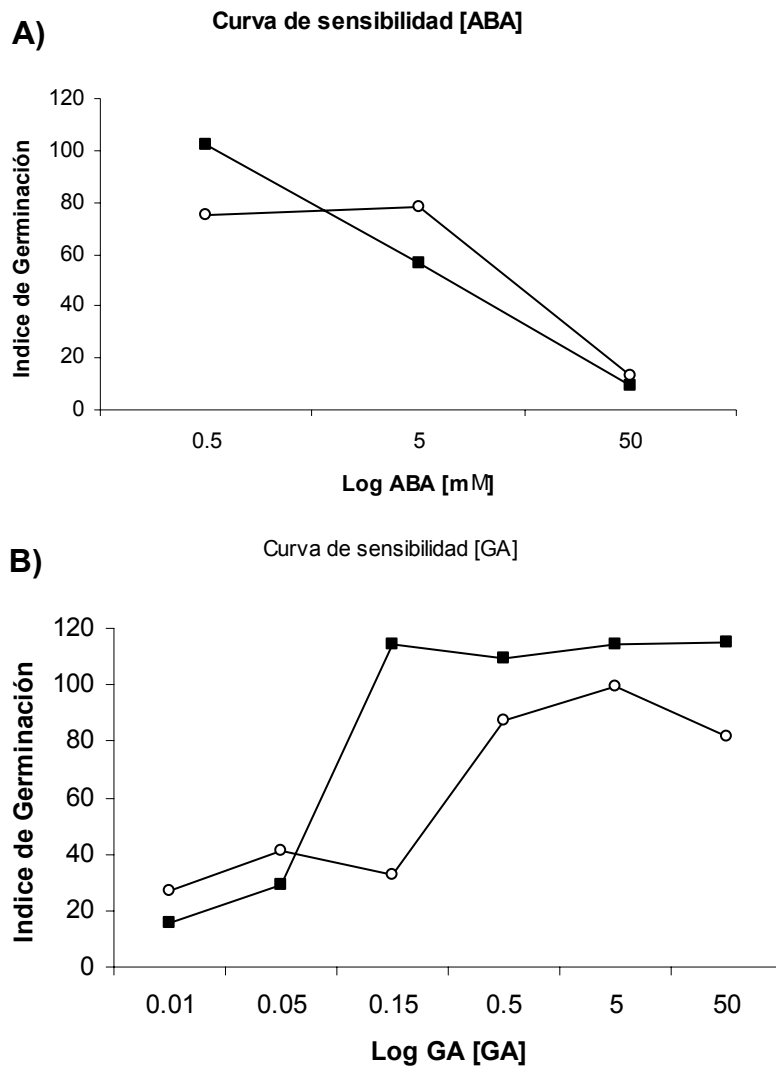


Fig. 19 Curva de sensibilidad al ABA (A) y las GA<sub>1</sub>. Donde (■) corresponde a IS9530 y (○) corresponde a Redland B2.

En la figura 20 A se presentan los valores de IG alcanzados por los embriones disectados de las semillas de ambas líneas, en presencia de distintas concentraciones de ABA. En esta figura, se observa que los embriones disectados de las semillas de IS9530 comenzaron a disminuir el IG, por lo tanto, a detectar la presencia de la hormona en la tercera concentración de ABA (0.5  $\mu$ M). A concentraciones mayores de ABA, la disminución del IG es más notable; sin embargo, aún a 50  $\mu$ m de ABA no se observó la anulación total del IG. Posiblemente durante el almacenamiento pudo perderse la sensibilidad al ABA en los tejidos de IS9530. Por otro lado, en los embriones disectados de las semillas de la línea Redland B2, no se observó una disminución notable en el IG por ABA sino hasta concentraciones superiores a 5  $\mu$ m alcanzando valores de IG similares a los alcanzados por los embriones de IS9530. Cabe mencionar que la gráfica 20A se presentan los IG obtenidos a partir de la tercera concentración propuesta (0.5 $\mu$ M), ya que los datos de las concentraciones anteriores no se correlacionan con la finalidad biológica del ABA (inhibir la germinación). Sin embargo en las concentraciones subsecuentes ambas líneas tuvieron una respuesta similar a la reportada en los antecedentes es decir, Redland B2 sí mantuvo una menor sensibilidad al ABA que IS9530, sin embargo ésta última disminuyó su sensibilidad al ABA, ya que no se inhibió completamente la germinación a dosis más altas.

Por otra parte, en la figura 18 B se presentan los valores de IG alcanzados por los embriones disectados de las semillas de ambas líneas, en presencia de distintas concentraciones de GAs. En general, se observó que los embriones de la línea IS9530 tuvieron una respuesta mayor que los de Redland B2 en la mayoría de las concentraciones de GAs aplicadas. Mientras que los embriones de las semillas de Redland B2 requirieron mayores concentraciones de GAs (a partir de 0.5  $\mu$ M para estimular el IG). Es decir, que IS9530 mostró mayor sensibilidad a las GAs que Redland B2. En investigaciones previas donde se

expresaba la scBPC, Redland B2 mostraba una mayor sensibilidad a las GAs respecto a IS9530, lo cual parece haberse invertido en las semillas cultivadas en México, ya que IS9530 respondió a más bajas concentraciones de GAs que Redland B2 (0.15 y 0.5 $\mu$ M respectivamente). Los cambios observados en la sensibilidad al ABA y a las GAs explican la pérdida de latencia y la germinación más rápida de IS9530 observada en este estudio.

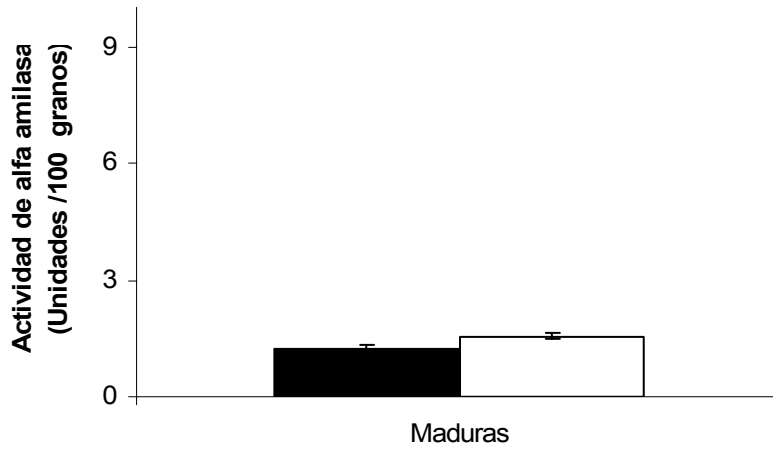
Sería necesario determinar si la concentración endógena de ambas hormonas se modifica con respecto a los niveles reportados en las semillas que expresaban la scBPC. De esta forma, se conocería en forma integral el efecto de las condiciones climáticas sobre el balance hormonal y por tanto, sobre el comportamiento de BPC.

#### **5.4 Velocidad de Movilización de Reservas**

Se reportó en estudios previos realizados por Pagano y colaboradores (1997) que la variedad Redland B2 cuando manifestaba la susceptibilidad al BPC mostraba también una actividad de  $\alpha$ -amilasa veinte veces superior a la de la línea resistente (IS9530) y esta actividad se detectaba desde etapas tempranas de la ontogenia (43 DPA) (Fig. 6). Cabe señalar que normalmente la actividad de  $\alpha$ -amilasa es un evento post-germinativo. Pagano y colaboradores (1997), encontraron que la actividad de  $\alpha$ -amilasa se alteraba al aplicar inhibidores de la biosíntesis de GAs y ABA sugiriendo que los cambios en estas hormonas durante el desarrollo regulan los niveles de dicha actividad enzimática. Los niveles de  $\alpha$ -amilasa altos en etapas tempranas de la ontogenia en semillas de la línea Redland B2 correlaciona con la mayor velocidad de germinación de esta línea en comparación con la línea de IS9530.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se analizó también la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en semillas maduras cultivadas en México en las que se presentaba la velocidad de germinación invertida.

**A) Actividad de Alfa-amilasa (semilla sin imbibir, cosecha 2003 México)**



**B)**

**Actividad de Alfa amilasa (Cosecha 2003)**

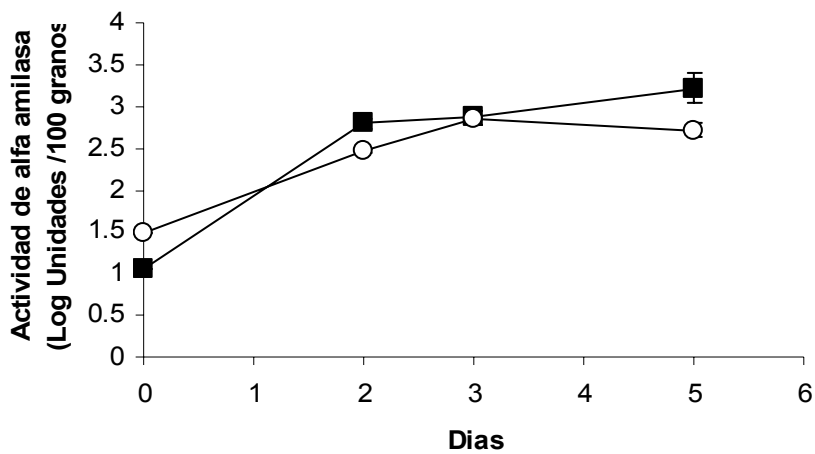


Fig. 20 Actividad de Alfa-amilasa semillas maduras de la cosecha 2003 (UAM, México). Actividad enzimática en semillas sin imbibir (A) y a lo largo de 5 días de imbibición (B). Donde (■) corresponde a IS9530 y (○) corresponde a Redland B2. La desviación estándar se encuentra dentro del área del símbolo.

En la figura 20 se muestra la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa en las semillas maduras sin imbibir (A) y durante la imbibición (B). Se observa que, en las semillas maduras sin imbibir la actividad de  $\alpha$ -amilasa entre ambas líneas es similar. Sin embargo, presentan niveles mucho menores (cada línea muestra un máximo de 2 unidades) a los de las semillas inmaduras mencionadas en el reporte previo (Pagano y col., 1997). Es necesario medir la actividad de  $\alpha$ -amilasa durante distintas etapas de la ontogenia, con el fin de determinar si los cambios en la actividad de esta enzima ocurren durante el desarrollo. También sería importante analizar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en las semillas almacenadas para correlacionarla con el efecto del almacenamiento en la velocidad de germinación. En las semillas imbibidas (Fig. 21B), aunque se incrementó la actividad de la  $\alpha$ -amilasa no se observaron diferencias entre ambas líneas.

Como se había mencionado, el control de la actividad de  $\alpha$ -amilasa, así como el grado de latencia se relaciona en gran medida por el balance hormonal entre GAs (las cuales promueven la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa) y ABA (el cual inhiben la síntesis de esta enzima), por lo que los cambios observados en la actividad de  $\alpha$ -amilasa entre ambas líneas de sorgo (Redland B2 e IS9530) pudieron deberse a las diferencias en la sensibilidad a las GAs y/o al ABA encontradas en este trabajo.

Una vez determinadas las diferencias en el aspecto bioquímico, se realizó el análisis morfológico para determinar si existían parámetros morfológicos de la semilla que explicaran la scBPC así como modificaciones durante la ontogenia bajo diferentes condiciones ambientales.

## **5.5 Estudio histológico e histoquímico**

Se realizó el estudio morfológico para determinar si los cambios en la velocidad de germinación observados en las semillas almacenadas por distintos periodos y en las semillas cultivadas en distintas condiciones estaban asociados a



características histológicas o histoquímicas en las semillas de las dos líneas estudiadas. Se utilizaron semillas en distintas etapas de la ontogenia: semillas maduras (>60 DPA, cosecha 1999) en las que Redland B2 tenía mayor velocidad de germinación que IS9530 y semillas inmaduras (22 DPA, cosecha 2003) que al llegar a la madurez, presentaban una velocidad de germinación invertida (Fig. 17).

### 5.5.1 Semillas maduras (más de 60 DPA)

En las figuras (21 a 24) se describe la estructura típica de una semilla de sorgo madura de la línea Redland B2 cosecha 1999, con mayor velocidad de germinación que IS9530. En particular, en la figura 22 se identificó el tejido del eje embrionario (EE), rodeado por el escutelo (ES) y el endospermo (EN); y finalmente, en la parte externa del corte se identificaron residuos del pericarpio (PE) sobre todo en la parte basal de la semilla. La anatomía observada fue similar a la encontrada en las semillas de IS9530 (datos no mostrados), sin presentarse diferencias histológicas o histoquímicas entre ambas.



Figura 21. Corte longitudinal de una semilla madura sin imbibir, de la línea Redland B2, cosecha 1999 almacenada durante cuatro años, 10x, campo claro,

técnica: safranina-verde rápido. Eje embrionario (EE), escutelo (ES), endospermo (EN) y residuos de pericarpio (PE).

En la figura 22 (A y B) se identificaron las capas de tejido más externas de las semillas de ambas líneas: el endospermo (EN), la capa de aleurona (AL) monoestratificada y el pericarpio (PE). A pesar de la coloración diferente que se observa en los cortes, cabe mencionar que ambas semillas se procesaron con la misma técnica. Sin embargo, la intensidad de los colores varió debido al tiempo de exposición al colorante (safranina-verde) que tuvo cada una de las preparaciones, a la iluminación utilizada al tomar la microfotografía y/o al revelado de las mismas.

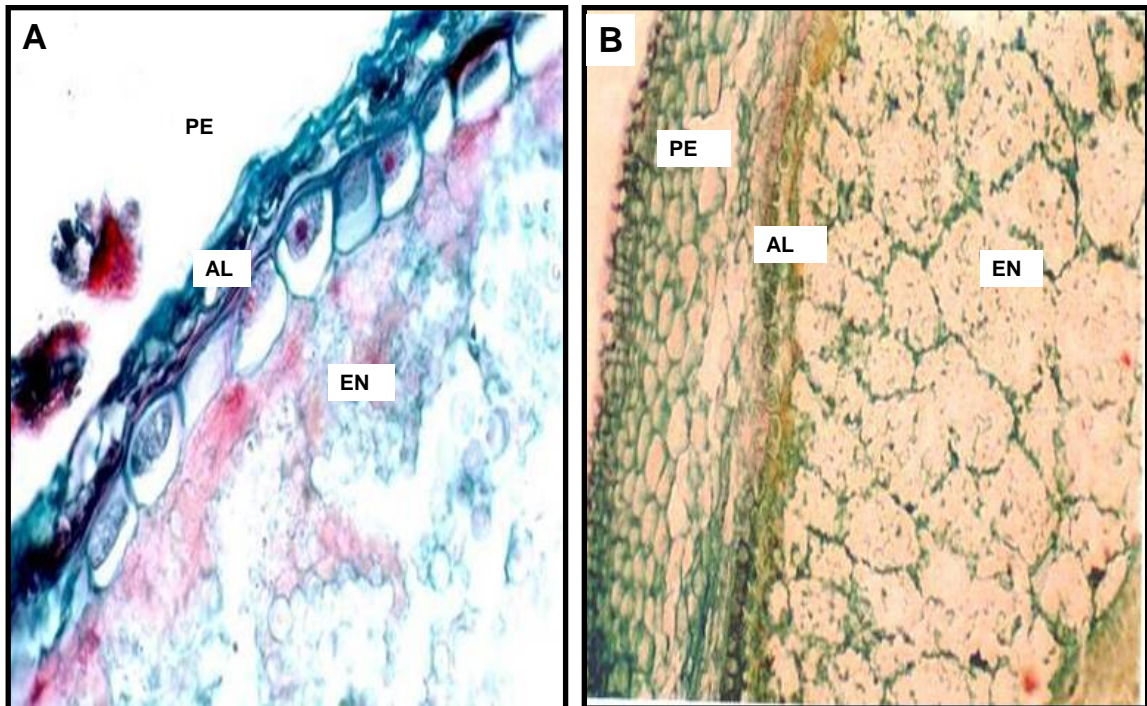


Figura 22 A y B. Cortes longitudinales de semillas maduras, cosecha 2003 México de la línea Redland B2 (A) (40x) y de la línea IS9530 (B) (20x), técnica de safranina-verde, campo claro. Endospermo (EN), pericarpio (PE) y aleurona (AL).



En las figuras 24 (A y B) se presentan los cortes de las semillas de la línea Redland B2 con la tinción histoquímica APS (Shiftt). Se observó una reacción positiva (presencia de gránulos de almidón), en el escutelo (ES) y en el endospermo (EN) (Fig. 24A). Por otro lado, se observó una reacción negativa en las células del eje embrionario (EE) (Fig 24B). Estas observaciones concuerdan con la descripción general para la estructura de las semillas de cereales. Se obtuvieron resultados similares con la línea IS9530 (figuras no mostradas).

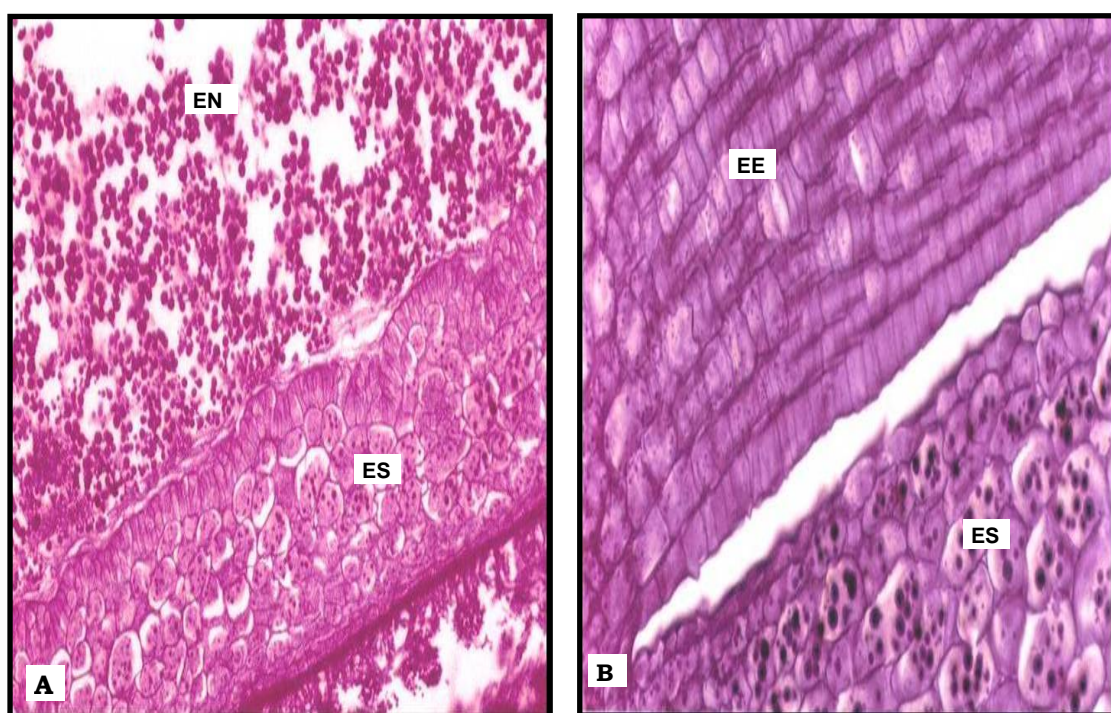


Figura 23 (A y B). Corte longitudinal de semillas maduras (cosecha 2003, México) de la línea Redland B2. Tinción de Shiftt. A) 10x, B) 20x, campo claro. Eje embrionario (EE), escutelo (ES), endospermo (EN).

En las figuras 24 (A) se observa la reacción positiva a la tinción histoquímica Azul-Negro de Naftol, la cual determina la presencia de proteínas en los tejidos de las semillas de la línea Redland B2. Tal reacción resultó similar en los cortes de las semillas de IS9530 (figuras no mostradas). Se observó la presencia de proteínas tanto en el escutelo como en la aleurona. En la figura 23(B) con la

técnica de permanganato de potasio se lograron identificar dos capas de taninos: una intermedia entre el pericarpio y la aleurona, y otra entre la aleurona y endospermo. Los taninos están asociados con la latencia además de proteger a la semilla contra patógenos (Ting, 1982).

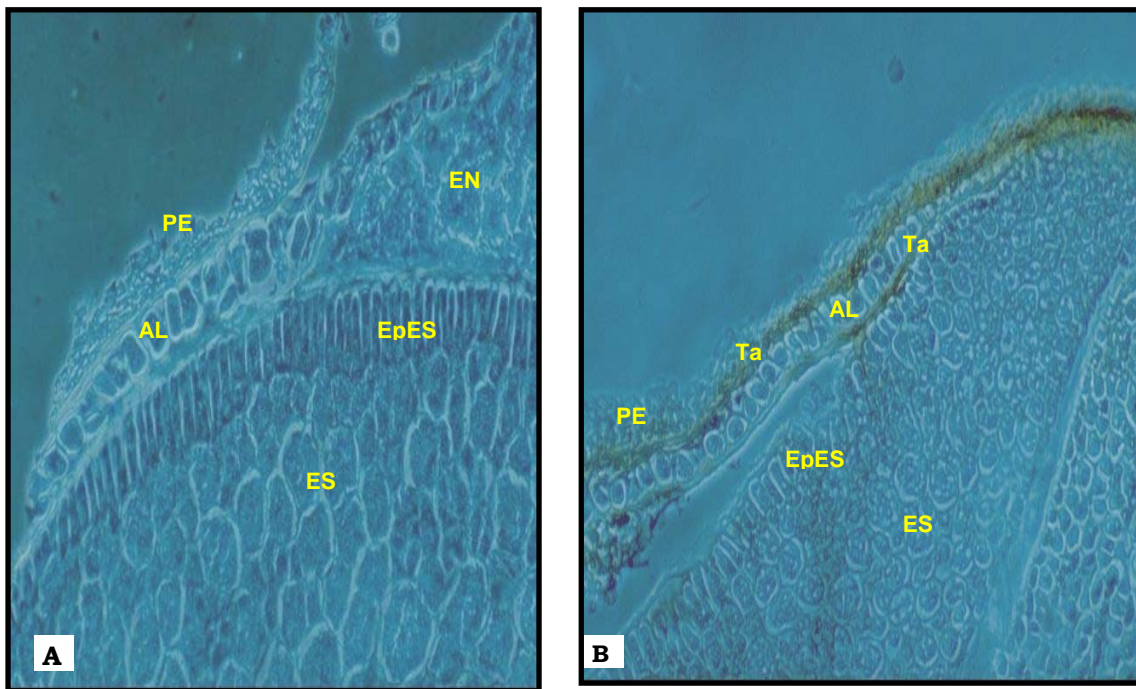


Figura 24. Corte longitudinal de semillas maduras de la cosecha 1999 de la línea Redland B2, tinción de Azul Negro, 10x, contraste de fases (A) y permanganato de potasio, 10x, contraste de fases (B). Escutelo (ES), (EN) endospermo, (PE) pericarpio, (AL) aleurona y (Ta) taninos, (EpES) epidermis del escutelo.

Al realizar la tinción histoquímica de rojo oleoso (Fig. 25), la cual identifica depósito de cutina en cutículas del tejido, se observó la presencia de tres cutículas: una que recubre al endospermo (C3) en la región más alejada del embrión (debajo del tejido del pericarpio), una segunda capa (C2) que recubre al escutelo en la parte intermedia entre el escutelo y el endospermo y; finalmente, una tercera capa (C1) que recubre al eje embrionario. Tales

características fueron similares tanto en los cortes de las semillas de Redland B2 como para los de las semillas de la línea IS9530 (Figuras no mostradas).

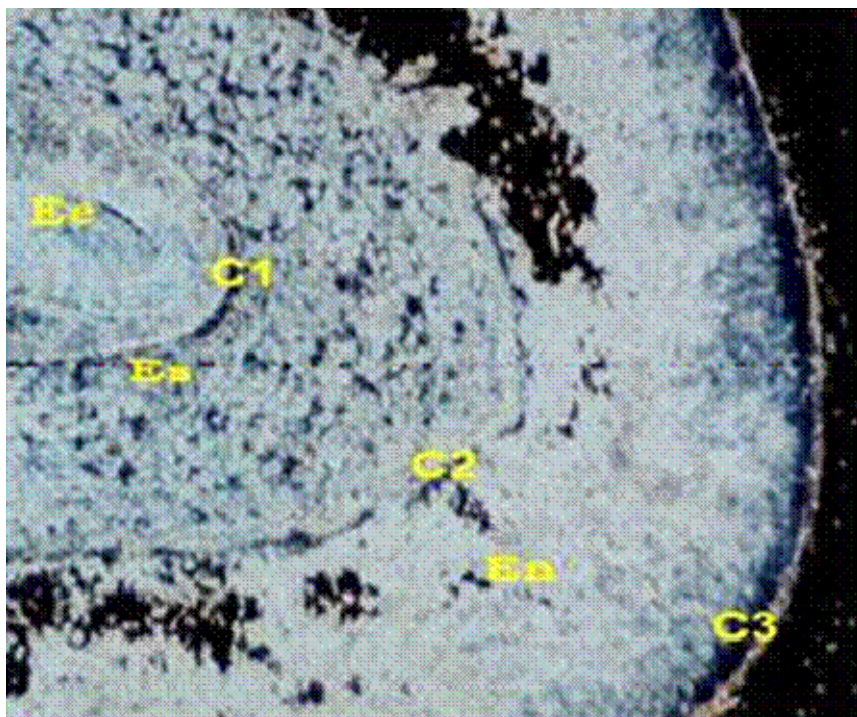


Figura 25. Corte longitudinal de las semillas maduras de la línea Redland B2 (cosecha 1999). Rojo oleoso, Contraste de fases 25x. Pericarpio (Pc), (C3) cutícula, (Al) aleurona, (En) endospermo, (C2) cutícula, (Es) escutelo, (C1) cutícula y (Ee) eje embrionario.

### 5.5.2 Semillas en desarrollo, 22 DPA

En forma general las semillas inmaduras (22 DPA) de ambas líneas (IS9530 y Redland B2) cosecha 2003 (México) presentaron la misma histología general que las descritas previamente para las semillas maduras. Sin embargo, se observó que el proceso de depósito de cutículas en etapas tempranas en Redland B2 es más lento que en IS9530 ya que en estas últimas semillas las capas de cutícula son evidentes desde los 22DAP. En las figura 25 (A y B), se observó la ausencia casi total de la capa de cutícula más interna, que es la que recubre al embrión (C1) en las semillas inmaduras de Redland B2 (cosecha



2003 México), En estas mismas preparaciones se midió el grosor de los estratos de la cubierta del lado del embrión; y se determinó que el grosor de estos estratos es mayor en semillas inmaduras de la línea IS9530 ( $442.07 \mu\text{m} \pm 25.48$ ) respecto a las semillas de la línea Redland B2 ( $376.20 \mu\text{m} \pm 14.67$ )

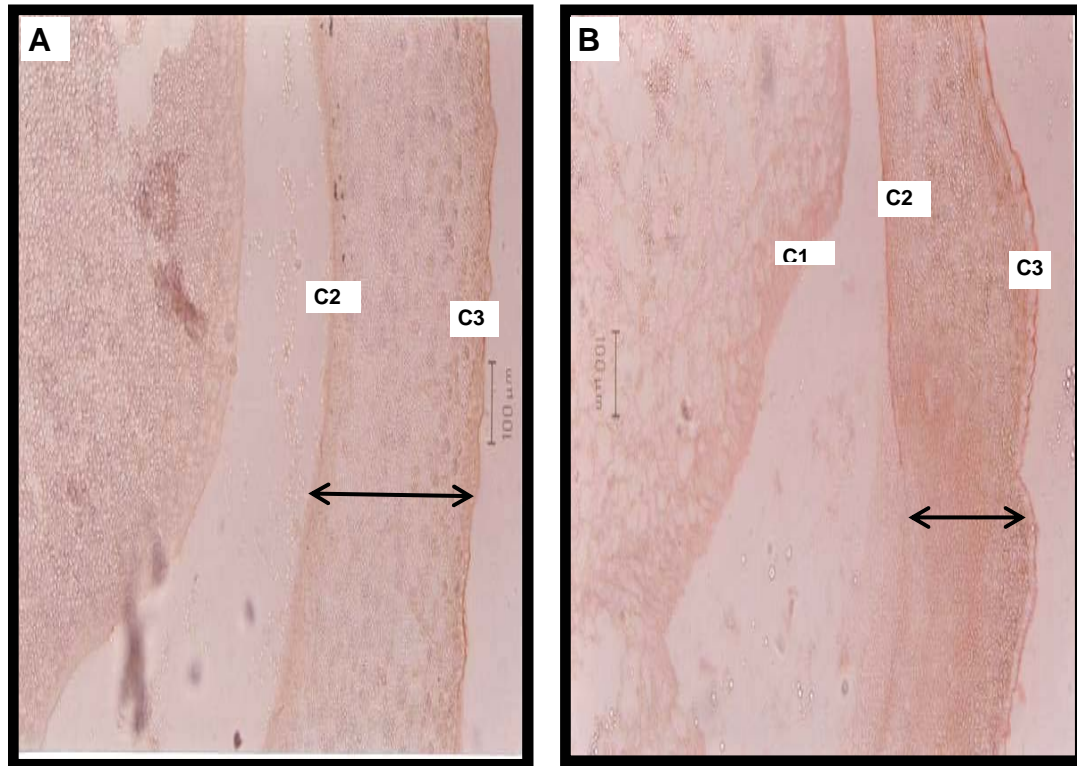


Fig. 26. Corte longitudinal de semillas inmaduras (22DPA) de la cosecha de 2003 (México) A) Línea Redland B2 y B) línea IS9530, Rojo Oleoso, campo claro 10x. Cutícula (C3), (C2) cutícula, (C1) cutícula.

En las siguientes figuras (Fig.27 A y B) se observó que el desarrollo del embrión de 22 DPA es más rápido en Redland B2 que en IS9530. Esto se evidenció por el poco número de células embrionarias que se puede observar en las preparaciones de las semillas inmaduras de la línea IS9530.

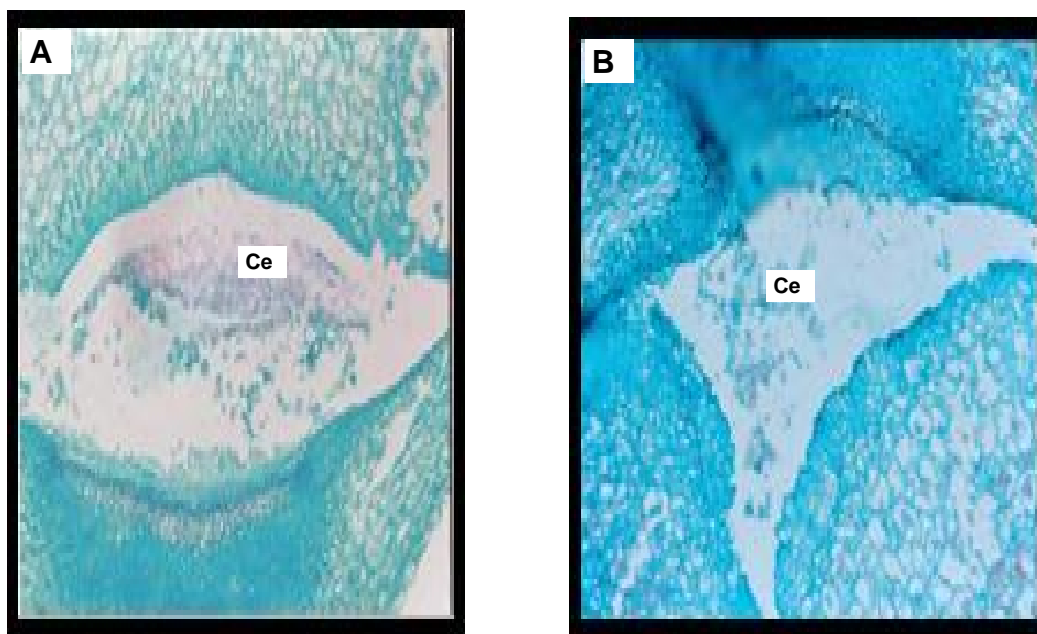


Figura. 27 Corte longitudinal de las semillas inmaduras (22 DPA) de la línea Redland B2 (A) y de la línea IS9530 (B) cosecha 2003 (México), Safranina-Verde rápido, campo claro 25x. Células embrionarias (Ce).

De acuerdo a la bibliografía existen evidencias de que la morfología de las semillas influye en la velocidad y porcentaje de germinación. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no hay evidencias histológicas o histoquímicas que expliquen los cambios de la velocidad de germinación de semillas maduras de ambas líneas. En este sentido, las semillas de la cosecha 1999 que presentaron susceptibilidad contrastante al BPC recién cosechadas (donde Redland B2 es susceptible e IS9530 es resistente) y que de acuerdo a nuestro trabajo conservaban una velocidad de germinación más rápida para Redland B2 después de 4 años de almacenamiento, no mostraron diferencias histológicas ni histoquímicas con respecto a las de IS9530.

Por otra parte, se determinó la velocidad de toma de agua de las semillas de ambas líneas a través del aumento en el peso fresco de las semillas con respecto al tiempo de imbibición (Fig. 27). No hubo diferencias significativas

entre las dos líneas, ya que morfológicamente las semillas maduras de ambas presentaron las tres cutículas.

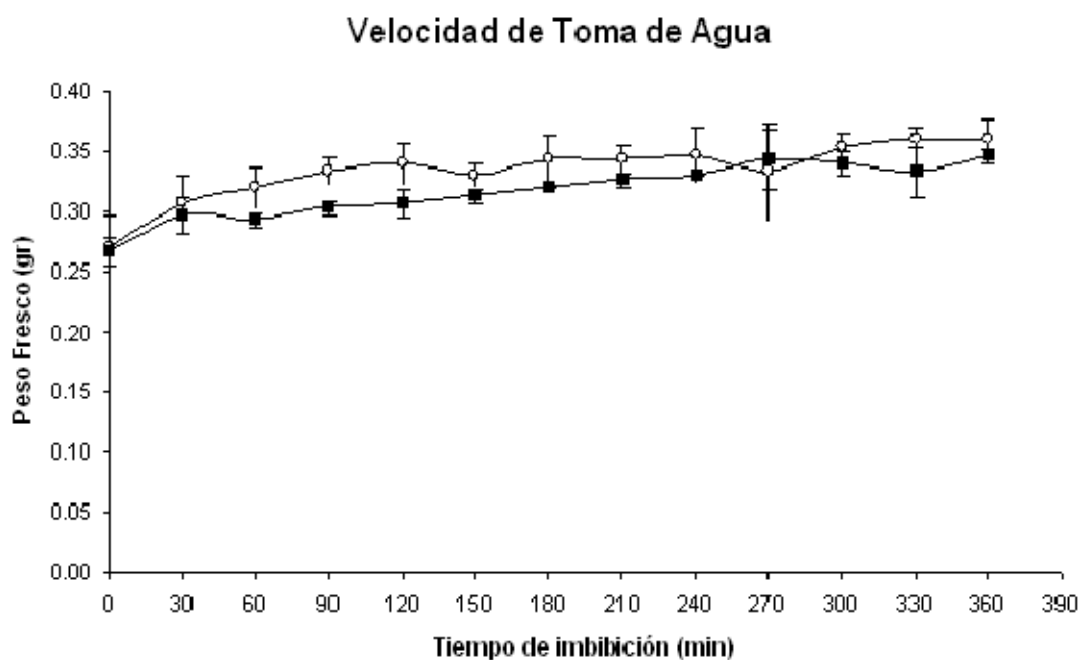


Figura 27 Velocidad de toma de agua en semillas maduras de la cosecha 2003 (México). Donde (■) corresponde a las semillas de la línea IS9530 y (○) corresponde a las semillas de la línea Redland B2.

Sin embargo sí se encontraron diferencias en las semillas inmaduras respecto a la velocidad de desarrollo de las células embrionarias, siendo más rápida en las semillas de Redland B2 que en IS9530, y en la velocidad de deposición de cutículas, ya que en IS9530 se encontraron las tres capas de cutícula en etapas tempranas del desarrollo, mientras que en Redland B2 solamente se encontraban dos capas desarrolladas. Tales diferencias durante el desarrollo de la semilla apoyan el comportamiento de susceptibilidad contrastante ya que el hecho de que se desarrollen más rápido las células embrionarias y más tarde las capas de cutina establece las condiciones necesarias para que las semillas de Redland B2 germinen antes, dependiendo de las condiciones ambientales. Dado que las semillas maduras ya no presentaron diferencias en la velocidad de germinación se sugiere que probablemente hay una etapa posterior en el desarrollo en las que se pierden las diferencias observadas. Por lo que es



necesario continuar con los estudios histológicos durante diferentes etapas del desarrollo. No obstante, es necesario mencionar que las semillas con más de 47DPA no se pudieron cortar sin causar destrucción de los tejidos.

Por otro lado, si tomamos en cuenta que la imposición del grado de latencia y por tanto la susceptibilidad al BPC, se determina principalmente durante el desarrollo de la semilla, entonces se puede considerar como un factor importante el tiempo de desarrollo embrionario en las semillas de la línea Redland B2 en comparación con las de IS9530. Es decir, si en etapas tempranas las células embrionarias de las semillas de Redland B2 ya están desarrolladas y no cuentan con la suficiente protección (dos capas de cutina en vez de tres) entonces tales características las volverá susceptibles a las condiciones climáticas y/o de la planta madre. Esto es que debido a la baja protección de las células embrionarias pudo haber una difusión de agua al interior de la semilla, activando así varios procesos metabólicos sin llegar a la protusión de la raíz pero sí aumentando los niveles de EROS y por tanto el daño celular.

Si consideramos que al igual que el desarrollo de las células embrionarias, el desarrollo del endospermo también es tardío, entonces la disposición de este último en estado vítreo implicaría menos protección a diferentes enzimas y/o a las membranas durante la etapa de desecación y subsecuentemente durante el tiempo de almacenamiento. Aunque tales consideraciones en el aspecto morfológico no explicarían la pérdida de latencia en las semillas de la línea IS9530, sí justificarían la pérdida de viabilidad subsiguiente a la imbibición de las semillas de la línea Redland B2.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios histológicos e histoquímicos evaluados en este trabajo indican que existen características en etapas tempranas del desarrollo de la semilla (22DPA, cosecha 2003) de ambas líneas que explican la velocidad de germinación mayor en las semillas de Redland B2 que las de IS9530. Sin embargo, no explican los cambios en la velocidad de germinación observados en las semillas recién cosechadas (cosecha 2003, semillas inmaduras). Tales diferencias histológicas en etapas tempranas podrían causar una mayor susceptibilidad en etapas tempranas a modificaciones en la bioquímica de la semilla provocando los cambios en la viabilidad y en la velocidad de germinación observados en las semillas recién cosechadas (cosecha 2003) y almacenadas por 4 años (cosecha 1999).

La similitud en la actividad enzimática ( $\alpha$ -amilasa) observada en las semillas sin imbibir e imbibidas por 5 días, correlaciona con los cambios en la velocidad de germinación observados para ambas líneas. De acuerdo a esta información se considera que se deben continuar con los estudios histológicos, así como con los estudios de actividad enzimática, en distintas etapas de la ontogenia de las semillas de ambas líneas para determinar si estas características diferenciales se pierden en etapas más avanzadas del desarrollo.

Los cambios en la velocidad de germinación observados (IS9530 germina más rápido que Redland B2) podrían ser consecuencia de las diferentes condiciones ambientales en las cuales se desarrollaron las semillas. En particular, a los efectos de la temperatura y humedad y en el caso de las semillas almacenadas al efecto del almacenamiento en frío que afectó la viabilidad de Redland B2 e incrementó la capacidad de germinación de IS9530.

La pérdida de la sensibilidad al ABA y el aumento de la sensibilidad a las GAs observados en las semillas de la línea IS9530 correlacionan con su velocidad de germinación.

Para contribuir a separar los efectos genéticos y ambientales en la susceptibilidad al BPC, es necesario continuar estos experimentos en varios años registrando cuidadosamente las condiciones.

Es necesario estudiar si existen alteraciones en los niveles endógenos de estas hormonas ABA y GAs, así como la expresión genética de enzimas regulatorias en la biosíntesis de estas hormonas. Que complementen la información de sensibilidad obtenida en este trabajo, para conocer todos los componentes del balance hormonal que expliquen la capacidad de germinación de ambas líneas. De igual forma, es necesario iniciar estudios del deterioro de las semillas durante el almacenamiento y del daño por estrés oxidativo y actividades enzimáticas (enzimas antioxidantes).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alam, S., Asghar, A., Qamar, I., Arshad, M. y Sheikh, S. (2001) Correlation of economically important traits in *sorghum bicolor* varieties. Journal of Biological Sciences 1:330:331

Allen, P. y Meyer, S. (1998) Ecological aspects of seed dormancy loss. Seed Science Research 8:183-191

Andersson, L. y Milberg, P. (1998) Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. Seed Science Research 8: 29-38

Baillly, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14:93-107

Baskin, C. y Baskin, J. (1998). Seeds. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Ed. Academic Press. New York.

Benech-Arnold, R., Enciso, S., Sánchez, R., Carrari, F., Perez, L., Iusem, N., Steinbach, H., Lijavetzky, D. y Bottini, R. (2000). Involvement of ABA and GAs in the regulation of dormancy in developing sorghum seeds. Seed Biology: Advances and Applications. Ed. CABI publishing pp.101-111.

Benech-Arnold, R., Kristof, G., Sanchez, R., M., Steinbach Y Marcucci-Poltri, S. (1995a). Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting resistance and susceptible varieties. Plant Physiology 113: 149-154.

Benech-Arnold, R., Sánchez, R., Steinbach, H. Y Kristof, G. (1995b). Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in sorghum varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility. Journal of Experimental Botany 46: 711-717.

Bewley, D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.

Bethke, P., Schuurink, R. y Jones, R. (1997) Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany* 48(312): 1337-1356

Bradbeer, J.W. y Pinfield, N.J. (1966) Studies in seed dormancy: 3. The effects of gibberellin on dormant seeds of *Corylus avellana* L. *New Phytologist* 66: 515-523.

Bruggink, G., Ooms, J. y Van der Toorn, P. (1999) Induction of longevity in primed seeds. *Seed Science Research* 9 : 49-53.

Carrari, F., Lijavetzki, D., Pérez-Flores, L., Iusem, N., Benech-Arnold, R., Sánchez, R y Hopp, H. (1998). Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize vp1 and its involvement in pre-harvest sprouting. *Pre-harvest Sprouting in Cereals* (Weipert, D. Ed) Germany.

Castor, L. y Frederiksen, R. (1997). Seed mouldingf grain sorghum caused by *Fusarium* and *Curularia*. *Proceedings of the Annual Phytopathology Society* 4: 151.

Chiang, H., Hwang, I. y Goodman, H. (1995). Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* 7: 195-201.

Clark, L., Collier, J. y Langston, R. (1967) Dormancy in *Sorghum bicolor* (L.) Moench I. Relationship to seed development. *Crop Science* 7:497-501

Clark, E., Collier, J. y Langston, R. (1968). Dormancy in *Sorghum bicolor* (L.) Moench II. Effect of pericarp and testa. *Crop Science* 8: 155-158.

Drozdowicz, Y. y Jones, R.L. (1995) Homonal regulation of organic and phosphoric acid release by barley aleurone layers and scutella. *Plant Physiology* 108: 769-776.

Duffus, C. y Slaughter, C. (1985) *Las semillas y sus usos*. Ed. AGT Editor, S.A. México.

Dunwell, J.M. (1981) Dormancy and germination in embryo of *Hordeum vulgare* L. Effect of dissection, incubation temperature and hormone application. *Annals of Botany* 48:203–213.

Faith, A., Bethke, P. y Jones, R. (2001). Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone.. *Plant Physiology* 126: 156-166.

Gale, M., Flintham, J. y Devos, K. (2002) Cereal comparative genetics and preharvest sprouting. *Euphytica* 126:21-25

Gilroy, S. y Jones, R.L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplast. *Plant Physiology* 104: 1185-1192.

Gluber, F. y Jacobsen, J.V. (1992) Gibberellin-response elements in the promoter of a barley high- $\alpha$ -amilase gene. *Plant Cell* 4:1435-1441.

Hedden, P. y Phillips, A. L. (2000a) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *5* : 523-530

Hedden, P. y Phillips, A. L. (2000b) Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 11:130–137

Humphreys, D.G., y Noll, J. (2002) Methods for characterization of preharvest sprouting resistance in a wheat breeding program. *Euphytica* 126:61-65

Jones, R., Harberd, N. y Kamiya, Y. (2000) Gibberellins 2000. Trends in Plant Science 5: 320-321

Jones, H.D., Smith, S.J., Desikan, R., Plakidou-Dymock, S., Lovegrove, A. y Hooley, R. (1998) Heterodimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of  $\alpha$ -amylase gene expression in wild oat aleurone layer. Plant Cell 10: 245-253.

Kermode, R. (1990). Regulatory Mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews in Plant Science 19: 155-188.

Lange, T. (1994). Purification and partial amino-acid sequence of gibberellin 20-oxidase from cucurbita maxima L. endosperm. Planta 195: 108-115.

Lange, T. (1998). Molecular Biology of Gibberellin Synthesis. Planta 204: 409-419.

Leopold, C., Sun, W. y Bernal-Lugo, I. (1994) The glassy state in seeds: analysis and function. Seed Science Research 4: 267-274

Lovegrove, A. and Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. Trends in plant science 5 : 102-110

MacLeod, A., Duffus, J. y Johnston, C. (1964). Development of hydrolytic enzymes in germinating grain. Journal of Inst. of brewing 70: 521-528.

Mora, A., Vidal, R. y Onofre, L. (2000) Cambios en Biomasa, Viabilidad y Germinación en semillas en desarrollo en trigo. Agrociencia 34: 181-192

Moreno, C. (1996). Vida y obra de granos y semillas. La ciencia desde México ED. México, D.F.

Olszewski, N., Sun, T. y Gubler, F. (2002) Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *The Plant Cell*, S15-S45

Paleg, I. G. (1960). Physiological effects of gibberellic acid I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiology* 35: 293-299.

Pagano, E., Benech-Arnold, R., Wawrzkiwicz, M. y Steinbach, H. (1997)  $\alpha$  - Amylase activity un developing sorghum caryopses from sprouting resistant and susceptible varieties. The role of ABA and GAs on its regulation. *Annals of Botany* 79:13-17.

Perez-Flores, L.J., Osuna-Fernandez, R.H., Carrari, R., Rodríguez, V., Enciso, S., Stanelloni, R., Sánchez, R., Botín, R., Iusem, N., y Benech-Arnold, R. (2003) Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos from two lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. *Journal of Experimental Botany* 54: 2071-2079.

Roach, D. y Wulff, R. (1987) Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecological Systems*. 18: 209-235.

Roberts, H. (1972) *Viability of Seeds*. Capitulo 11. Ed. Chapman and Hall Ltd. Londres.

Reddy, L., Metzger, T. y Ching, T. (1985) Effect of temperature on seed dormancy on wheat. *Crop Science* 25, 455-458.

Romagosa, I., Prada, D., Moralejo, M., Sopena, A., Muñoz, P., Casas, A., Swanson, J. y Molina, J. (2001) Dormancy, ABA content and sensitivity of a barley mutant to ABA application during seed development and after ripening *Journal of Experimental Botany* 52 : 1499-1506.



Ritchie, S., McCubbin, A., Ambrose, G., Kao, T. y Gilroy, S. (1999) The sensitivity of barley aleurone tissue to gibberellin is heterogeneous and may be spatially determined. *Plant Physiology* 120:361-370.

Salisbury, F. y Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana.

Serrano, R. y Montesinos, C. (2003) Molecular Bases of Desiccation Tolerance in Plant Cells and Potential Applications in Food Dehydration *Food Science and Technology International* 9: 157-161.

Skerritt, J. y Heywood, R. (2000) A five field test for on-farm detection of preharvest sprouting in wheat. *Crop Science* 40:742-756

Skriver, K., Olsen, FL., Rogers, JC. y Mundy, J. (1991) Cis-acting DNA responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Science*. 88: 7266-7270.

Schuurink, R.C., Chan, P.V. y Jones, R.L. (1996) Modulation of calmodulin mRNA and protein levels in barley aleurone. *Plant Physiology* 111:371-380.

Somody, C., Nalewaja, J. y Miller, S. (1984) The response of wild oat (*avena fatua*) and *avena sterilis* accessions to the daylight and the temperature. *Weed Science* 32 : 206-213.

Steinbach, H., Banech, R. y Sánchez, R. (1997) Hormonal regulation of Dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology* 113:149-154.

Ting, I. (1982) *Plant Physiology*. Addison-Wesley Publishing Company. 309-314

Walker-Simmons M. (1987). ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology* 84: 61-66.

Welbaum, G. E., Tissaoui, T. & Bradford, K.J. (1990). Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo L.*). III Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiology* 92: 1029-1037.

White, C. y Rivi, C. (2000). Gibberellins and Seed Development in Maize. II Gibberellin synthesis Inhibition Enhances Abscisic Acid Signaling in Cultured Embryos. *Plant Physiology* 122: 1089-1097.

Wilkinson, M., McKibbin, R., Bailey, P., Flintham, J., Gale, M., Lenton, J. y Holdsworth, M. (2002) Use of comparative molecular genetics to study pre harvest sprouting in wheat. *Euphytica* 126: 27-33.

Xu, Yil., Li, L. Wu, K., Peeters, A., Gage, D. y Zeevaart, J. (1995) The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional Gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proceedings of the National Academy of Science*. 92: 6640-6644

Zeiger, E. y Taiz, L. (1998) *Plant Physiology*. Segunda edición. Ed. Sinauer Associates, Inc. Estados Unidos.