

TASA RESPIRATORIA Y VIGOR DE SEMILLAS EN GIRASOL

RESPIRATION RATE AND SEED VIGOR IN SUNFLOWER

Mecinda Gatica Vásquez¹, Juan C. Molina Moreno², Aquiles Carballo Carballo²
y Victor A. González Hernández²

RESUMEN

En este trabajo se cuantificó la tasa de respiración en semillas de 20 familias de girasol (*Helianthus annuus* L.) con bajo y alto contenido de aceite, durante el proceso germinativo, así como el vigor de las plántulas. Las diferencias encontradas entre las familias de alto y bajo contenido de aceite, en cuanto al vigor de las semillas, evaluado mediante la prueba de tetrazolio, fueron mínimas pero consistentes, estableciéndose que la familia F-394 de alto contenido de aceite superó a la familia F-13 de bajo contenido de aceite. Se encontró que las dos familias produjeron tanto plántulas vigorosas como no vigorosas, y que estas últimas respiraron a una tasa marcadamente inferior a la de las plántulas vigorosas, siendo más notoria la diferencia a las 96 horas de iniciada la imbibición. Entonces, la tasa respiratoria, particularmente en esa etapa de la germinación, podría ser utilizada como criterio de selección para vigor de semilla y plántula en girasol.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Helianthus annuus L., contenido de aceite, vigor de la semilla, respiración.

SUMMARY

In this study the respiration rate of germinating seeds of 20 sunflower (*Helianthus annuus* L.) families was related to their seed vigor and oil content. With respect to seed vigor as measured by the tetrazolium test, the differences among the

families with high and low oil content were small but consistent, establishing that family F-394 was more vigorous than family F-13. It was found that the two genotypes produced both vigorous and non vigorous seedlings. The non vigorous seedlings showed a lower respiration rate than the vigorous seedlings, particularly after 96 hours of imbibition. Thus, the respiration rate at this stage of germination could be used as selection index for seed and seedling vigor in sunflower.

ADDITIONAL INDEX WORD

Helianthus annuus L., oil content, seed vigor, respiration.

INTRODUCCION

La germinación es el proceso que reactiva el metabolismo de la semilla para que ocurra la emergencia de la plántula mediante el desarrollo de las estructuras esenciales que provienen del embrión, permitiendo así la formación de una planta normal bajo condiciones favorables. La energía requerida en la germinación se genera en el proceso respiratorio a través de la oxidación enzimática de moléculas como sacarosa, almidón, lípidos y proteínas contenidas en la semilla; la energía química así liberada es utilizada para la síntesis de otras moléculas necesarias para el crecimiento (Salisbury y Ross, 1978; Bidwell, 1979).

En semillas oleaginosas se considera que los altos contenidos de lípidos ocasionan mayor susceptibilidad al deterioro causado por un manejo inadecuado de la humedad relativa y la temperatura durante el almacena-

¹ Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, México.

² Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados. C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, México.

miento. Ello se atribuye a que los lípidos están sujetos a continuas oxidaciones que dan como resultado la formación de hidropéroxidos, ácidos grasos oxigenados y diversos radicales libres, los cuales promueven la desnaturalización del ADN, inhiben la síntesis de proteínas, oxidan ciertos aminoácidos, afectan la permeabilidad de las membranas celulares, incluyendo la mitocondrial y abaten la respiración y producción de energía durante la germinación. Todo ello en conjunto conlleva a reducciones del vigor y germinabilidad de la semilla (Amable y Obendorf, 1986; Ferguson *et al.*, 1990a; Ferguson *et al.*, 1990b). La magnitud de tales efectos están relacionados con las características genéticas de la planta (Krishnasamy y Seshu, 1990; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que durante las primeras horas de imbibición, la actividad respiratoria guarda una correlación positiva con la ruptura de la cubierta seminal y el crecimiento de la plántula, es decir con el vigor de la semilla (Al-Ani *et al.*, 1985; Rimbawanto *et al.*, 1989; Ferguson *et al.*, 1990a).

Según Sívori *et al.* (1980) y Garwood y Lighton (1990), el ritmo de absorción de oxígeno, como medida de la tasa respiratoria, muestra tres fases durante la germinación. La primera se caracteriza por una tasa creciente asociada con la activación de enzimas hidrolíticas y la utilización de aminoácidos y ARN longevo en la síntesis de proteínas. La segunda se distingue por un ritmo constante de respiración, el cual coincide con la formación de nuevos ribosomas, ácidos nucleicos, enzimas, mitocondrias, plastidios, glioxisomas, núcleos y membranas. En el transcurso de la tercera fase, que corresponde al alargamiento y división celular, la tasa respiratoria crece sostenidamente en forma paralela al desarrollo de la plántula.

En semillas deterioradas y de bajo vigor, Priestley (1986) encontró que los daños pueden detectarse en estados tempranos de la imbibición, aunque son más evidentes conforme ésta progresa. Al respecto, Cseresnyes (1979) observó que la tasa de absorción de agua fue superior en un lote de semillas de girasol cuyo porcentaje de germinación era de 94% comparado con uno de 44%, siendo evidente dicha superioridad desde el inicio de este proceso. Sin embargo, a partir de las 24 horas y a medida que ésta avanzó, la diferencia entre lotes fue mayor, de tal forma que a las 96 horas la tasa de imbibición de las semillas con alta germinación era el doble de la observada en las semillas con bajo poder germinativo.

En semillas de soya, Ferguson *et al.* (1990a) encontraron que al reducirse la tasa de respiración mitocondrial debido al deterioro de la semilla, la velocidad de emergencia de la radícula y el crecimiento de la plántula también se abatieron.

De manera similar, Al-Ani *et al.* (1985) determinaron que la tasa de germinación de 12 diferentes cultivos se redujo gradualmente conforme la actividad respiratoria disminuyó, indicando que la tasa de germinación depende de la actividad metabólica desde el inicio de la imbibición hasta que ocurre la protusión de la raíz.

Al evaluar cuatro lotes de semilla de pasto (*Bromus biebersteinii*), Hall y Weisner (1990) observaron que el grado de envejecimiento de la semilla se correlaciona significativamente con el crecimiento de la plántula, la tasa de respiración, la producción de ATP y la producción de forraje en campo durante el primer año. Estos resultados también son apoyados por las investigaciones de Ketring (1991) en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), quien encontró correlaciones consistentes entre la emergencia de la

radícula e hipocotilo con la producción de CO₂ durante la respiración.

Por lo anteriormente señalado, en este trabajo se consideró conveniente comparar familias de girasol durante la germinación de sus semillas, relacionando las tasas de respiración, la viabilidad de las semillas, el contenido de aceite y el vigor de las plántulas.

MATERIALES Y METODOS

El material genético estuvo constituido por 20 familias de girasol, divididas en dos grupos de 10: Uno de alto contenido de aceite (45.1 a 47.4%) y otro con bajo contenido (38.6 a 40%). La semilla fue proporcionada por el Programa de Oleaginosas de la Universidad Autónoma Chapingo.

La evaluación inicial de la calidad fisiológica de las semillas se hizo mediante la prueba de tetrazolio en la que se midió la intensidad y homogeneidad de la tinción de 40 semillas por familia (Moreno, 1984), de manera que se pudieron clasificar en semillas de vigor alto (VA), vigor medio (VM) y vigor bajo (VB).

Posteriormente se seleccionó una familia de cada grupo de contenido de aceite para medir su biomasa y su actividad respiratoria durante la germinación; éstas fueron la F-13 y F-394, cuyos contenidos de aceite eran 40 y 46%, respectivamente. Para esta prueba las semillas se pusieron a germinar utilizando la técnica estándar de laboratorio (entre papel), incubándolas a 25°C, según Moreno (1984).

La tasa respiratoria se midió en 11 tiempos de la germinación: 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas, en los cuales las condiciones ambientales fluctuaron como se indica: la temperatura ambiental de 17 a 22°C, la humedad relativa de 61 a 79 %, y

la concentración de CO₂ de 370 a 394 ppm (v/v). Dicha actividad se midió con el método reportado por Cruz *et al.* (1994), empleando un aparato portátil de fotosíntesis LI-6200 (LI-COR, Inc.) con el que también se registró la concentración de CO₂, la humedad relativa y la temperatura del aire en cada lectura. El tamaño de muestra fue de 20 semillas en el 90% de las observaciones y de 25 a 17 en el 10% restante. En todos los casos se midieron tres repeticiones por tratamiento. A partir de las 24 horas de germinación las semillas se pudieron agrupar en vigorosas y no vigorosas, de acuerdo con el tamaño de la radícula expuesta y el daño que presentaron las estructuras de las plántulas, midiendo por separado la actividad respiratoria de cada tipo. Dicha actividad se calculó de tres formas: por semilla individual, por gramo de materia fresca y por gramo de materia seca, expresándose en todos los casos en micromoles de CO₂ por segundo.

En esta prueba también se registró el número de semillas vigorosas (SEMV), número de semillas no vigorosas (SEMN), peso fresco total (PFT), peso fresco de vigorosas (PFV), peso fresco de no vigorosas (PFNV), peso seco total (PST), peso seco de vigorosas (PSV), y peso seco de no vigorosas (PSNV). Estos datos se sometieron a análisis estadístico de acuerdo con un diseño completamente al azar con tres repeticiones, y la comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSION

Prueba de tetrazolio

Se encontró que entre familias hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en cuanto al número de semillas de alto vigor, pero no en el número de semillas de vigor medio y bajo. En este caso la familia 394 superó a la

familia 13; sin embargo, las diferencias fueron mínimas, aun en las semillas de alto vigor.

Al comparar los valores promedio de los dos grupos de familias (alto y bajo contenido de aceite) no se encontraron diferencias en el vigor de las semillas, lo que sugiere que las variaciones en tinción con tetrazolio no estuvieron relacionadas con el contenido de aceite.

En otros casos, como en soya (Amable y Obendorf, 1986), la prueba de tetrazolio ha permitido distinguir diferencias en vigor de semilla asociadas con reducciones en el metabolismo germinativo. Se infiere entonces que entre las familias de girasol estudiadas hubo escasas diferencias en el vigor promedio de la semilla.

Evaluación de la respiración

A partir de las 24 horas de germinación, las semillas se agruparon en vigorosas y no vigorosas de acuerdo con la metodología descrita. La familia F-394 de alto contenido de aceite superó en peso y proporción de semillas vigorosas (74%) a la familia F-13 de bajo contenido de aceite (68%). Este resultado concuerda con el obtenido en la prueba de tetrazolio.

Peso fresco y seco de semillas vigorosas y no vigorosas

Tanto las semillas vigorosas como las no vigorosas aumentaron su peso fresco a medida que transcurrió la germinación. Dicha ganancia en peso fue mucho menor en las no vigorosas, de manera que la diferencia entre ambos tipos de semilla fue creciente desde las 48 horas de iniciada la germinación, a tal grado que a las 96 horas las vigorosas ya duplicaban el peso de las no vigorosas (Figura 1). En cambio, el peso seco de los dos tipos de semilla se mantuvo constante

durante la germinación, indicando que en este caso el consumo de reservas por el proceso respiratorio fueron imperceptibles en términos de biomasa (Gatica, 1994).

Al comparar entre genotipos se encontró que las semillas vigorosas de la familia F-394 tendieron ligeramente a superar en peso fresco a las vigorosas de la F-13 a partir de las 96 h, siendo tal diferencia de 4% (Figura 1). Nuevamente, es de hacerse notar que estos resultados son congruentes con la prueba de viabilidad mediante tetrazolio.

Tasas de respiración en semillas

Comparación de genotipos

El factor familias mostró efectos significativos en la tasa respiratoria de las semillas vigorosas, pero no en la de semillas no vigorosas. La familia F-394 de alto contenido de aceite superó en tasa respiratoria por semilla a la F-13 de bajo contenido de aceite, particularmente a las 96 horas de iniciada la germinación (Figura 2A).

Ambos genotipos presentaron tres fases en la actividad respiratoria. La primera se caracterizó por un aumento consistente de dicha actividad hasta las 36 horas; en la segunda fase, de las 36 a las 72 horas, la actividad respiratoria tendió a mantenerse constante; en la tercera la respiración se aceleró, aún más que en la primera, alcanzando su máximo a las 96 horas, para después declinar. Tales fases coinciden con las señaladas por Sívori *et al.* (1980) y Garwood y Lighton (1990) para la respiración de las semillas durante la germinación. Según Garwood y Lighton (1990), la declinación respiratoria después de la emergencia de la radícula es común en algunas especies, ya que a partir de tal evento la respiración puede ser variable.

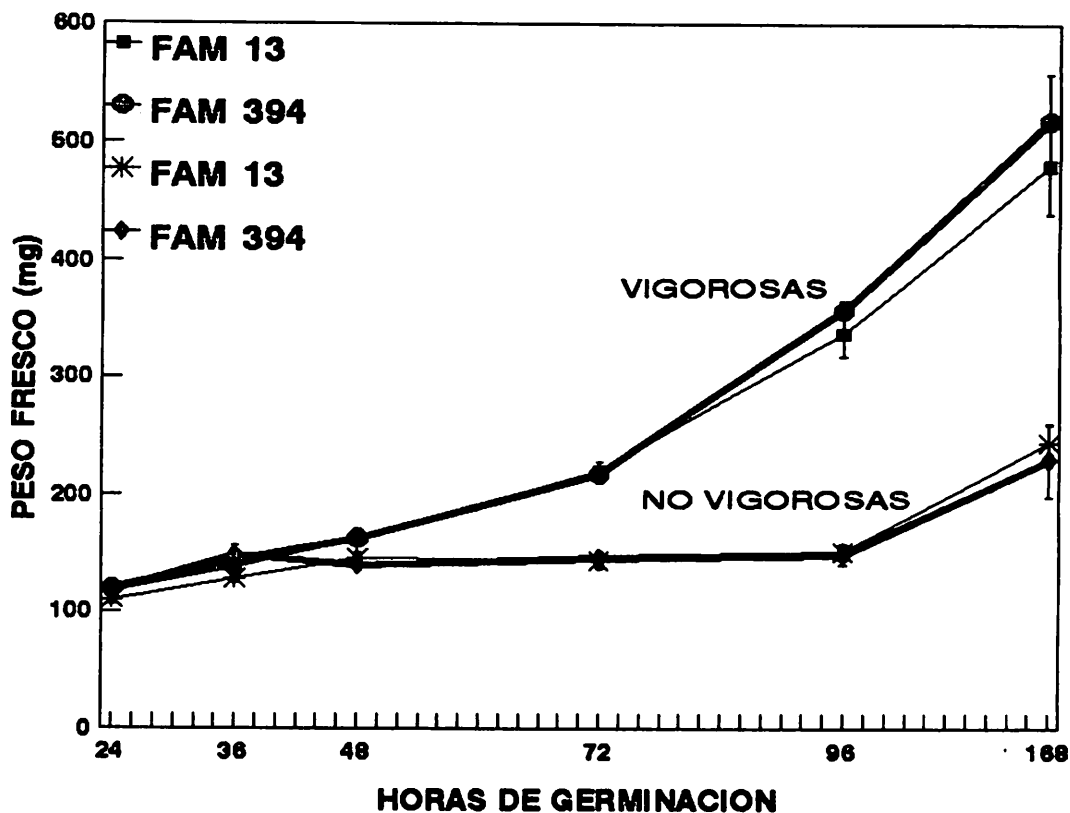


Figura 1. Peso fresco de semillas de dos familias de girasol con diferente contenido de aceite, clasificadas en vigorosas y no vigorosas.

Comparación de semillas vigorosas y no vigorosas

Se compararon las semillas vigorosas y no vigorosas de ambas familias. En las vigorosas, la tasa de respiración resultó afectada significativamente por la interacción entre el genotipo, el tiempo y la etapa de germinación, mientras que en las no vigorosas no hubo ese efecto de interacción.

La Figura 2B muestra que las primeras superaron en grado amplio y creciente la actividad respiratoria de las no vigorosas, de modo que a las 96 horas las vigorosas habían alcanzado tasas de 11 a 14.3 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ sem}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que las no vigorosas apenas lograron un pico máximo de 2.3 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ sem}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Es decir, a las 96 horas las vigorosas ya superaban la tasa de las no vigorosas en más de 6 veces. De

acuerdo con Cseresnyes (1979) y Priestley (1986), la alteración de procesos fisiológicos observada en semillas deterioradas por envejecimiento, se deben a los daños estructurales y anatómicos causados por dicho envejecimiento, de manera que las alteraciones fisiológicas se hicieron más evidentes conforme la germinación progresó.

En promedio, durante el periodo de germinación las semillas de la familia F-394 respiraron 0.53 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ sem}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más rápido (19%) que las de la familia F-13, diferencia que se manifestó sólo en las semillas vigorosas; en las no vigorosas no hubo diferencias entre genotipos. La superioridad respiratoria de la familia F-394 está asociada con su mayor capacidad de incrementar el peso fresco (Figura 1) y con el mayor contenido de aceite.

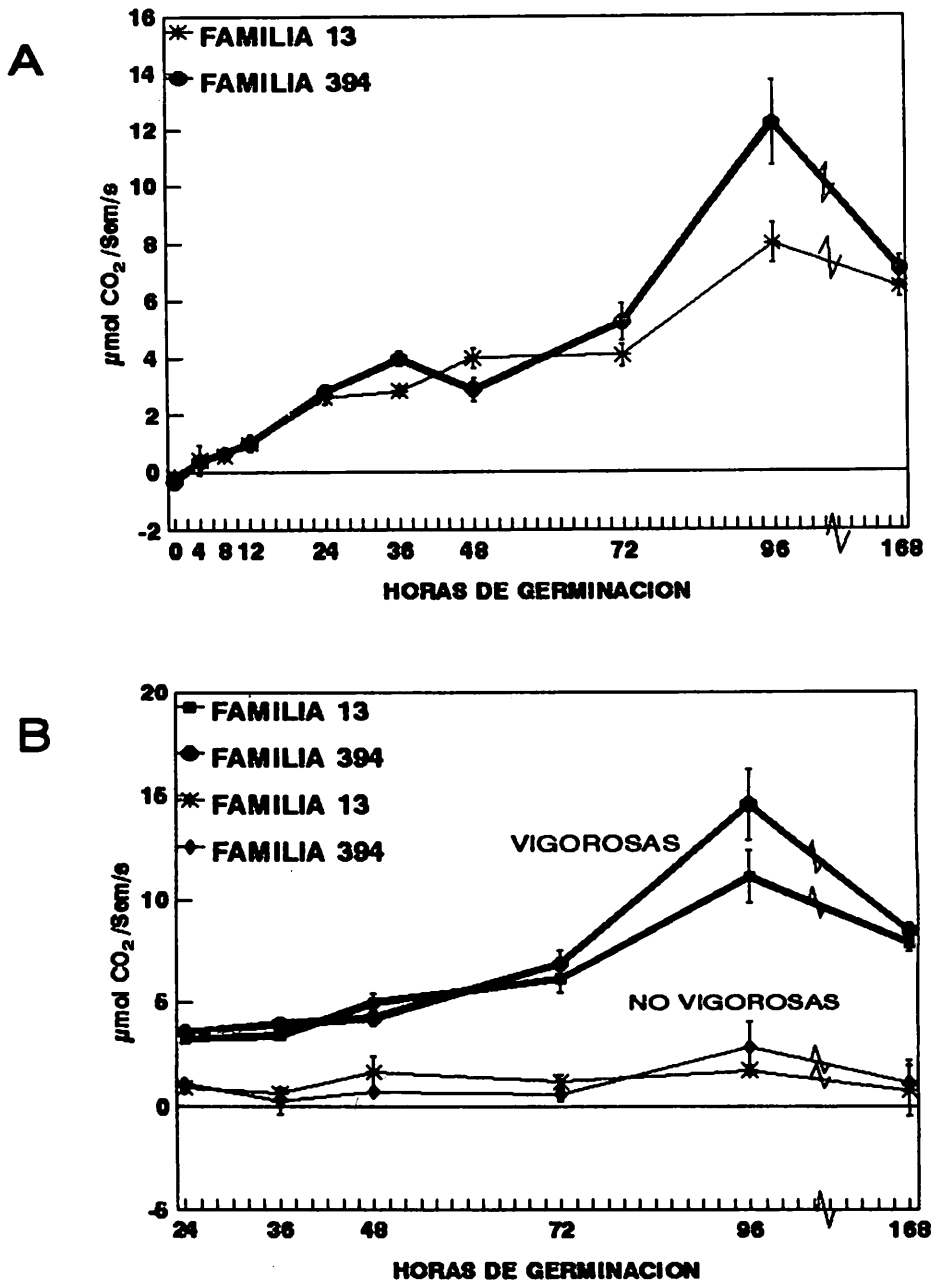


Figura 2. Tasa de respiración por semilla de dos familias de girasol. A = Respiración de las 0 a las 168 horas, B = Respiración de semillas vigorosas y no vigorosas, a partir de las 24 horas.

Estos resultados también muestran plena concordancia con lo reportado por Cseresnyes (1979), quien observó que en semillas de girasol la absorción de agua durante las primeras 96 horas de germinación, fue más rápida en semillas con alto contenido de aceite que en las de bajo contenido. Según este autor, ello se debe a que en estas últimas hubo menor movilidad de nutrientes así como una reducida velocidad de germinación y desarrollo de la plántula.

Asimismo, las bajas tasas de respiración detectadas en semillas no vigorosas concuerdan con los resultados de Al-Ani *et al.* (1985), Amable y Obendorf (1986), Hall y Weisner (1990) y Ketring (1991), quienes encontraron que el deterioro de semillas está relacionado con bajas tasas de absorción de oxígeno durante la germinación y con una disminución de la velocidad de emergencia.

La relación entre deterioro de semillas y bajas tasas respiratorias durante la germinación, según Ferguson *et al.* (1990a), se debe a que en semillas envejecidas ocurren cambios estructurales en la mitocondria, resultando en una disminución de la tasa respiratoria. De acuerdo con Hall y Weisner (1990), ello conlleva de manera inmediata a una menor producción de ATP.

Tasa de respiración por gramo de semilla

Las diferencias genotípicas observadas en la actividad respiratoria por unidad de peso (Figura 3), resultaron muy similares a las detectadas en la tasa respiratoria por semilla individual (Figura 2B). Sin embargo, en el caso de la expresada en peso fresco, las diferencias entre fases (tiempos) de la germinación se minimizaron, mientras que para la expresada en peso seco se acentuaron tales diferencias. Por ello, para futuros estudios sería recomendable emplear la tasa respiratoria por semilla individual o por unidad de peso seco.

En promedio de los tiempos de germinación evaluados, la tasa respiratoria por unidad de peso seco de semilla vigorosa fue 5 a 6 veces mayor que la de las no vigorosas (Cuadro 1). No obstante, en estos promedios no se apreciaron los contrastes genotípicos, sino sólo cuando se midieron de manera conjunta los dos niveles de vigor; es decir, únicamente en la tasa "total", aunque la diferencia en ésta fue similar a la observada en semillas vigorosas.

Cuadro 1. Tasas de respiración por gramo de peso seco total (GST), por gramo de peso seco de semillas vigorosas (GSV) y por gramo de no vigorosas (GSNV), en promedio de once tiempos de germinación. Montecillo, Méx. 1990.

Familia	GST	GSV	GSNV
($\mu\text{molCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)			
F-13	46.2 a	102.3 a	19.78 a
F-394	51.1 b	107.4 a	17.82 a
DSH	4.6	11.58	12.19

Medias en columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Es de destacarse el considerable paralelismo entre las cinéticas de peso fresco (Figura 1) y la de respiración de las semillas (Figura 2B), por lo menos desde las 36 hasta las 96 horas, tanto en las semillas vigorosas como en las no vigorosas de los dos genotipos de girasol. Ello parece sugerir que a mayor absorción de agua se acelera el metabolismo de la semilla germinante. No obstante, esta asociación no ocurre en las primeras 36 horas ni después de 96 horas de germinación, por lo que se deduce que si bien la hidratación es necesaria para la respiración de las semillas, por sí sola no es un factor suficiente.

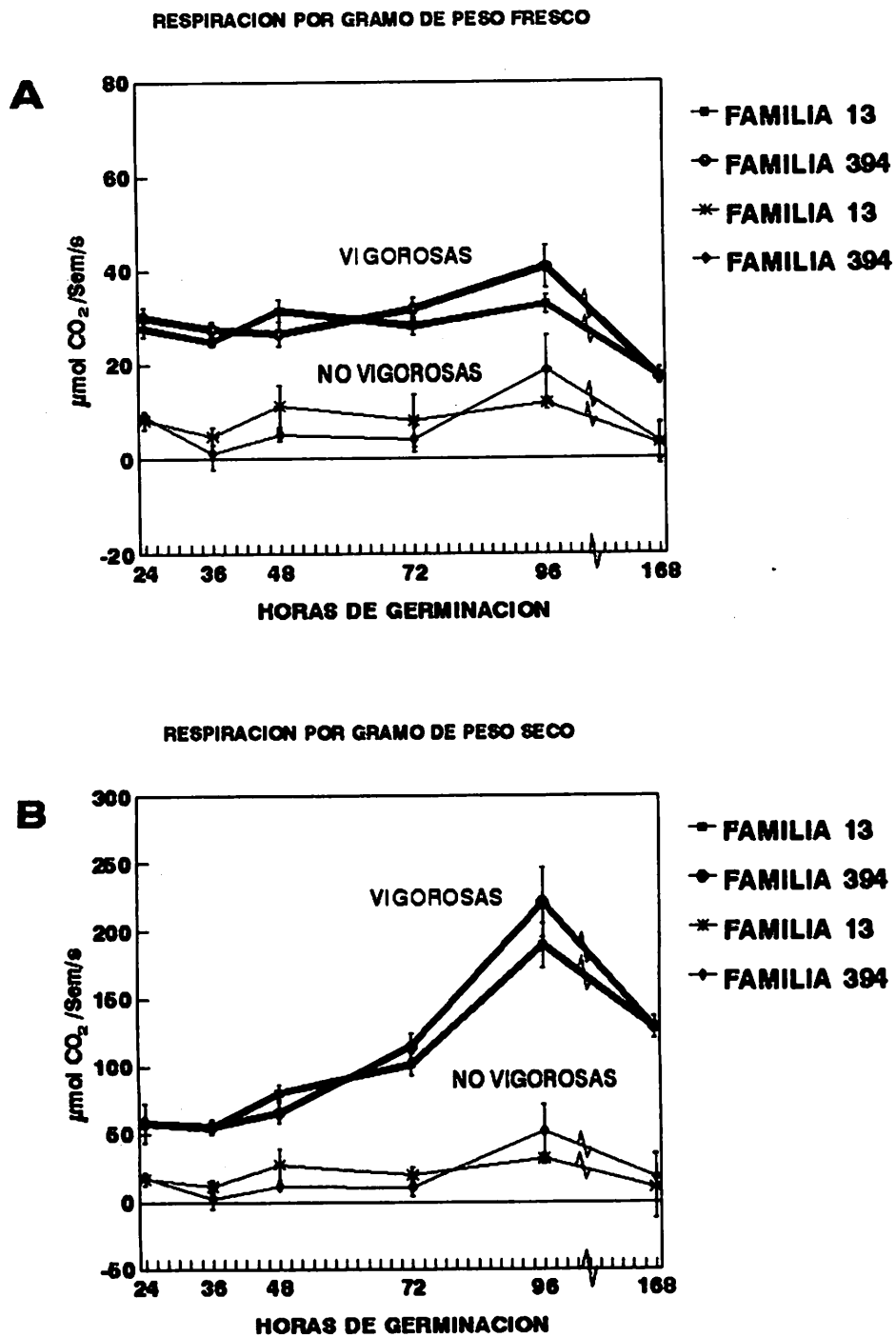


Figura 3. Tasa de respiración por gramo de semilla, de dos familias de girasol, clasificadas en vigorosas y no vigorosas. A = con base en peso fresco, B = con base en peso seco.

Al respecto, diversos autores (Al-Ani *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1990a; Hall y Weisner, 1990; Ketring, 1991) indican que el deterioro de las semillas implica reducciones en las tasas de respiración durante la germinación y en la producción de ATP, lo que se refleja en disminución del vigor de la semilla, en una magnitud que depende del genotipo.

CONCLUSIONES

La prueba de vigor por medio de la tinción con tetrazolio permitió detectar diferencias en vigor de semilla entre las familias de girasol F-13 y F-394, en donde esta última, de alto contenido de aceite, fue ligera pero consistentemente superior a la de bajo contenido.

La superioridad en vigor de la familia F-394 de alto contenido de aceite, mostrada con la prueba de tinción con tetrazolio, se asoció con una mayor velocidad de absorción de agua y una mayor tasa respiratoria, respecto a la familia F-13 de bajo contenido de aceite.

Durante los primeros siete días a partir de la imbibición de las semillas, ambas familias (F-13 y F-394) presentaron tres fases en la actividad respiratoria. La primera se caracterizó por un aumento consistente hasta las 36 horas; en la segunda, de 36 a las 72 horas, la actividad respiratoria tendió a mantenerse constante; y en la tercera se aceleró aún más que en la primera, hasta las 96 horas, para después declinar.

Las semillas vigorosas de ambas familias, F-13 y F-394, superaron ampliamente a las no vigorosas, en cuanto a la velocidad de absorción de agua y la tasa respiratoria, superioridad que fue más notoria a las 96 horas de iniciada la germinación. Entonces, ambas tasas se pueden considerar como criterios de selección para vigor durante la germinación.

Es conveniente expresar la tasa de respiración de semillas o plántulas de girasol por unidad de peso seco, debido a que permitiría detectar con mayor precisión las diferencias entre genotipos, entre niveles de vigor de las semillas y entre etapas de la germinación, así como eliminar los sesgos por tamaño de la semilla, en comparación con la tasa respiratoria por semilla o por unidad de peso fresco.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Ani, A., F. Bruzau, P. Raymond, V. Saint-Ges, J.M. Leblanc, and A. Pradet. 1985. Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiol.* 79: 885-890.
- Amable, A.R. and R.L. Obendorf. 1986. Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration. *J. Exp. Bot.* 37: 1364-1375.
- Bidwell R. G. S. 1979. *Fisiología Vegetal*. A.G.T. Editor. 1a. Ed. México, D.F. 784 pp.
- Cruz-García, F., V.A. González-Hernández, J. Molina-Moreno, and J. M. Vázquez-Ramos. 1994. Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. *Seed Sci. and Technol.* (Submitted and accepted).
- Cseresnyes, Z. 1979. The germination of *Helianthus annuus* seed under optimum laboratory conditions. *Seed Sci. and Technol.* 7:319-328.
- Ferguson, J. M., D. M. Tekrony, and D.B. Egli. 1990a. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. *Crop Sci.* 30: 175-179.
- _____, _____, and _____. 1990b. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II Lipids. *Crop Sci.* 30: 179-182.
- Garwood, C. N. and J. R. B. Lighton. 1990. Physiological ecology of seed respiration in some tropical species. *New Phytol.* 115: 549-558.

- Gatica V., M. 1994.** Tasa respiratoria y vigor de semillas en girasol. Tesis M C. Centro de Genética, C.P. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 81 pp.
- Hall, R. D. and L. E. Wiesner. 1990.** Relationship between seed vigor tests and field performance of "Regar" Meadow Bromegrass. *Crop Sci.* 30: 927-930.
- Ketring, D.L. 1991.** Physiology of oil seeds: IX. Effects of water deficit on peanut seed quality. *Crop Sci.* 31:459-463.
- Krishnasamy, V. and D. V. Seshu. 1990.** Germination after accelerated ageing and associated characters in rice varieties. *Seed Sci. and Technol.* 18: 147-156.
- Moreno M., E. 1984.** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 383 pp.
- Priestley, D. A. 1986.** Seed Aging. Cornell University. Ithaca, New York. USA. 303 pp.
- Rimbawanto A., P. Coolbear, and A. Firth. 1989.** Morphological and physiological changes associated with the onset of germinability in *Pinus radiata* (D. Don) seed. *Seed Sci. and Technol.* 17: 399-410.
- Salisbury, F. B. and C. Ross. 1978.** *Plant Physiology.* Wadsworth Pub. Co. Inc. 2nd. Ed. Belmont, California. USA. 540 pp.
- Sánchez de Jiménez, E., G. Sepúlveda, E. Reynoso, J. Molina-Galán, and M. Albores. 1991.** Long-term maize seed storage and loss of viability: polyamines and auxin contents during germination. *Seed Sci. and Technol.* 19: 83-92.
- Sívori M., E., E. R. Montaldi y O. H. Caso. 1980.** *Fisiología Vegetal.* Edit. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. pp. 613-627.