

# VIABILIDAD DE SEMILLAS DE ARROZ PROVENIENTES DE PLANTAS OBTENIDAS IN VITRO

Maylin Pérez-Bernal<sup>1</sup>, Daylenis Lorenzo Salinas<sup>2</sup> y Magalis Delgado Rigo<sup>1</sup>

1. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado Postal 83. Código Postal 60200. Sancti Spiritus, Cuba.

2. Estudiante de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Cuba.

## Introducción

Los bancos son el medio principal donde las semillas pueden almacenarse de forma controlada a temperatura y humedad relativa bajas sin perder su viabilidad. La viabilidad es la medida de cuántas semillas de un lote están vivas y conservan su capacidad para germinar y convertirse en plantas fisiológicamente normales. Las bajas temperaturas y los bajos contenidos de humedad dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que a temperatura ambiente (Doria, 2010). Las semillas almacenadas deben tener una viabilidad alta al inicio y durante el almacenamiento (Bradford, 2004). Sin embargo esta puede reducirse lentamente al comienzo y luego rápidamente a medida que la semilla envejece. Es importante saber cuándo ocurre esta reducción para tomar acciones conducentes a preservar la accesión.

El método más exacto y confiable para determinar la viabilidad de las semillas es la prueba de germinación (AOSA, 2005). Con ella se determina qué proporción de las semillas de una accesión germinará en condiciones favorables y producirá plántulas con raíces, brotes y suficiente reserva de alimento. También existen pruebas bioquímicas para determinar la viabilidad de las semillas. Tienen la ventaja de ser más rápidas pero requieren habilidades especiales para realizarlas e interpretarlas. La determinación de actividad amilasa es un indicador bioquímico de la viabilidad de las semillas ricas en almidón, como las de los cereales. En las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) la actividad amilasa puede detectarse en las etapas tempranas de la germinación, en la movilización de sustancias de reserva como evento metabólico esencial para el desarrollo de la nueva plántula (Bernal y Martínez, 2006).

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Cuba, las semillas que se conservan en el banco provienen de plantas obtenidas mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Las semillas obtenidas de estas plantas se secaron, se empacaron en bolsas de plástico y se han conservado varios años a 4°C y con 34% de humedad relativa. Hasta la fecha no se ha determinado si las condiciones de conservación utilizadas han preservado la viabilidad en este tipo de semillas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de las semillas de diferentes accesiones provenientes del cultivo *in vitro*, conservadas desde hace 0, 2, 5, 7, 9 y 12 años, y compararlas con las provenientes del campo.

## Materiales y Métodos

### Prueba de germinación

Se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa* L) de las variedades IACuba-28 y J-104 conservadas a 4°C y con 34% de humedad relativa. Las accesiones se rotularon según el año de inicio del almacenamiento: A2000, A2003, A2005, A2007, A2010, A2012. Se seleccionaron aleatoriamente 300 semillas de cada accesión, distribuidas en tres repeticiones de 100 semillas cada una. Los tratamientos que se manejaron fueron los años de conservación: 0, 2, 5, 7, 9 y 12 años. Como control positivo se escogieron una muestras desemmillas obtenidas en el campo y

conservadas en igualdad de condiciones. Todas las semillas fueron sometidas a un calentamiento a 40°C con circulación de aire durante los 5 días previos a la germinación según las normas de AOSA (2005)

Las semillas fueron sumergidas durante diez minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, y se enjuagaron cinco veces con agua estéril. Posteriormente se dispersaron de manera uniforme sobre papel absorbente húmedo, en placas Petri de 9 cm y se incubaron a una temperatura de 25°C. A los 14 días se realizó el conteo final de plántulas normales y anormales y de semillas muertas o latentes. Se determinó el porcentaje de germinación a partir del número de plantas normales respecto al total de semillas, descartando las contaminadas que se eliminaron de la prueba.

#### ***Determinación de la actividad alfa-amilasa en semillas en germinación.***

Se seleccionaron, de cada accesión y controles, veinte semillas cada 24 horas desde el primero hasta el séptimo día de germinación. Las semillas desnudas se trituraron en un mortero y se homogenizaron con 1.5 ml de tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8, para extraer las proteínas totales solubles. El homogenizado se centrifugó a 13000 xg durante 20 minutos y se colectó el sobrenadante, que fue utilizado como muestra para los ensayos. Para la reacción enzimática se mezclaron 50 µl de muestra y 50 µl de solución de almidón 0.5%. Se aplicó la técnica colorimétrica de determinación de azúcares reductores (Miller, 1959). Los intervalos de tiempo a los cuales se tomaron muestras de reacción fueron: 5, 10, 15 y 20 minutos. Se situaron cuatro réplicas de la reacción por cada intervalo de tiempo a medir y se incubaron a 37°C. En cada intervalo se adicionaron 100 µl de ácido dinitrosalicílico a cada muestra tomada y se calentó a 90°C en un baño de agua durante 5 minutos.

Los productos de reacción se vertieron en placas Costar de 96 pocillos, a razón de 200 µl por pocillo, y se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas PR-521 (SUMA, Cuba). Se utilizó como blanco una mezcla de almidón 0.5% y tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8.

La actividad alfa amilasa (A<sub>αα</sub>) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$A_{\alpha\alpha} = \frac{\Delta \text{Abs (550nm)}}{\Delta t} \quad \text{donde: Abs (absorbancia)}$$
$$t \text{ (tiempo)}$$
$$\Delta \text{Abs} = \text{Abs}_2 - \text{Abs}_1$$
$$\Delta t = t_2 - t_1$$

#### ***Análisis estadístico***

Los datos del porcentaje de germinación y de actividad alfa amilasa, correspondientes a tres repeticiones de cada variedad, respectivamente, fueron conducidos mediante un ANOVA bifactorial completamente aleatorizado. La comparación múltiple de medias se realizó con la prueba de Tukey (P<0.05). Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

### **Resultados y Discusión**

#### **Evaluación de la prueba de germinación**

La Tabla 1 (A y B) muestra los resultados a los 14 días de transcurrida la prueba de germinación para las variedades IACuba-28 y J-104. La contaminación por hongos afectó el 3.85 % del total de semillas, y fueron descartadas oportunamente para evitar la propagación de los contaminantes. Las principales deficiencias observadas en las plántulas anormales fueron la presencia de menos de dos raíces secundarias y la aparición de brotes cortos, gruesos y/o torcidos. No se observaron diferencias significativas entre las variedades (P<0.05).

Según Rao *et al.* (2007) las semillas no germinan debido a que están muertas o latentes. Las muertas generalmente se ablandan durante la germinación. La latencia es el estado en el cual las semillas viables no germinan aún en condiciones favorables para la germinación. En este trabajo, las semillas que no germinaron se inspeccionaron con pinzas para comprobar si estaban blandas (muertas) o latentes. Los resultados en el tratamiento control indicaron que las condiciones de germinación fueron buenas, ya que no se encontraron semillas muertas y solamente dos semillas no germinadas permanecieron duras y con embriones potencialmente viables. Estas eran probablemente semillas latentes que a menudo se encuentran en lotes recién cosechados (Doria, 2010).

El resto de las semillas no germinadas de otras accesiones se clasificaron como muertas al estar blandas al tacto, y en algunas se observó oscurecimiento de los embriones.

**Tabla 1.** Resultados de la prueba de germinación sobre papel en siete accesiones de semillas de arroz (**A:** variedad IACuba-28; **B:** variedad J-104), empacadas en bolsas de plástico y conservadas a 4°C con 34% de humedad relativa. Se representa el conteo total de las tres repeticiones, de 100 semillas cada una. El porcentaje de germinación se calculó con el número de plantas normales respecto al total de semillas (descartando las contaminadas). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los porcentajes de germinación (Prueba de Tukey, P<0.05)

<b>A</b>						
Tratamiento	Plántulas normales	Plántulas anormales	Muertas	Duras/Latentes	Contaminadas (descartadas de la prueba)	Germinación (%)
12 años	180	18	57	0	45	70.58 <sup>a</sup>
9 años	249	6	24	0	21	90.24 <sup>b</sup>
7 años	270	3	21	0	6	91.83 <sup>b</sup>
5 años	285	0	9	0	6	96.93 <sup>c</sup>
2 años	288	6	3	0	3	96.96 <sup>c</sup>
0 años	294	3	3	0	0	98.00 <sup>d</sup>
Control	294	0	0	6	0	98.00 <sup>d</sup>

<b>B</b>						
Tratamiento	Plántulas normales	Plántulas anormales	Muertas	Duras/Latentes	Contaminadas (descartadas de la prueba)	Germinación (%)
12 años	172	12	64	0	52	74.66 <sup>a</sup>
9 años	250	5	29	0	16	88.66 <sup>b</sup>
7 años	271	1	24	0	4	90.43 <sup>b</sup>
5 años	285	0	7	0	8	96.93 <sup>c</sup>
2 años	286	5	2	0	7	95.33 <sup>c</sup>
0 años	294	2	4	0	0	98.00 <sup>d</sup>
Control	296	0	0	4	0	98.00 <sup>d</sup>

En el tratamiento correspondiente al 2012 se observaron diferencias significativas (P<0.05) respecto al control. Ambas tenían el mismo tiempo de conservación, solo que las semillas de la

accesión A2012 se obtuvieron a partir de plantas provenientes del cultivo *in vitro* y el control procedía directamente de plantas de campo.

El porcentaje de germinación decreció a medida que aumentó el tiempo de conservación. En los tratamientos de 2 y 5 años no existieron diferencias en el porcentaje de germinación, pero sí en el número de semillas muertas (Tabla 1). El comportamiento de los tratamientos de 7 y 9 años fue similar en todos los parámetros evaluados y se evidenció una disminución más acentuada en el porcentaje de germinación respecto a los tratamientos de 2 y 5 años.

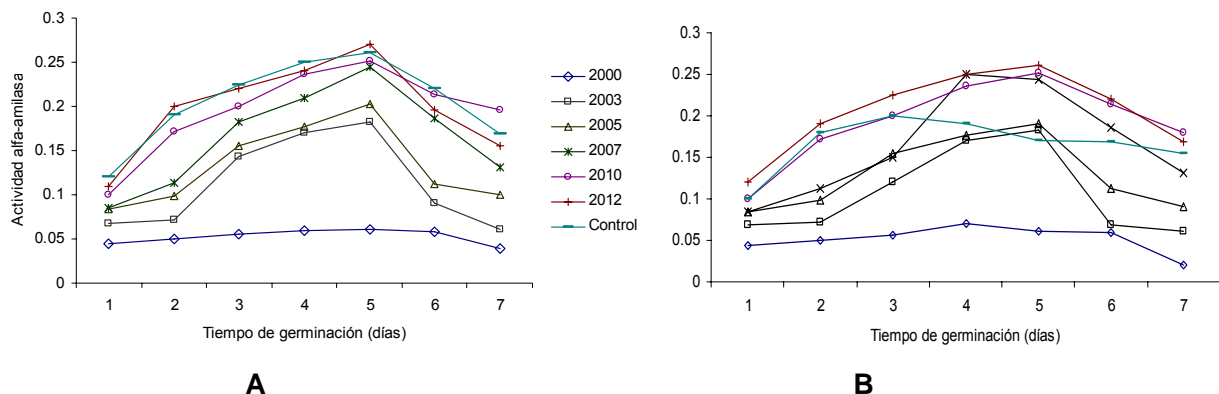
En el tratamiento de 12 años se encontró mayor cantidad de semillas contaminadas y muertas y de plántulas anormales, y solo un 70.58 % de germinación. Como este porcentaje está por debajo del 90%, fue necesario someter a prueba de germinación a una muestra adicional, según recomienda FAO/IPGRI (1994), y el promedio de las dos pruebas fue de 69.33 %, un indicador de que los doce años de conservación de las semillas han lacerado su integridad y viabilidad.

Teniendo en cuenta que uno de los factores que más deterioran las semillas es el contenido de humedad y tiene un impacto considerable en la longevidad de estas en almacenamiento, se utilizó un medidor rápido del contenido de humedad de las muestras de semillas en estudio. Se realizaron tres mediciones y se determinó el promedio. En la accesión A2000 se obtuvo un valor de 4.0%, menor que el contenido de humedad crítico para los cereales, que ronda entre el 4.5 y el 5.0% (Walters, 2003). Probert *et al.* (2003) afirmaron que pequeños cambios en el contenido de humedad de las semillas tienen un gran efecto en la vida en almacenamiento. Esta es una causa de la reducción en la calidad germinativa de las semillas A2000. En el resto de las accesiones el contenido de humedad se mantuvo en el rango normal, alrededor del 5.3 % como promedio.

#### **Actividad alfa-amilasa en las semillas en germinación**

En todas las accesiones se verificó un incremento de la actividad alfa amilasa hasta el quinto día de germinación (Fig. 1), y a partir de aquí la actividad fue decayendo rápidamente, lo cual debe esperarse debido a un agotamiento de las sustancias de reserva de las semillas. No se observaron diferencias significativas entre las variedades ( $P < 0.05$ ).

A pesar de la tendencia similar de aumento y luego disminución de la actividad amilásica en el quinto día, se comprobaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) desde el punto de vista cuantitativo entre las accesiones más jóvenes y las más antiguas. La actividad alfa amilasa promedio en el quinto día en las accesiones A2003 y A2005 fue de 0.192, mientras que en las accesiones con menor tiempo de almacenamiento (A2007, A2010 y A2012) la actividad máxima estuvo alrededor de 0.25, sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto al control. La diferencia más marcada se observó en la A2000, donde el pico de actividad solo llegó a 0.0614, cuatro veces menos que en las semillas más jóvenes (Fig. 1). Las accesiones provenientes de plantas del campo no mostraron alteraciones en los parámetros de actividad amilasa, incluso aquellas conservadas por 12 años y más.



**Figura 1.** Actividad alfa amilasa en extractos de proteínas totales solubles de semillas de diferentes accesiones, germinadas sobre papel durante 7 días. En cada punto se grafica la media de las tres repeticiones. **(A)** Variedad IACuba-28 **(B)** Variedad J-104

Debido al envejecimiento existen cambios notables en las actividades enzimáticas al comienzo de la germinación. Algunos investigadores demostraron que los primeros estadios de deterioro de las semillas están asociados a una reducida síntesis proteica y que los daños en los mismos ocurrirían a nivel transcripcional (Salinas *et al.*, 2002). También se ha reportado que la actividad de la enzima alfa-amilasa disminuye en semillas que han sido expuestas a condiciones de estrés (Milanés y González, 1999). El cultivo *in vitro* es siempre inductor de estrés en las células vegetales, lo cual puede ser una causa de que las plantas que se obtengan por estas vías generen semillas con menor capacidad de ser viables a largo plazo, respecto a las que se obtienen en el campo en condiciones naturales.

Los pobres resultados de la prueba de germinación y la baja actividad alfa-amilasa en la accesión A2000 han reafirmado que su viabilidad ha decaído en los doce años de almacenamiento. El resto de las accesiones mantuvieron normales sus parámetros de germinación, incluso la A2003, que está por cumplir una década de conservación.

Se recomienda monitorear todas las accesiones que han sido conservadas por un tiempo mayor de 10 años. Cuando el porcentaje de germinación esté por debajo del 90% deben regenerarse las accesiones afectadas para evitar la pérdida del material.

## Referencias

1. AOSA Association of Official Seed Analysts. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, USA. Disponible en: <http://www.aosaseed.com> [Fecha revisión: junio 28 de 2014]
2. Bernal, L.; y Martínez, E. Una nueva visión de la degradación del almidón. Rev. del Centro de Inv. (Méx.), 76-90, 2006.
3. Bradford, K.J. Seed storage and longevity. In: Seed production and quality. UC Davis, Seed Biotechnology Center, USA, 76–84, 2004.
4. Doria, J. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Cultivos Tropicales, 74-85, 2010.
5. FAO/IPGRI. Normas para Bancos de Genes. FAO y el IPGRI, Roma, Italia. Disponible en: <http://www.biodiversityinternational.org/publications> [Fecha revisión: mayo 15 de 2014]
6. Milanés, I.; y González, L.M. Cambios en la actividad de las enzimas peroxidasa, catalasa y alfa-amilasa en semillas de arroz durante la germinación en condiciones salinas. Centro Agrícola, 73-75, 1999.

7. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 426-428, 1959.
8. Probert, R.J.; Manger, K.R.; and Adams, J. Non-destructive measurement of seed moisture. In: *Seed conservation: turning science into practice*. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido, 367-387, 2003.
9. Rao, N.K.; Hanson, J.; Dulloo, M.E.; Ghosh, K.; Novell, D.; y Larinde, M. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. *Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8*. Bioversity International, Roma, Italia, 2007.
10. Salinas, A.R.; Yoldjian, A.M.; Dietrich, M.L.; Craviotto, R.M.; y Bisaro, V. Comportamiento de glicinina,  $\beta$ -conglucina y  $\alpha$ -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* (Brasília), 1175-1181, 2002.
11. Walters, C. Principles of preserving germplasm in gene banks. In: *Strategies for survival*. (E. Guerrant, K. Havens y M. Maunder, eds.). Island Press, Covelo, CA, USA, 113-138, 2003.