

Efectos sobre la germinación de la semilla de pino de los tratamientos físicos y químicos

por

M.ª JOSE MARTINEZ-HONDUVILLA y C. JOSE MARTINEZ-HONDUVILLA

Departamento de Bioquímica - Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria
Madrid (España)

Premio ALTER 1977

SUMMARY

It is well known that stratification is essential for the germination of several types of seeds. We have studied the effect of Abscisic acid in the stratification and the interaction of this compound with growth stimulators in germination of partially afterripened pine seeds.

The stratification of pine seeds in the presence of synthetic abscisic acid (ABA) had an inhibitory effect. The seeds stratified in water and soaked in an ABA solution (10^{-7} M, 10^{-5} M and 10^{-3} M) decreased their germination. The lowest percentage of germination was obtained when the ABA concentrations was 10^{-3} M. This effect was stronger after a shorter time of stratification. The presence of gibberellic acid (GA_3) Kinetine (Kt) and indolacetic acid (IAA), in both cases, contrarrested the inhibition showed by ABA.

In other way, the effect of H_2O_2 , H_2SO_4 and heat treatment on the germination of *P. pinea* seed were also investigated. H_2SO_4 hastened germination, but decreased the final number of seeds germinated. However, H_2O_2 and heat treatment hastened germination and increased the number of seeds germinated. Changes in fresh weight, dry weight and % humidity were not appreciated by the effect of heat treatment.

INTRODUCCIÓN

Existen varias causas por las que las semillas permanecen en estado durmiente: embriones rudimentarios; embriones fisiológicamente inmaduros (sistemas de enzimas inactivos); resistencia mecánica de las cubiertas o impermeabilidad de las mismas; presencia de inhibidores de la germinación (Amen, 1963-68 y Bonner y Varner, 1965).

Nuestro material biológico, la semilla de pino, está formada por

el embrión, el endospermo y una cubierta dura (testa y endopleura). Los métodos más usuales para eliminar las causas del estado durmiente en semillas con cubiertas duras y resistentes incluyen la escarificación (ruptura de las cubiertas) y tratamientos químicos con ácido sulfúrico, agua oxigenada, etanol y acetona. La estratificación (acción conjunta de humedad y bajas temperaturas), es otro tratamiento que ha demostrado su eficacia como activador de los procesos germinativos en numerosos tipos de semillas. Dicho tratamiento también se muestra eficaz en nuestro material, Mayor (1966).

La línea de nuestro trabajo la hemos orientado en dos vertientes basándonos en las hipótesis de estos últimos años:

a) El efecto del ácido abscísico sobre la germinación de la semilla de pino y las interacciones de este inhibidor natural con hormonas vegetales estimulantes del crecimiento y germinación tales como el ácido indolacético (IAA), kinetina (Kt) y el ácido giberélico (GA_3).

b) Comprobar el efecto del ácido sulfúrico (H_2SO_4), agua oxigenada (H_2O_2) y calor sobre la germinación de las semillas de pino y la acción de estos tratamientos sobre el contenido en humedad y de inhibidores.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material y métodos

El material empleado ha sido la semilla de *Pinus pinea* (pino piñonero) procedente de lugares fríos, recolectada en el año 1976 y suministrada por el Instituto Forestal de Madrid.

2.1.1. Estratificación

Dos lotes de estas semillas eran estratificadas. El primero en presencia de ácido abscísico (10^{-3} M); el segundo en agua, durante períodos de tiempo comprendidos entre 0 y 9 semanas. Posteriormente, las semillas de cada uno de dichos lotes y a los períodos indicados, eran imbibidas en distintas soluciones (H_2O , ABA, ABA + Kt, ABA + GA_3 y ABA + IAA) * durante tres horas. La concentración de Kt, GA_3 e IAA era de $3 \cdot 10^{-4}$ M.

(*) Abreviaturas empleadas en el texto: ABA, ácido abscísico; Kt, kinetina; GA_3 , ácido giberélico; IAA, ácido indolacético.

2.1.2. Tratamiento químico

Se preparaban tres lotes de semillas. El primero se agitaba en ácido sulfúrico a concentraciones 0,1, 1, 2, 5 y 10 N, y también en SO_4H_2 concentrado. El segundo, se agitaba en una solución de agua oxigenada 10 N a diferentes concentraciones: 0,1, 1, 5, 10, 15 y 20 por 100. En ambos casos la duración del tratamiento era de una hora. El tercer y último tratamiento consistía en estratificar también en agua oxigenada durante dos y cuatro semanas a las concentraciones anteriormente citadas, exceptuando las dos más concentradas. Las semillas controles eran agitadas o estratificadas en agua destilada.

2.1.3. Tratamiento térmico

Las semillas se sometían a 47° C durante tres y catorce días según técnica descrita por Martínez-Honduvilla (1974).

2.1.4. Test de germinación

Las semillas se germinaban sobre vermiculita en placa Petri a 26° C y luz fluorescente continua. El número de semillas por placa era de 50. Cada test se repetía por lo menos 4 veces. Como criterio de germinación se ha considerado la longitud de radícula emergida cuando ésta presentaba un tamaño de 0-0,5 cms.

3. RESULTADOS

3.1. Interacciones del ácido abscísico con hormonas activadoras de los procesos germinativos

En la tabla I se puede observar cómo, a medida que se incrementa el período de estratificación en presencia de agua, se elevan los porcentajes finales de germinación, apreciándose las mayores respuestas para una duración del tratamiento de cuatro semanas. La aplicación posterior del ácido abscísico en solución acuosa, durante tres horas y posterior germinación en presencia del mismo, inhibe la germinación de las semillas, siendo el grado de dicha inhibición mayor cuando se incrementa la concentración del ácido abscísico de 10^{-7} M a 10^{-3} M. Cuando las semillas estratificadas en agua se ponen en contacto con soluciones de ABA + Kt, ABA + GA_3 y ABA + IAA

en las condiciones anteriormente citadas, la presencia de las hormonas kinetina, ácido giberélico y ácido indolacético, en estas soluciones, es capaz de contrarrestar en mayor o menor grado la acción inhibitoria del ácido abscísico, siendo la kinetina la hormona más efectiva.

Los porcentajes de germinación de semillas estratificadas durante

TABLA I

Efecto del ácido abscísico y hormonas estimuladoras del crecimiento sobre la germinación de semillas de pino estratificadas en agua a distintos periodos de tiempo. Condiciones de germinación: luz fluorescente continua y 20° C. Los resultados se expresan en % a los 40 días

Semanas de estratificación	% germinación				
	H ₂ O	ABA	ABA + Kt	ABA + GA ₃	ABA + IAA
10⁻⁷ M ABA					
No estratificadas	4	—	20	12	—
Sin estratificar					
1	20	12	22	16	16
2	56	36	64	64	52
4	80	68	88	84	84
6	80	48	76	56	56
9	52	44	68	44	80
10⁻⁸ M ABA					
4	80	60	96	88	80
6	60	48	56	56	40
9	52	32	64	60	60
10⁻⁹ M ABA					
0	4	—	12	—	—
1	17	6	22	16	23
2	64	8	32	24	24
4	80	60	92	68	76
6	68	24	50	36	32
9	52	20	56	36	52

cuatro semanas y posterior imbibición en agua, ácido abscísico, o mezcla de este compuesto con las sustancias hormonales (IAA, GA₃ y Kt) durante 3h, 24h y 48h queda descrito en la tabla II. Se puede observar como a medida que se incrementa la duración de este segundo tratamiento decrecen los tantos por ciento de germinación. Como en el caso anterior, todos los compuestos hormonales activa-

TABLA II

Porcentajes de germinación de semillas estratificadas 4 semanas y posteriormente agitadas a diversos periodos de tiempo en distintas soluciones hormonales. Condiciones de germinación: luz fluorescente continua y 20° C. Concentración ABA 10⁻³ M. Los resultados se expresan en % a los 40 días

Tiempo agitación (h)	% germinación				
	H ₂ O	ABA	ABA + Kt	ABA + GA ₃	ABA + IAA
3	80	60	92	72	74
24	60	46	72	55	54
48	50	38	62	56	56

TABLA III

Efecto del ácido abscísico y hormonas estimuladoras del crecimiento sobre la germinación de semillas de pino estratificadas en ácido abscísico 10⁻³ M, a distintos periodos de tiempo. Condiciones de germinación: luz fluorescente continua y 20° C. Los resultados se expresan en % a los 40 días

Semanas de estratificación	% germinación				
	H ₂ O	ABA	ABA + Kt	ABA + GA ₃	ABA + IAA
1	6	0	15	5	4
2	18	4	26	18	16
3	30	10	45	30	28
4	46	26	64	38	46
9	30	16	35	27	26

dores, son capaces de contrarestar el efecto inhibitor del ácido abscísico, mostrándose de nuevo que la kinetina tiene, en esta acción, la mayor eficacia.

Existe un retardo en la germinación de las semillas cuando la estratificación se efectúa en presencia de ABA 10^{-3} M y posteriormente son sumergidas en agua, ácido abscísico y mezcla de ácido abscísico con kinetina, ácido giberélico y ácido indolacético durante tres horas. Se comprueba, como en los casos anteriores, un efecto positivo de las hormonas estimuladoras que contrarresta, en parte, la acción inhibitora del ácido abscísico (tabla III).

3.2. Influencia de los tratamientos químicos

Las semillas tratadas con ácido sulfúrico comienzan a germinar con mayor rapidez que los controles (fig. 1 B). Sin embargo, después de un corto período de tiempo, su poder decrece sustancialmente, siendo el porcentaje final inferior al de las semillas controles mantenidas en agua. Resultados similares en otros tipos de semillas son observados por Marani y Amirav (1970) y por Saeed (1974).

Respecto al efecto que sobre los tantos por ciento de germinación muestra el tratamiento con agua oxigenada, pudimos comprobar como a medida que se eleva la concentración de H_2O_2 , se incrementaba la germinación. El máximo de germinación se obtiene para una concentración de agua oxigenada del 2 por 100. Concentraciones superiores a la anteriormente citada dificulta parcialmente la germinación de nuestras semillas. El tratamiento también tiene un efecto positivo sobre la velocidad de germinación cuando las concentraciones de H_2O_2 son 1, 2 y 5 por 100 (fig. 1 C). Una acción similar en semillas de remolacha fue observada por Coumans (1974).

Ya se ha indicado anteriormente el efecto positivo de la estratificación tanto sobre el poder como sobre los porcentajes finales de germinación de nuestra semilla. Sin embargo, estos porcentajes son inferiores en las semillas estratificadas en presencia de agua oxigenada, de tal forma que a medida que aumenta la concentración de la misma, decrece el efecto positivo de la estratificación. Para un período de estratificación de dos semanas frente a un 58 por 100 de germinación de los controles (estratificados en H_2O), los porcentajes en presencia de H_2O_2 se encuentran entre el 29-38 por 100; es decir, aproximadamente la mitad. Un efecto semejante, aunque menos marcado, se observa cuando el período de estratificación es de cuatro semanas.

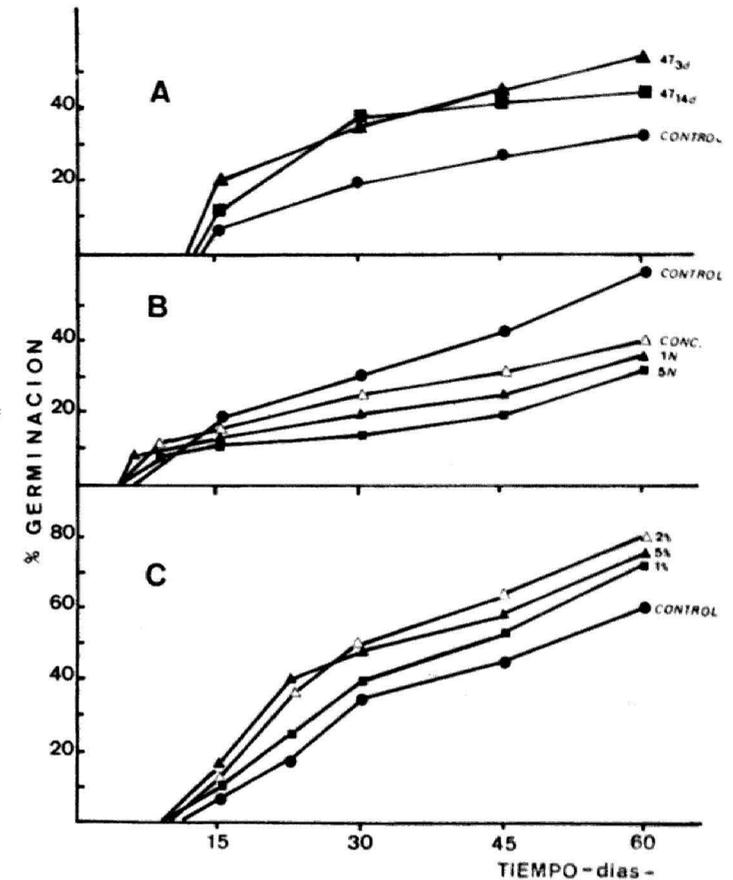


Fig. 1. —Efecto de los tratamientos térmicos (A), con H_2SO_4 (B) y H_2O_2 (C) sobre la germinación de semillas de *P. pinea*. La concentración de H_2O_2 se expresa como % de una solución 10 N

3.3. Tratamiento térmico

Trabajos anteriores de Martínez-Honduvilla (1974) habían demostrado el efecto positivo de temperaturas superiores a la ambiente

sobre la germinación de la semilla de pino. En la figura 1 A, puede observarse como temperaturas de 47° C durante tres y catorce días incrementan la velocidad y los porcentajes de germinación de nuestra semilla. Rees (1961) y Roberts (1965) comprueban unos efectos simi-

lares de este tratamiento en semillas de palma y arroz respectivamente.

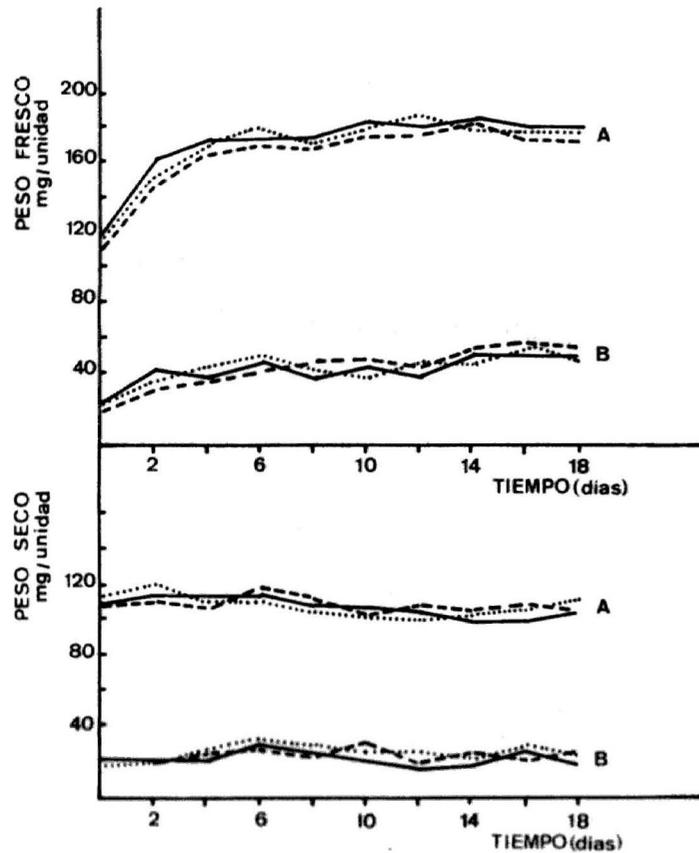


Fig. 2. - Efecto del tratamiento térmico sobre el peso fresco y peso seco.
 — Control, - - - - 47° C 14 días, 47° C 3 días (A)
 endospermos y (B) embriones

El efecto de este último tratamiento sobre la absorción de agua, sobre el peso fresco y seco no muestra diferencias significativas entre las semillas controles mantenidas a temperaturas ambiente y las sometidas a tratamiento térmico en los dieciocho primeros días de germinación, como puede apreciarse en las determinaciones efectuadas en embriones y endospermos sobre peso fresco y peso seco (fig. 2).

4. DISCUSIÓN

La estratificación, a baja temperatura, proporciona una germinación más vigorosa, sincronizada y rápida. Todo parece indicar que la estratificación consiste realmente en transformaciones preparatorias de ineludible realización para que la germinación tenga lugar; en las que la humedad y el frío actúan como agentes promotores y, además, el frío simultáneamente actúa como represor del desarrollo de las semillas ya dispuestas. A bajas temperaturas, las reacciones muestran escasa velocidad, por lo que el proceso requiere tiempo. Durante dicho tratamiento tiene lugar una serie de transformaciones que son el resultado de la actividad de sistemas bioquímicos endógenos, principalmente enzimas, que actúan en cuanto las condiciones exógenas son favorables. En este sentido Mavor en 1966 comprueba el efecto de la estratificación sobre las actividades lipásica, amilásica y proteásica. López Pérez y Giménez-Solves (1973) observan como a lo largo de la estratificación, los enzimas isocitrato liasa y malato sintasa sufren un efecto activador y como existe una movilización de los lípidos del endospermo que se convierten en azúcares a través del ciclo glioxílico.

Por otro lado, se conoce el efecto activador y síntesis «de novo» de las hormonas vegetales IAA, GA₃ y Kt sobre diversas actividades enzimáticas en diversas semillas. Varner y Chandra (1964), Jacobson y Varner (1967), Penner y Ashton (1967) y en nuestro material biológico Martínez-Honduvilla y col. (1975) demuestra el efecto positivo que la aplicación exógena de las hormonas del crecimiento tienen sobre los enzimas isocitrato liasa y malato deshidrogenasa. Podría ser, por tanto, posible que algunos de estos efectos importantes ya señalados de la estratificación fuesen regulados por compuestos con carácter hormonal, que coincidiría o estaría de acuerdo con el incremento en los niveles de GA₃, IAA y Kt, y el descenso de ABA observados por numerosos investigadores durante la estratificación de diversos tipos de semillas Szalai y Nagy (1968), Sondheimer y col. (1968), Ross y Bradbeer (1968) y Van Staden y col. (1972).

A la vista de estos resultados pasamos a estudiar la acción de la aplicación exógena de activadores e inhibidores en semillas estratificadas en presencia de agua y ácido abscísico. Los resultados obtenidos muestran que la agitación en soluciones de ácido abscísico de semillas estratificadas en presencia de H₂O y ABA, a diversos períodos de tiempo, produce un efecto inhibitorio sobre la germinación, acción que depende de la concentración del inhibidor. Este efecto inhibitorio es contrarrestado parcial o totalmente por la adición simultánea en las soluciones de agitación de compuestos activadores (IAA, GA₃, Kt).

Podría sugerirse que el ABA se acumula en las testas y cubiertas de la semilla, evitando la elongación de la radícula, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Pieniasek y Rudnicki (1970); siendo esta acción eliminada por las sustancias activadoras. También podría explicarse el retardo germinativo producido por la adición del ácido abscísico, por un bloqueo metabólico a nivel enzimático. Los activadores eliminarían esta acción por su efecto activador anteriormente descrito sobre diversas proteínas con carácter enzimático.

Relacionado con la segunda parte de nuestro trabajo, existe una gran cantidad de investigaciones que demuestran que la presencia de las cubiertas juegan un papel importante en el estado durmiente de las semillas Come (1970), Wareing (1969) y Wareing y Saunders (1971). Hoy día, se conoce que existen embriones durmientes en algunas semillas que necesitan del frío o de la estratificación para poder germinar, Webb y Dumbroff (1969). Sin embargo, en otras especies, solamente la semilla completa muestra el estado durmiente, ya que si se eliminan las testas o cubiertas, los embriones obtenidos pueden germinar sin necesidad de estratificarse o enfriarse. Resultados parecidos se observan en semillas que requieren un tratamiento con luz para poder germinar posteriormente en la oscuridad. Si se eliminan las cubiertas, desaparece dicho requerimiento (como en el caso de algunas variedades de semillas de lechuga). Este efecto podría ser debido a que las cubiertas presenten una barrera física al agua y a diversos gases. Brown, en 1946, citaba ya como la testa de las semillas de calabaza son mucho menos permeables para el oxígeno que para el dióxido de carbono.

Recientemente, Marbach y Mayer (1974) observan que las semillas de *Pisum elatius* (guisante) muestran normalmente una impermeabilidad para el agua. Dicha impermeabilidad está relacionada con el grado de deshidratación y con la presencia de compuestos fenólicos. Por todo ello, se estudió el efecto del calor, del agua oxigenada y del ácido sulfúrico, métodos standard para la eliminación del estado durmiente en semillas con cubiertas duras sobre la humedad, peso seco y peso fresco. Se pensó que el tratamiento térmico y el SO_3H_2 incrementaría la germinación por su acción sobre las cubiertas, mejorando la permeabilidad para el agua. Sin embargo, ya se ha mencionado, en el apartado de resultados, que los porcentajes totales de germinación en semillas tratadas con ácido sulfúrico son inferiores al de las semillas control y en el caso del tratamiento térmico, aunque la germinación se favorece, no existe efecto alguno sobre el peso fresco, peso seco y % de humedad.

Amen (1963, 1968) sugirió, y hoy en día se acepta, que un mecanismo general en el control del estado durmiente en semillas está relacionado con el equilibrio activadores-inhibidores. Martínez-Honduvilla (pendiente de publicación) demuestra la existencia de sustan-

cias inhibitoras en los distintos componentes de la semilla de pino y como el tratamiento térmico decrece el contenido en dichos compuestos con carácter inhibitor, Martínez-Honduvilla y Santos-Ruiz (1976).

Por otro lado, el tratamiento con el agua oxigenada incrementa la germinación. El efecto de este compuesto podría ser el de aumentar la concentración de oxígeno que al pasar a través de la cubierta y del endospermo, evita la formación de compuestos inhibidores en el embrión. En este sentido, Edwards (1968), en semillas de mostaza, comprueba como las cubiertas presentan una barrera a la difusión del oxígeno y demuestra que en estas condiciones, los embriones producen inhibidores de la germinación. Otros autores indican que la acción del oxígeno es oxidar compuestos con carácter inhibitor presentes en las testas de la semilla. En ambos casos, se acepta un control hormonal, que concuerda con los resultados obtenidos por Martínez-Honduvilla y Santos-Ruiz (1976) que observan, en este sentido, un descenso en el contenido de inhibidores por el tratamiento con agua oxigenada en los embriones, endospermos y testas de la semilla de pino.

5. RESUMEN-CONCLUSIONES

Se ha estudiado el efecto del ABA en la estratificación y en la germinación de la semilla de pino, mostrando este compuesto un fuerte efecto inhibitor, que depende del periodo de estratificación y de la concentración. Las hormonas Kt, GA_3 e IAA contrarrestan total o parcialmente esta acción inhibitor mostrada por el ABA. De ello se deduce la importancia que el equilibrio entre los activadores-inhibidores tiene sobre la germinación de la semilla de pino.

La acción del H_2SO_4 , H_2O_2 y del calor sobre la germinación de la semilla de *P. pinca* difiere, ya que el primero de los tratamientos no incrementa la capacidad germinativa de las semillas, mientras que los otros dos la mejoran; no por su acción sobre la permeabilidad de las cubiertas, sino por el efecto sobre el contenido en inhibidores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) AMEN, R. D.: «Amer. Sci.», 51, 408-24, 1963.
- (2) AMEN, R. D.: «Bot. Rev.», 34, 1-32, 1968.
- (3) BONNER, J. and VARNER, J. E.: «Plant Biochemistry Academic Press», New York, 1054 pp., 1965.
- (4) BROWN, R.: «Ann. Bot.», 4, 379-95, 1946.
- (5) COME, D.: «In les obstacle à la germination». París, Masson and Cie., 1970.
- (6) COUMANS, M.: «Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.», 107, 27, 1974.

- (7) EDWARDS, M. M.: «J. Exp. Bot.», 19, 601-10, 1968.
- (8) JACOBSEN, J. V. y VARNER, J. E.: «Plant Physiol.», 42, 1596-1600, 1967.
- (9) LÓPEZ PÉREZ, M. J. y GIMÉNEZ SOLVES, A.: «Anal. Real Acad. Farm.», 39, 251-264, 1973.
- (10) MARANI, A. y AMIRAV, A.: «Crop. Sci.», 10, 509-11, 1970.
- (11) MARBACH, I. y MAYER, A. M.: «Plant Physiol.», 54, 817, 1974.
- (12) MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J.: «Anal. Real Acad. Farm.», 40, 91-107, 1974.
- (13) MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J., GIMÉNEZ SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: «Rev. Esp. Fisiol.», 31, 15-20, 1975.
- (14) MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J. y SANTOS-RUIZ, A.: *Booklet of the 9th Coonf. Int. of Plant Growth Subs.* Ed. P. Pilet, pág. 246-48, Lausanne, Suiza, 1976.
- (15) MAYOR, F.: «Anal. Real Acad. Farm.», 3, 273-94, 1966.
- (16) PENNER, D. y ASHTON, F. M.: «Biochem. Biophys. Acta», 148, 481-85, 1967.
- (17) PIENIAZEK, J. y RUDNICKI, R.: «Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.», 18, 707-711, 1970.
- (18) REES, A. R.: «Nature», 189, 74-5, 1961.
- (19) ROBERTS, E. M.: «J. Exp. Bot.», 16, 341, 1965.
- (20) ROSS, J. D. y BRADBEER, J. W.: «Nature», 220, 85, 1968.
- (21) SAEED, A.: «Plant and Soil», 41, 681-83, 1974.
- (22) SZALAI, I. y NAGY, M.: «Acta Bot. Acad. Sci. Mung.», 14, 415-23, 1968.
- (23) SONDHEIMER, E., TZOV, D. S. y GALSON, E. C.: «Plant Physiol.», 43, 1443-47, 1968.
- (24) VAN STADEN, J., WEBB, D. P. y WAREING, P. F.: «Planta», 104, 110-14, 1972.
- (25) VARNER, J. E. y CHANDRA, R. E.: «Proc. Nat. Acad. Sci.», USA, 52, 100-106, 1964.
- (26) WAREING, P. F.: *The Physiology of Plant Growth and Development*. Ed. M. B., Wilkins, 603-44, New York M.-Graw, 1969.
- (27) WAREING, P. F. and SAUNDERS, P. F.: «Ann. Rev. Plant Physiol.», 22, 261, 1971.
- (28) WEBB, D. P. and DUMBROFF, E. B.: «Can. J. Bot.», 47, 1555, 1969.

Fitohemaglutininas de las semillas de *Myrtus communis* y su interacción con las inmunoglobulinas del suero humano

por

S. RODENAS y M. ORTEGA

Laboratorio de Técnicas Instrumentales - Facultad de Farmacia
Ciudad Universitaria - Madrid, 3

SUMMARY

Interaction of human serum immunoglobulins with either soluble or immobilized, on glutaraldehyde treated erythrocytes, *Myrtus communis* seeds phytohaemagglutinins were studied, both qualitatively and quantitatively. Usually IgM showed a higher affinity for the lectin. Analytical results for: *S. typhi* anti H and anti O antibodies, *S. paratyphi* A and *S. schottmuelleri* anti H antibodies, *B. mellitensis* anti O antibodies, anti Rh (anti D) antibodies, Rheumatoid factor, toxoplasmic antibodies, are shown.

The fixation of the lectin on erythrocytes brings in a great decrease in its binding capacity with immunoglobulins.

INTRODUCCIÓN

Las fitohemaglutininas interaccionan con macromoléculas en solución o dispersión, dando lugar a la formación de productos insolubles. Esta interacción es muy variable, lo que no es más que el reflejo de la diversidad de composición química que las caracteriza.

Se ha prestado especial interés a la interacción con las proteínas de sueros humanos, tanto normales como patológicos (1, 2, 3).

Ortega y Abeger (4), empleando los extractos de semillas de *Myrtus communis*, comprobaron que precipitaban a distintos componentes del suero humano, y muy especialmente a la γ globulina. Es por esto que se estimó interesante estudiar la interacción de las fitohemaglutininas de *Myrtus communis* con las inmunoglobulinas séricas.