

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol
(H. annuus L.) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad
de membranas y cambios asociados con la capacidad
antioxidante**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Marta María de Paula Ruiz

Directores

Margarita Torres Muñoz

Carlos José Martínez Honduvilla

Madrid 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

ALTERACIONES BIOQUIMICAS EN SEMILLAS ENVEJECIDAS
DE GIRASOL (*Helianthus annuus L. cv. Peredovik*)
RELACIONADAS CON LA VIABILIDAD, FUNCIONALIDAD DE MEMBRANAS
Y CAMBIOS ASOCIADOS CON LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

TESIS DOCTORAL

MARTA MARIA DE PAULA RUIZ

MADRID, 1994

▲

•

•



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE FARMACIA

D. CARLOS JOSÉ MARTÍNEZ HONDUVILLA Y DÑA. MARGARITA TORRES MUÑOZ,
PROFESORES TITULARES DE LOS DEPARTAMENTOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II Y BIOLOGÍA VEGETAL II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, RESPECTIVAMENTE,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada "Alteraciones bioquímicas de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante", presentada por Dña. MARTA MARÍA DE PAULA RUÍZ para optar al título de Doctor en Farmacia, constituye un trabajo original de investigación, que ha sido realizado, bajo nuestra dirección, en los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular II y Biología Vegetal II, de la Facultad de Farmacia de Madrid.

En Madrid, a veintiocho de octubre de mil novecientos noventa y cuatro

Fdo: C.J. Martínez Honduvilla

M. Torres Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Todas las personas y entidades que a continuación se citan han colaborado en mayor o menor medida en la realización de esta Tesis. A todos ellos quiero expresarles mi agradecimiento:

A **Margarita Torres** y **Carlos J. Martínez Honduvilla**, directores de este trabajo, no sólo por todo el tiempo y paciencia que han invertido, sino por mostrarme, ante todo, su amistad; a **Gloria Frutos**, por su importantísima colaboración, que ha sido fundamental para el desarrollo de esta Tesis; a **Marta Darder**, muy especialmente, que ha compartido conmigo los momentos más difíciles, y me ha ofrecido siempre su ayuda, y su amistad; a **Marta Pérez**, **Milagros Mínguez**, **Conchi Ragel**, **Fernando Garrido**, compañeros de doctorado y de tertulia; a todos los componentes del Departamento de Bioquímica, en especial al equipo de investigación que dirige **Carlos Martínez-Honduvilla**; a **María**, que me ha ayudado muchas noches a preparar los ensayos del día siguiente, siempre con una sonrisa; a todos los que, por venir a visitarme al laboratorio, se han visto obligados a pelar y pesar semillas, a poner agua en las celdas o a lavar tubos de ensayo; a mis padres, que me apoyan siempre, y a **Salva**, que, con su ayuda desinteresada, me ha facilitado enormemente la escritura de este trabajo.

También agradezco al **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II** y a **D. Manuel Ruíz Amil** haberme proporcionado los medios necesarios para la realización de esta Tesis, a la **Universidad Complutense de Madrid** por la concesión de la Beca Predoctoral y la financiación del proyecto de investigación MD/08/89-1472, en el que está incluido este trabajo, y a la **Comunidad Autónoma de Madrid** por la ayuda de infraestructura y equipamiento.

Gracias a todos.

INDICE

Resumen	xiii
Summary	xiv
Abreviaturas	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estado del agua en la semilla	1
1.2. Actividad enzimática y metabólica en la semilla en estado seco	4
1.3. Estado de las membranas en la semilla seca	6
1.4. Procesos de envejecimiento en las semillas	8
1.4.1. Concepto de envejecimiento	8
1.4.2. Factores que afectan a la viabilidad y vigor de las semillas durante su almacenamiento	10
1.4.2.1. Contenido de humedad de la semilla	10
1.4.2.2. Temperatura y humedad de almacenamiento	11
1.4.2.3. Fluctuaciones en las condiciones de almacenamiento	12
1.4.2.4. Composición gaseosa del medio	12
1.4.2.5. Patógenos	13
1.4.3. Alteraciones fisiológicas y bioquímicas asociadas al envejecimiento de las semillas	14
1.4.3.1. Alteraciones de membrana	16
1.4.3.1.1. Peroxidación lipídica	19
1.4.3.1.2. Radicales libres	22
1.4.3.2. Alteraciones en la estructura de las proteínas y actividades enzimáticas	29
1.4.3.3. Alteraciones metabólicas	30
1.4.3.3.1. Alteraciones en la respiración	30

1.4.3.3.2.	Alteraciones en el contenido y síntesis de ATP	32
1.4.3.3.3.	Alteraciones en ácidos nucleicos y síntesis proteica	33
1.5.	Mecanismos celulares de defensa frente al deterioro	35
1.5.1.	Antioxidantes no enzimáticos	37
1.5.1.1.	Glutation	38
1.5.1.2.	Acido ascórbico	41
1.5.2.	Antioxidantes enzimáticos	43
1.5.2.1.	Superóxido dismutasa	44
1.5.2.2.	Catalasa	47
1.5.2.3.	Enzimas que participan en el ciclo de detoxificación del peróxido de hidrógeno (ciclo de ascorbato-glutation)	49
1.5.2.3.1.	Ascorbato peroxidasa	52
1.5.2.3.2.	Monodehidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa	53
1.5.2.3.3.	Glutation reductasa	55
1.6.	Métodos para la determinación de la viabilidad y vigor de las semillas	57
1.6.1.	Ensayos de germinación	58
1.6.2.	Ensayos de evaluación y crecimiento de plántulas	61
1.6.3.	Ensayos de coloración	63
1.6.4.	Ensayos de liberación	66
1.6.4.1.	Medida de la liberación de sustancias al medio	67
1.6.4.2.	Ensayo de la conductividad eléctrica	68
1.6.5.	Determinación de actividades enzimáticas	73
1.6.6.	Ensayos de envejecimiento acelerado y deterioro controlado	74
1.6.7.	Otros métodos	78
2.	OBJETIVOS	79
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1.	Material biológico	81

3.2. Envejecimiento acelerado	83
3.4. Determinación de la viabilidad y vigor de semillas	84
3.4.1. Ensayos de germinación	84
3.4.2. Ensayos de vigor: crecimiento de plántulas e índices relacionados	85
3.4. Análisis de los exudados de las semillas	88
3.4.1. Obtención de los exudados	88
3.4.2. Determinación del pH de los exudados	88
3.4.3. Determinación de fósforo	88
3.4.4. Espectro de absorción de los exudados	89
3.4.5. Determinación de la intensidad de corriente eléctrica	89
3.4.4.1. Analizador automático de semillas	90
3.4.4.2. Preparación de las muestras	94
3.4.4.3. Lectura automática de la intensidad de corriente eléctrica	94
3.5. Cinética de captación de agua	94
3.6. Determinación de malondialdehído	95
3.7. Determinación de antioxidantes	95
3.7.1. Antioxidantes no enzimáticos	96
3.7.1.1. Determinación de ácido ascórbico reducido y total	96
3.7.1.2. Determinación de glutathion total, y de sus formas reducida y oxidada	98
3.7.2. Antioxidantes enzimáticos	101
3.7.2.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa	101
3.7.2.2. Determinación de la actividad catalasa	104
3.7.2.3. Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation	105
3.7.2.3.1. Ascorbato peroxidasa	106
3.7.2.3.2. Monodehidroascorbato reductasa	106
3.7.2.3.3. Dehidroascorbato reductasa	107
3.7.2.3.4. Glutation reductasa	108

3.8. Análisis estadístico	109
4. RESULTADOS	111
4.1. Viabilidad y vigor de las semillas de girasol	111
4.1.1. Ensayos de germinación	111
4.1.2. Ensayos de vigor: crecimiento de plántulas e índices relacionados	131
4.2. Contenido de humedad de las semillas de girasol	139
4.3. Ensayos de liberación: análisis de los exudados de las semillas de girasol	145
4.3.1. pH de los exudados	145
4.3.2. Contenido de fósforo de los exudados	151
4.3.3. Absorbancia de los exudados	157
4.3.4. Intensidad de corriente eléctrica: análisis individualizado de los exudados	165
4.3.4.1. Cinética de liberación de iones	175
4.4. Cinética de captación de agua de las semillas de girasol	187
4.5. Contenido de malondialdehído en semillas de girasol	195
4.6. Cambios asociados con la capacidad antioxidante de las semillas de girasol	203
4.6.1. Actividad superóxido dismutasa	203
4.6.2. Actividad catalasa	209
4.6.3. Funcionalidad del ciclo ascorbato-glutation	215
4.6.3.1. Niveles de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, y actividades enzimáticas relacionadas	215
4.6.3.2. Niveles de glutatión y glutatión reductasa	215
5. DISCUSIÓN	239
5.1. Efecto del envejecimiento artificial en la viabilidad y vigor de las semillas de girasol	239
5.1.1. Evaluación de la germinación	239
5.1.2. Evaluación del vigor	242

5.2. Evolución del contenido de humedad de las semillas de girasol artificialmente envejecidas	243
5.3. Análisis de los exudados de las semillas de girasol: efecto del envejecimiento artificial en la funcionalidad de las membranas . . .	244
5.3.1. Cambios de pH de los exudados	244
5.3.2. Evaluación del contenido de fósforo de los exudados	245
5.3.3. Cambios de absorbancia de los exudados	246
5.3.4. Evaluación de la intensidad de corriente eléctrica	246
5.4. Efecto del envejecimiento artificial en la cinética de captación de agua	255
5.5. Valoración de la peroxidación lipídica: cambios del contenido de malondialdehído	259
5.6. Efecto del envejecimiento artificial en los sistemas antioxidantes analizados	261
5.6.1. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa	261
5.6.2. Evaluación de la actividad catalasa	263
5.6.3. Evaluación de la funcionalidad del ciclo ascorbato-glutation . . .	264
5.6.3.1. Niveles de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, y actividades enzimáticas relacionadas	264
5.6.3.2. Niveles de glutatión y glutatión reductasa	265
5.7. Relaciones entre parámetros fisiológicos y bioquímicos en las semillas de girasol artificialmente envejecidas	273
6. CONCLUSIONES	283
7. BIBLIOGRAFÍA	287

RESUMEN

de PAULA, M. Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante

Se ha analizado el efecto del envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR, durante 1 a 11 días) de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) de dos clases comerciales diferenciadas por su tamaño, en relación a las siguientes características fisiológicas y bioquímicas: a) viabilidad y vigor, b) alteraciones de membrana por medio de ensayos de liberación de solutos (determinación de A_{280} y fósforo) e iones (medida de la intensidad de corriente eléctrica), c) peroxidación lipídica por cuantificación de malondialdehído y d) evaluación de sistemas antioxidantes (SOD, CAT y ciclo del ascorbato-glutation). Los resultados obtenidos revelan la pérdida progresiva de la viabilidad que se manifiesta por un aumento del número de plántulas anormales y de semillas muertas, más evidente a medida que se prolonga el tiempo de envejecimiento. La pérdida de la viabilidad está acompañada por una alteración de la permeabilidad de las membranas, que se pone de manifiesto por la salida masiva de compuestos orgánicos e iones. El análisis de la liberación de iones procedentes de las semillas sin cubiertas permite además estimar de forma fiable la calidad de las mismas. Por otra parte, el envejecimiento artificial no altera significativamente la cantidad de malondialdehído detectada en las semillas. Sin embargo, la presencia de este compuesto y su posterior disminución durante la rehidratación, sugieren que el proceso de peroxidación lipídica tiene lugar durante la manipulación y conservación de las semillas en estado seco. Por último, el análisis de los sistemas antioxidantes revela que el glutathione es el principal antioxidante no enzimático de la fracción soluble. Este compuesto se localiza fundamentalmente en el eje embrionario, y ejerce su acción protectora mediante reacciones que disminuyen la reserva de glutathione reducido y, en menor medida, aumentan los niveles de GSSG. La rehidratación de las semillas reactiva el metabolismo celular y favorece la actuación de los sistemas de detoxificación, lo que genera un ambiente reductor que facilita la reparación de los daños acumulados durante el envejecimiento. Sin embargo, el mantenimiento de las condiciones de envejecimiento durante períodos prolongados (11 días) altera la funcionalidad celular de manera irreversible, lo que se traduce, una vez concluido el proceso germinativo, en la aparición de plántulas anormales y semillas muertas.

PALABRAS CLAVE: CAT, ciclo ascorbato-glutation, envejecimiento, estrés oxidativo, girasol, membranas, peroxidación lipídica, SOD, viabilidad.

SUMMARY

de PAULA, M. Biochemical alterations in aged sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) seeds related to viability, membrane integrity and changes associated to antioxidant capacity.

The effect of accelerated ageing (43 °C, 75 % HR for up 1 to 11 days) was performed in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) seeds from two commercial classes which differ in seed size, in relation to the following physiological and biochemical characteristics: a) viability and vigour, b) membrane permeability by leakage assays (A_{280} , phosphorus, and electrical conductivity), c) lipid peroxidation by measuring malondialdehyde content, and d) antioxidant systems (SOD, CAT and, ascorbate-glutathione cycle). The results shows the progressive loss of viability, which is accompanied by an increase in abnormal seedlings and dead seeds, more evident as progresses ageing. The loss of viability is closely related to membrane disruption, which allows the leakage of both solutes and electrolytes. Moreover, the quality of seeds is shown by electrolyte leakage measured in dehulled seeds. However, accelerated ageing does not change malondialdehyde content, but high levels of this compound are detected, suggesting that lipid peroxidation might occur during seed handling and storage. Finally, the study of antioxidant systems reveals that glutathione is the major non-enzymic antioxidant compound (scavenger) in soluble fraction. It is located mainly in embryonic axes, and its protective role is mediated by reactions that consumes the GSH pool and increases the oxidized form (GSSG). Seed imbibition (pregerminative phase) activates cellular metabolism and allows antioxidant enzymes to act upon toxic agents. These facts provide a reducing status in which repairing damage becomes possible. However, prolonged ageing conditions (11 days) result in irreversible damage, and, when the germinative process concludes, it is expressed by the appearance of abnormal seedlings and dead seeds.

KEY WORDS: ageing, ascorbate-glutathione cycle, CAT, lipid peroxidation, membrane leakage, oxidative stress, SOD, sunflower, viability.

ABREVIATURAS

A	Plántulas anormales
A₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
AA	Acido ascórbico
Apox	Ascorbato peroxidasa
CAT	Catalasa
CE	Conductividad eléctrica
DH	Acido dehidroascórbico
DHred	Dehidroascorbato reductasa
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
G	Semillas germinadas
G_{TOTAL}	Glutation total
gl	Grados de libertad
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GSSG red	Glutation reductasa
H	Longitud del hipocótilo
HR	Humedad relativa
ICE	Intensidad de corriente eléctrica
ICE_{24cp}	Intensidad de corriente eléctrica a las 24 horas de imbibición en los exudados de las semillas completas
ICE_{24sp}	Intensidad de corriente eléctrica a las 24 horas de imbibición en los exudados de las semillas (sin pericarpio)
IVI	Indice de vigor
M	Semillas muertas
MD	Monodehidroascórbico
MDA	Malondialdehido
MDred	Monodehidroascorbato reductasa
MSD	Menor diferencia significativa
N	Plántulas normales
O₂⁻	Anión superóxido
•OH	Anión hidroxilo
P₂₄	Fósforo detectado en los exudados de semillas imbibidas durante 24 horas
P.C.	Fosfatidilcolina
p.s.	Peso seco
R	Longitud de la raíz

ABREVIATURAS

R•, R.L.	Radical libre
SE	Error estándar
SG	Semillas grandes
SOD	Superóxido dismutasa
SP	Semillas pequeñas
SUI	Índice de uniformidad
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
T.O.	Tasa de oxidación (GSSG/GSH)
TNB	Ácido 2-nitro 5-tiobenzoico
TMG	Tiempo medio de germinación

1. INTRODUCCIÓN

Una de las características más llamativas de las semillas es su bajo nivel de hidratación, que implica la reducción del metabolismo celular hasta niveles mínimos, lo que les confiere una gran resistencia frente a las variaciones ambientales, permitiendo su dispersión, almacenamiento o manipulación hasta que la rehidratación en condiciones adecuadas desencadene los procesos de germinación. Existe otro tipo de semillas denominadas **recalcitrantes**, que por el contrario deben presentar, retener y preservar un alto contenido de humedad para mantener su viabilidad. Estas semillas proceden generalmente de climas tropicales, donde las condiciones de germinación son en general suficientemente favorables, por lo que no necesitan la deshidratación como forma de resistencia. A los efectos del desarrollo de este epígrafe, el término semilla hace referencia a las que presentan un comportamiento **ortodoxo** y que, por otra parte proceden de especies cuyo hábitat corresponde a nuestras latitudes.

1.1. Estado del agua en la semilla

El agua ejerce una profunda influencia en las semillas. Cuando los niveles de hidratación son muy bajos, el metabolismo disminuye y prácticamente no hay signos de vida; un pequeño incremento en el contenido de agua permite restaurar la mayoría de las funciones metabólicas propias de los organismos vivos. Es, por tanto, el nivel de hidratación el que determina la transformación de la semilla de fisiológicamente inactiva a fisiológicamente activa.

La hidratación de las semillas se estudia mediante isotermas de absorción (Fig. 1), que se obtienen por medida de la humedad de equilibrio en función de la humedad relativa a una temperatura constante, y que presentan una forma sigmoideal característica, que

obedece a un modelo trifásico. Según Priestley (1986), la primera fase de hidratación (Zona I) se caracteriza por una absorción rápida de agua, que posteriormente se estabiliza (Zona II), para seguir aumentando en una tercera fase (Zona III). Las isotermas de absorción representan las propiedades higroscópicas de la totalidad de la semilla y, por tanto de sus principales componentes. Así, para la misma humedad relativa, las semillas ricas en almidón alcanzan un mayor contenido de agua que las semilla oleaginosas. Sin embargo, el valor de humedad relativa donde se producen los dos puntos de inflexión (paso de la Zona I a la Zona II y de la Zona II a la Zona III) es independiente de la composición de la semilla.

En la Zona I el agua está fuertemente ligada a grupos cargados de proteínas (carboxilos y aminos), a lípidos, a paredes celulares, etc. La Zona II presenta agua unida por puentes de hidrógeno a grupos polares no ionizados de almidón y proteínas (hidroxilos, amidas). Por último, en la Zona III el agua se une a residuos no polares, presenta gran movilidad y empiezan a ponerse de manifiesto las propiedades osmóticas y de capilaridad (Rupley y col., 1983).

Otros autores (Bruni y Leopold, 1991a; Williams y Leopold, 1989) proponen un modelo diferente que asume que el agua mantiene sus propiedades como solvente incluso a niveles mínimos de hidratación, donde estaría formando una solución super-saturada con propiedades de viscosidad análogas a las del vidrio. Un aumento del contenido de humedad diluiría el cristal progresivamente hasta adquirir las propiedades del agua libre. El citoplasma vitrificado durante la desecación evitaría la posterior cristalización de sales y proteínas citoplásmicas, y favorecería la tolerancia de estos organismos a la deshidratación. Por otra parte, recientemente Sun y Leopold (1994) han sugerido que la pérdida del estado vítreo durante el envejecimiento de las semillas podría favorecer la aparición de las reacciones degenerativas que aceleran la pérdida de viabilidad.

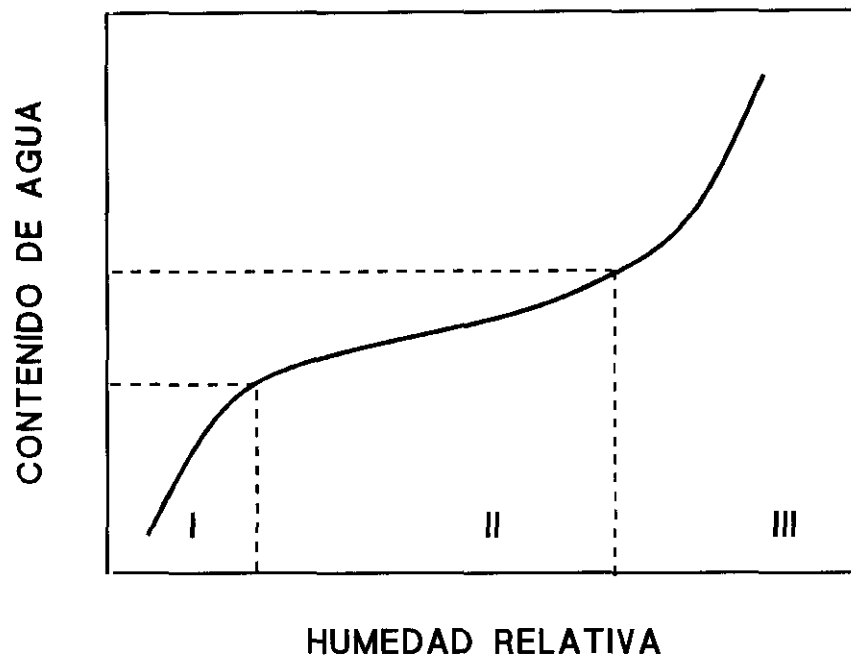


Figura 1. Isotermas de absorción de agua de las semillas en función de la humedad relativa ambiental. I, II y III representan las zonas con diferente grado de interacción entre el agua y la semilla.

La diferencia entre ambos modelos se pondría de manifiesto en los tejidos completamente hidratados en los cuales. Según el primer modelo, deberían coexistir varios tipos de agua (ligada, libre), cada uno con sus propiedades específicas, mientras que según el segundo modelo todo el agua contenida en el sistema presentaría propiedades similares (Vertucci, 1989).

1.2. Actividad enzimática y metabólica en la semilla en estado seco

La configuración estructural de la mayoría de las enzimas es muy sensible a la deshidratación, sin embargo, el estudio de las enzimas aisladas sugiere que pueden ser funcionales incluso bajo condiciones de hidratación restringida (Priestley, 1986). Las enzimas presentes en las semillas secas pueden mantener intacta su capacidad catalítica, lo cual se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios (Attucci y col., 1991; de Paula, 1991; Nakayama y col., 1980; Raymond y col., 1992), en los que las enzimas se extraen a partir de semillas secas y posteriormente se ensaya su actividad *in vitro*. Son dos los factores que limitan la actividad enzimática de los sistemas parcialmente hidratados; por un lado, la movilidad intramolecular necesaria para la función enzimática está muy limitada en una matriz no fluida, y por otro lado existe una gran dificultad para el acceso del sustrato así como para la difusión del producto desde el lugar de reacción (Fig. 2).

Vertucci (1989) observó que la cinética de captación de oxígeno presenta una forma trifásica, relacionada con la hidratación de la semilla. La captación de oxígeno durante las fases I y II se podría atribuir a procesos de peroxidación, que influyen enormemente en el deterioro de las semillas, o a otras reacciones oxidativas que no resultan de la actividad mitocondrial o glicolítica, mientras que durante la fase III se haría efectiva la respiración mitocondrial (Puntarulo y col., 1988), ya que sólo en esta fase la captación de oxígeno se inhibe en presencia de cianuro. La falta de actividad respiratoria a niveles de humedad inferiores al 8 % (Zona I) es consistente con la falta de actividad de la mayoría de las

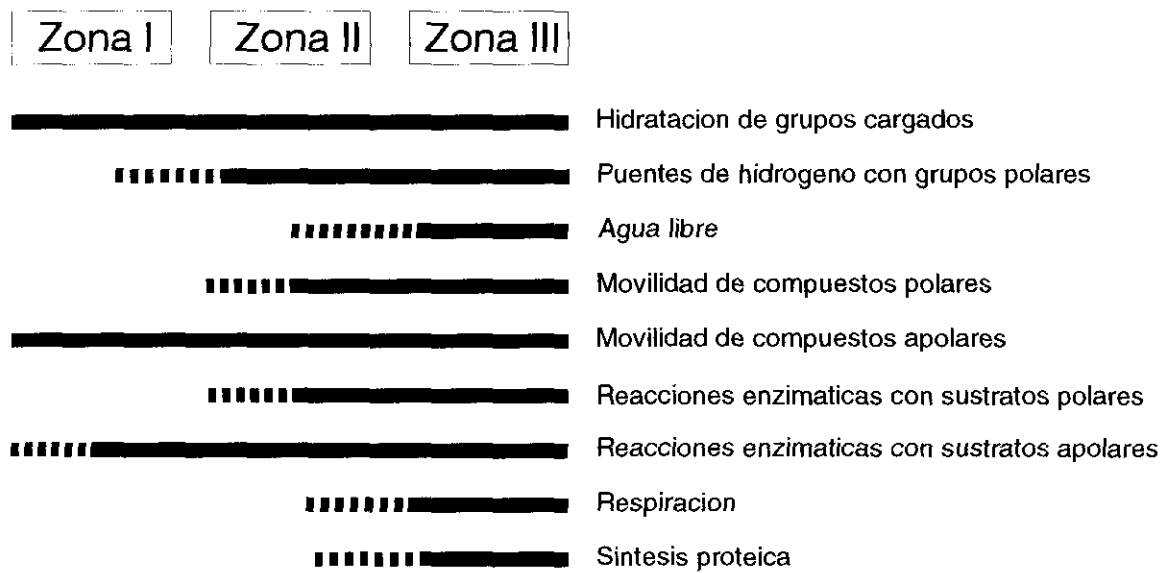


Figura 2. Organización metabólica de las semillas en función de la hidratación (Priestley, 1986). Las Zonas I, II, III, corresponden a las áreas definidas en las isotermas de absorción, señaladas en la Figura 1.

enzimas en condiciones de deshidratación. La Zona II se ha denominado como región de metabolismo restringido o "local", ya que es el nivel de hidratación donde empieza a aparecer agua libre y tienen lugar ciertas reacciones de complejos enzimáticos asociados con la matriz citoplasmática (Bruni y Leopold, 1991b) mientras que el metabolismo celular queda perfectamente establecido en la Zona III (Vertucci y Leopold, 1984).

1.3. Estado de las membranas en la semilla seca

La integridad de las membranas en las semillas es de crucial importancia para el mantenimiento de su viabilidad. Cuando están hidratadas, las membranas regulan el flujo de materiales entre los elementos subcelulares, además son el soporte de numerosas reacciones enzimáticas y mantienen la compartimentación celular. Cualquier alteración de las mismas en su estado seco tendrá importantes consecuencias en la célula rehidratada, de ahí la necesidad de conocer la estructura que presentan las membranas de la semilla seca y las posibles modificaciones o alteraciones que puedan tener lugar durante la rehidratación.

En el momento de la hidratación de los organismos en estado seco (semillas, polen, esporas) se produce la liberación de algunos componentes celulares (electrolitos, glucosa, enzimas). Algunos autores atribuyen este efecto al daño producido por la rápida y masiva entrada de agua. Sin embargo, se ha observado que la liberación de solutos al medio durante el proceso de rehidratación es mucho más acusado en semillas envejecidas, debido probablemente a una alteración irreversible de las mismas que impide tanto su posterior reorganización como la reabsorción de solutos que tiene lugar en semillas viables (de Paula, 1991).

Se han desarrollado numerosas hipótesis que intentan explicar el estado de las membranas en los sistemas deshidratados. Simon y Raja Harun (1972) propusieron que las membranas sufren una alteración de su estructura durante el proceso de desecación,

cambiando de una estructura lamelar, característica de las membranas hidratadas, a una configuración hexagonal inversa (H_{II}). Esta configuración presenta grandes poros que permiten la salida de iones durante los primeros estadios de la rehidratación, hasta que las membranas se reorganizan de nuevo en forma de bicapas.

Aunque esta hipótesis fue rápidamente aceptada por la comunidad científica, numerosas investigaciones posteriores descartaron esta posibilidad (McKersie y Stinson, 1980; Powell y Matthews, 1981). Seewaldt y col., (1981) utilizando técnicas de difracción de rayos X, concluyeron que las membranas de los organismos resistentes a la desecación mantienen su estructura lamelar en todos los niveles de hidratación, mientras que los lípidos de membrana procedentes de células animales, obviamente no adaptados a la desecación, forman una estructura hexagonal inversa al someterlos a condiciones de deshidratación. Recientemente, Crowe y col. (1989) apuntan la posibilidad de una transición de membrana desde la fase de gel en la semilla seca a la fase de líquido cristalino durante la rehidratación, con la consecuente liberación de solutos al medio.

Por otra parte, el estudio de las membranas en las semillas deshidratadas está limitado a aquellas técnicas que permitan poner de manifiesto la ultraestructura de las mismas sin que el agua intervenga en el proceso. Los resultados obtenidos por criofractura (Buttrose y Soeffky, 1973) y por microscopía electrónica con fijación anhidra (Attucci y col., 1991; Smith, 1991) muestran los profundos cambios que tienen lugar en las membranas como consecuencia de la deshidratación, y sugieren que los primeros acontecimientos que tienen lugar durante la rehidratación implican la restauración de la funcionalidad de las membranas.

1.4. Procesos de envejecimiento en las semillas

1.4.1. Concepto de envejecimiento

Según Ellis y Roberts (1981), el envejecimiento de las semillas se podría definir como un incremento en la probabilidad de la muerte de un individuo por unidad de tiempo, o un incremento de la edad. El fallo en la germinación puede ser indicativo de los procesos de envejecimiento, los cuales finalmente conducen a la muerte de la semilla. Sin embargo, la edad no puede ser considerada sólo como función del tiempo, sino también de los factores del entorno durante el almacenamiento. Por tanto, el envejecimiento es un proceso que se pone de manifiesto por un retraso en el tiempo y tasa de germinación, un incremento en la susceptibilidad frente a la temperatura, humedad, patógenos, alteraciones en las barreras de permeabilidad de las semillas y finalmente, por una pérdida de la capacidad germinativa de las mismas (Tabla 1).

TABLA 1. Características de las semillas deterioradas y/o envejecidas

Descenso de la germinación

Disminución de las condiciones subóptimas de germinación y/o crecimiento de plántulas

Retraso en la emergencia de la radícula y del crecimiento de la plántula

Incremento del número de plántulas anormales

Tolerancia disminuida a las condiciones adversas de almacenamiento

Incremento de la producción de calor durante el almacenamiento y mayor sensibilidad a los tratamientos con radiaciones

Cambios de color de las semillas

Alteraciones bioquímicas

Envejecimiento y senescencia son dos términos que en ocasiones se utilizan como sinónimos y sin embargo hacen referencia a procesos completamente distintos que comparten ciertas rutas catabólicas. El envejecimiento es un proceso degenerativo que compromete al organismo en su totalidad, mientras que la senescencia es la fase final del desarrollo de un órgano, por lo tanto es un proceso programado genéticamente y regulado por una serie de reacciones anabólicas y catabólicas que desembocan en la muerte del tejido (Kumar y Knowles, 1993). Ambos procesos son el resultado de cambios muy complejos en el metabolismo celular, que causan la destrucción de las membranas, con la consiguiente alteración de la permeabilidad, pérdida de la compartimentación, desorganización y muerte celular. Por otra parte, se considera envejecimiento natural al proceso consistente en el almacenamiento prolongado de semillas en condiciones ambientales y suele requerir, según el tipo de semillas, períodos más o menos prolongados para alcanzar una pérdida total de viabilidad. Cuando las condiciones ambientales son extremas el proceso suele acelerarse, conociéndose a este fenómeno como envejecimiento artificial o acelerado, lo que permite distinguir entre edad fisiológica y cronológica.

El estudio del envejecimiento se puede abordar desde dos puntos de vista distintos, pero igualmente válidos. Un enfoque fisiológico, que se centra en los efectos que el envejecimiento de las semillas tiene sobre la germinación y el vigor, así como las condiciones climáticas o ambientales que lo favorecen. Un enfoque bioquímico, que analiza los procesos moleculares que causan el deterioro celular. En el desarrollo de este apartado intentaremos reunir ambas opciones para dar una visión lo más completa posible del envejecimiento de las semillas, sus causas y sus consecuencias.

1.4.2. Factores que afectan a la viabilidad y vigor de las semillas durante su almacenamiento

Según Roos (1980), la reducción de la viabilidad de semillas no es sólo función del tiempo. Este no es un factor crítico para los cambios fisiológicos y bioquímicos que se producen durante el envejecimiento. Existen otros factores que inciden decisivamente en este proceso, entre los que cabe señalar los siguientes:

1.4.2.1. Contenido de humedad de la semilla

En general, cuando el nivel de humedad de la semilla es elevado (superior al 30 %), las semillas no durmientes y las semillas sanas suelen germinar. Si el contenido de humedad se encuentra entre 18-30 % existe una mayor predisposición para el ataque de microorganismos durante el almacenamiento, pero si dicho contenido desciende a valores inferiores al 20 % las semillas pueden respirar y si la ventilación no es la adecuada se puede producir un aumento de la temperatura, que dañaría la semilla de forma drástica y provocaría su muerte. Cuando las semillas presentan un nivel hídrico del 4-5 % se hacen resistentes al ataque de microorganismos, aunque en estos niveles de humedad pueden tener lugar otro tipo de procesos como la peroxidación lipídica, cuyos efectos sobre la viabilidad son muy negativos.

Vertucci y Roos (1990) han desarrollado una serie de ecuaciones que permiten calcular el contenido de humedad óptimo para el almacenamiento de cada tipo de semillas. En este sentido es muy importante la humedad relativa del ambiente, ya que afecta al contenido de humedad de la semilla. Sin embargo, el contenido de humedad de algunas semillas como las oleaginosas difiere de la humedad presente en semillas ricas en carbohidratos para la misma humedad relativa del ambiente.

1.4.2.2. Temperatura y humedad de almacenamiento

En general, el almacenamiento de semillas entre 0-5 °C es bastante adecuado, pues reduce o previene los efectos drásticos del envejecimiento y deterioro durante el proceso de germinación. Los resultados obtenidos por Grilli y col. (1982) demuestran la actividad protectora de las bajas temperaturas frente a los procesos degradativos durante el almacenamiento de semillas de trigo duro, así como la existencia de una correlación entre la estabilidad estructural y funcional del RNA y la germinación y crecimiento de las plántulas. Temperaturas comprendidas entre -15 a -20 °C son adecuadas para el mantenimiento y prolongación de la longevidad de las semillas durante su almacenamiento, como han puesto de manifiesto distintos autores (Ackigoz y Knowles, 1983; Rivicker, 1981). En algunos casos se ha hecho uso del nitrógeno líquido para proporcionar temperaturas inferiores a -196 °C como medio de almacenamiento de semillas, si bien su eficacia está condicionada por el contenido de humedad de las semillas (Roberts, 1983; Zewdie y Ellis, 1991).

Priestley y col. (1985a) han observado que a temperaturas elevadas y alta humedad relativa se produce una tendencia al aumento de radicales libres cuando las semillas son tratadas en estas condiciones e inmediatamente desecadas. Esto sugiere que los radicales libres pueden jugar un importante papel en el deterioro de semillas y que la actividad de los compuestos capaces de contrarrestar a los radicales libres es dependiente del nivel de humedad de las semillas. Durante el almacenamiento, y dependiendo del nivel de hidratación, el cual está limitado por las condiciones de temperatura y humedad relativa, pueden producirse reacciones de autooxidación, deterioro por hongos y respiración mitocondrial (Harrington, 1972; Priestley y col., 1985b; Vertucci y Leopold, 1987), que además son responsables, en gran medida, del envejecimiento de las semillas.

1.4.2.3. Fluctuaciones en las condiciones de almacenamiento

Como se ha comentado anteriormente, las condiciones de almacenamiento ejercen una gran influencia en la viabilidad y vigor de las semillas. Si las condiciones de almacenamiento fluctúan, alternándose humedades relativas bajas con altas, el deterioro de las semillas es superior. En estas condiciones las semillas pierden más rápidamente su viabilidad en comparación con las semillas almacenadas a humedades relativas altas. La gravedad de estos efectos es menor si el factor que fluctúa es única y exclusivamente la temperatura, aunque puede ser perjudicial para algunas especies de semillas.

1.4.2.4. Composición gaseosa del medio

La composición y las características de la materia gaseosa que rodea a las semillas durante el almacenamiento tiene una menor importancia comparada con los factores descritos anteriormente, sobre todo en aquellas semillas sometidas a envasado o contenidas en recipientes cerrados cuyos espacios muertos han sido ocupados con determinadas mezclas de gases. Roberts y Abdalla (1968) confirman en semillas de cebada, guisante y judía la pérdida de viabilidad, al incrementarse la presión gradual de oxígeno, especialmente cuando el contenido de humedad de la semilla aumenta. Este efecto nocivo del oxígeno se podría explicar por las reacciones de peroxidación y por la formación de radicales libres. Si se acepta esta idea, la sustitución del aire por gases inertes (nitrógeno, argón o helio) reduciría tales alteraciones, lo que contribuiría a mantener la viabilidad y longevidad de las semillas. En este sentido, Corvillón (1977) observó en semillas de pino una mayor protección frente al envejecimiento, medido por la capacidad germinativa, cuando éstas se almacenaban en presencia de nitrógeno, en comparación con las semillas almacenadas en presencia de oxígeno. Bewley y Black (1982) también han indicado que el control de la composición gaseosa del ambiente (bajo contenido de oxígeno) sólo presentaría ventajas cuando la temperatura o el contenido de humedad fueran elevados.

Cuando las semillas son almacenadas a altos niveles de humedad, el dióxido de carbono puede jugar algún papel como represor metabólico, pero si el contenido de humedad es bajo, puede actuar como antioxidante (Sankara-Rao y Achaya, 1969). También se mantiene la viabilidad y se prolonga la longevidad de semillas de trigo duro cuando son almacenadas en presencia de éste, en equilibrio a 11 % de humedad relativa (Bennici y col., 1984). Sin embargo, en otros estudios no se ha observado un efecto claramente beneficioso (Bass y Stanwood, 1978). Estas diferencias podrían ser explicadas en el sentido de la distinta humedad de almacenamiento a que están sometidas las muestras conservadas en atmósfera de dióxido de carbono, en comparación con las almacenadas a temperatura ambiente con una composición no enriquecida en este compuesto.

1.4.2.5. Patógenos

El estado sanitario de las semillas es otro factor que conduce al envejecimiento y que acarrea importantes pérdidas económicas. La contaminación de las semillas por patógenos es particularmente interesante en especies destinadas a procesos industriales y a la producción de piensos. Si bien este aspecto del deterioro de las semillas ha sido estudiado por fitopatólogos, las causas anteriores nos obligan, aunque brevemente, a considerar también este factor.

Los microorganismos capaces de contribuir al deterioro de las semillas son ubicuos y pueden atacarlas durante su maduración, recolección y almacenamiento, e incluso después de la siembra. En la mayoría de los casos son los hongos los microorganismos responsables del deterioro de las semillas, los cuales pueden actuar mediante dos mecanismos: **1)** producción de enzimas exocelulares como celulasas, pectinasas, amilasas, lipasas, proteasas y nucleasas, y **2)** producción de toxinas como las aflatoxinas originadas por el hongo *Aspergillus* que reduce el crecimiento de las plántulas y origina alteraciones metabólicas así como la desorganización del retículo endoplásmico. Dentro de este grupo se distinguen dos tipos diferentes: hongos de campo y hongos de almacenamiento. Los

primeros invaden a las semillas durante su desarrollo y maduración en la planta, causando la decoloración de ésta, la muerte de óvulos y embriones y la producción de sustancias tóxicas para el hombre y animales. Generalmente afectan a los granos de cereales (trigo, cebada, avena) y pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Clamidosporium* y *Helminthosporium*, mientras que los hongos de almacenamiento están representados por diversas especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillum* y tienen mayor relevancia durante la conservación de semillas. Estos hongos para su crecimiento necesitan una humedad de equilibrio adecuada, que viene determinada por el contenido de humedad de la semilla y por la humedad relativa del ambiente, aunque la facilidad de penetración, temperatura, composición química y tiempo también son factores que afectan a su virulencia. Igualmente, originan la decoloración de las semillas, aumentando la producción de calor y la producción de micotoxinas (aflatoxinas) (Bewley y Black, 1982; Halloin, 1986).

De los diversos factores expuestos anteriormente se deduce que la viabilidad aumenta cuando las semillas se almacenan a temperaturas y contenidos de humedad bajos. Conseguir bajas temperaturas no constituye un problema si se dispone de un buen equipo de refrigeración. Sin embargo, mantener un bajo contenido de humedad en las semillas, después de que han sido desecadas y preparadas para el almacenamiento, depende de las condiciones de los lugares de depósito y de las propiedades de los recipientes o contenedores empleados para su conservación (Torres y Martínez-Honduvilla, 1987).

1.4.3. Alteraciones fisiológicas y bioquímicas asociadas al envejecimiento de las semillas

La naturaleza de los procesos de envejecimiento en los organismos deshidratados difiere significativamente de las formas de deterioro encontradas en los organismos fisiológicamente activos. Una semilla, cuyo nivel de hidratación corresponde a las Zonas I o II (Fig. 1), carece de un metabolismo lo suficientemente activo como para realizar

funciones de autorreparación (Priestley, 1986). La viabilidad y el vigor de las semillas dependen de la integridad de las macromoléculas y de la ordenada compartimentación de la célula, pero en una semilla almacenada en estado seco, la degradación de estos elementos funcionales y estructurales progresará irreversiblemente como resultado de ciertas reacciones químicas y otras formas de desnaturalización. Los mecanismos de defensa celulares (véase apartado 1.5) pueden detener de alguna manera este proceso, pero en ausencia de imbibición, el metabolismo y la reparación están limitados, de forma que la desorganización celular puede llegar hasta tal punto que los procesos de reparación, activados después de la hidratación, sean incapaces de restaurar la viabilidad celular.

Las investigaciones sobre el deterioro de las semillas se han centrado, en la mayoría de los casos, en la búsqueda de alteraciones fisiológicas o bioquímicas a nivel subcelular (Tabla 2) que se correspondan con la pérdida de la viabilidad o del vigor, asumiendo que la alteración observada representa la lesión primaria responsable del envejecimiento. Sin embargo, es difícil discernir si el efecto observado puede ser considerado una causa o es en cambio una consecuencia del envejecimiento. Teniendo en cuenta esta consideración, en el desarrollo de este epígrafe se abordan las principales alteraciones observadas durante el envejecimiento de las semillas y, en especial, aquellas que puedan ser detectadas con la metodología empleada en este trabajo.

TABLA 2. Principales alteraciones bioquímicas asociadas al envejecimiento de semillas

Alteraciones de membrana: descenso en el consumo de oxígeno, disminución de ATP, mayor liberación de sustancias al medio (electrolitos, aminoácidos, azúcares, etc.)

Cambios en el contenido lipídico y acumulación de ácidos grasos libres

Degradación de proteínas y cambios en las actividades enzimáticas

Alteraciones en el RNA y la síntesis proteica

Deficiencias en el metabolismo respiratorio y biosintético

Aberraciones cromosómicas y alteraciones en la integridad del DNA

Cambios en el nivel/contenido hormonal

1.4.3.1. Alteraciones de membrana

Las alteraciones a nivel de membrana y los cambios de permeabilidad celular durante el envejecimiento conducen a alteraciones metabólicas que contribuyen al proceso de deterioro y a la pérdida de viabilidad. Esta falta de integridad de las membranas en semillas deterioradas y/o envejecidas (Agrawal, 1990; Basavarajappa y col., 1991; Osborne, 1980; Priestley, 1986) podría permitir la liberación al medio que rodea a las semillas de diversos componentes orgánicos e inorgánicos (iones, azúcares, aminoácidos, enzimas, etc.). Este efecto se ha asociado con una pérdida de viabilidad en semillas de soja (Abdul-Baki y Anderson, 1973; Parrish y Leopold, 1978; Senaratna y col., 1988), cacahuete (Pearce y Abdel-Samad, 1980), maíz (Bruggink y col., 1991), guisante (Powell y Matthews, 1977), algodón (Woodstock y col., 1985), trigo, mostaza (Rudrapal y Basu, 1982) y pino (Fernández García de Castro y Martínez-Honduvilla, 1984). La relación entre la pérdida de viabilidad de la semilla de girasol y los cambios en la liberación de solutos e iones asociados con las alteraciones de membrana han producido resultados

contradictorios. Algunos autores señalan que el incremento de conductividad eléctrica está relacionado con la pérdida de viabilidad de esta especie (de Paula y col., 1992, 1994; Queiroga, 1989; Rao, 1976; Torres y Martínez-Honduvilla, 1988, 1990), en contraste con los resultados observados en semillas de esta especie artificialmente envejecidas (95-100 % de humedad relativa) que presentaron bajos niveles de electrolitos a pesar de su completa pérdida de viabilidad (Halder y Gupta, 1980, 1982; Halder y col., 1983).

También se han señalado diferencias en la liberación de solutos e iones en semillas que presentan una alta germinabilidad, lo cual no clarifica la idea de que el envejecimiento o almacenamiento prolongado contribuye a la liberación de iones y solutos al medio, como se ha observado en semillas procedentes de lotes comerciales de guisante y judía (Matthews y Bradnock, 1968), soja (Oliveira y col., 1984) y algunas especies pratenses (McKersie y col., 1981). La conductividad eléctrica de los lixiviados de estas semillas, no obstante, está correlacionada negativamente con el comportamiento en el campo.

La observación del incremento en la liberación de iones y solutos en semillas envejecidas (de Paula y col., 1992, 1994; Gidrol y col. 1989; Powell y Matthews, 1977) apoya la idea del deterioro de las membranas en las primeras etapas del envejecimiento. Muchas actividades celulares implican a las membranas y a la reducción de las actividades enzimática, respiratoria y de síntesis de macromoléculas que se producen durante el envejecimiento, que podrían estar relacionadas con el deterioro inicial de las membranas (de Paula y col., 1993; Roberts, 1983). Los daños ultraestructurales observados a nivel de plasmalema, la retracción del citoplasma de la pared celular, las aberraciones de las membranas de los embriones y las alteraciones observadas en las mitocondrias (Abu Shakra y Ching, 1967; Fernández García de Castro y Martínez-Honduvilla, 1984; Harman y Grannett, 1972; Roberts, 1983) permiten indicar que los cambios bioquímicos y fisiológicos que se producen en las membranas durante el envejecimiento de semillas pueden conducir a un incremento de la liberación de solutos e iones. En estas investigaciones, sólo aquellos cambios que se producen durante las etapas iniciales del envejecimiento de semillas, cuando éstas son todavía viables y mantienen tejidos vivos,

pueden reflejar efectivamente una posible alteración o deterioro de membranas. Sin embargo, los cambios bioquímicos que se observan en estados posteriores del envejecimiento podrían indicar la muerte de los tejidos más que el envejecimiento de los mismos.

Las bases bioquímicas de las alteraciones de membrana en semillas envejecidas han sido estudiadas en profundidad ya que estas alteraciones afectan no sólo a la integridad celular sino también a la actividad metabólica asociada a las membranas, como es la respiración. En general se acepta que las alteraciones que podrían culminar en el deterioro de las membranas implican fundamentalmente a los lípidos que las componen (Basavarajappa y col., 1991; Priestley, 1986; Thompson y col., 1987; Wilson y McDonald, 1986), afectando al nivel y/o cantidad de fosfolípidos de membrana.

Koostra y Harrington (1969) observaron un descenso en el contenido de fosfolípidos, especialmente en fosfatidilcolina (PC) en los cotiledones de pepino, antes de la pérdida de viabilidad con un descenso drástico en su capacidad germinativa. Este descenso de PC estuvo asociado a un incremento de su producto de hidrólisis, concretamente la lisofosfatidilcolina. Un comportamiento semejante se ha observado también en semillas de girasol (Halder y col., 1983), cacahuete (Pearce y Abdel-Samad, 1980), tomate (Francis y Coolbear, 1984) y guisante (Powell y Harman, 1985). En este último caso el descenso de fosfolípidos sucede cuando se produce un incremento de la liberación de iones y solutos procedentes de los tejidos vivos, lo que -en principio- es consistente con la hipótesis del deterioro de membranas durante los estados iniciales del envejecimiento de semillas, como recientemente ha señalado Pukacka (1991) en semillas envejecidas naturalmente de *Acer platanoides*. También se han descrito cambios en el nivel de fosfolípidos en semillas natural y artificialmente envejecidas de soja (Priestley y col., 1980; Senaratna y col., 1988), cebolla (Salama y Pearce, 1993) y trigo de bajo y alto vigor (McDonell y col., 1982), las cuales muestran además una incorporación distinta, siendo las semillas de alto vigor las que captan más rápidamente la PC marcada radiactivamente.

La teoría más comúnmente aceptada para explicar este descenso de los fosfolípidos implica a procesos de peroxidación lipídica tanto enzimática (mediada por la enzima lipoxigenasa), como no enzimática (por acción de radicales libres), que se tratarán en profundidad más adelante. Sin embargo, para la actuación de la lipoxigenasa es necesaria la presencia de ácidos grasos libres, por lo que algunos autores (Basavarajappa y col., 1991; Kumar y Knowles, 1993) consideran que la hidrólisis de los fosfolípidos tiene lugar antes que los procesos de peroxidación, lo cual tendría un cierto paralelismo con los sucesos que desencadenan la senescencia de otros tejidos. Esta hidrólisis puede ser debida a enzimas lipolíticas (Salama y Pearce, 1993) ampliamente distribuidas en tejidos vegetales y presentes en semilla seca, como son la fosfolipasa D (Brown y col., 1990) o la acilhidrolasa inespecífica. Sin embargo, la medida en que estas enzimas puedan actuar dependerá del grado de hidratación de la semilla (véase epígrafe 1.2.), que condiciona la accesibilidad del sustrato. Otros autores (Senaratna y col., 1988; van Bilsen y Hoekstra, 1994), en cambio, señalan la posible implicación de los radicales libres en la desesterificación no enzimática de los fosfolípidos de membrana que podría tener lugar a bajos niveles de hidratación (Priestley, 1985a).

Tanto la peroxidación lipídica como la hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas producen una alteración de las propiedades físicas de las mismas, incrementando su viscosidad, al aumentar la cantidad relativa de lípidos saturados en las membranas, y su rigidez, al favorecer la fase de gel frente a la de líquido cristalino, lo cual debilita las membranas (Barber y Thompson, 1980), altera la asociación lípido-proteína (Shinitzky e Inbar, 1976) y permite la masiva liberación de solutos que tiene lugar durante la rehidratación de la semilla.

1.4.3.1.1. Peroxidación lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las semillas son muy lábiles y particularmente susceptibles de sufrir procesos de peroxidación, que finalmente originan

la destrucción de lípidos y la iniciación de una serie de complejas reacciones que generan productos potencialmente tóxicos (Priestley, 1986). Estos procesos de peroxidación lipídica han sido asociados por numerosos autores (Hailstones y Smith, 1988; Harman y Mattick, 1976; Pauls y Thompson, 1984; Stewart y Bewley, 1980; Sung y Jeng, 1994) con el deterioro de las semillas debido a sus efectos sobre los lípidos de las membrana y el metabolismo celular.

En la Figura 3 se representa esquemáticamente la peroxidación de un ácido graso insaturado (RH). La secuencia de reacciones se inicia [1] con la captación de un hidrógeno ($H\cdot$) de un grupo metileno ($-CH_2-$) adyacente a un doble enlace. Existe una gran controversia en la literatura (Winston, 1990) sobre los agentes causales de esta reacción de iniciación, aunque generalmente se atribuye a la acción de la enzima lipoxigenasa o a la actuación de radicales libres ($X\cdot$), generalmente especies activas de oxígeno ($\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$). La cadena de peroxidación (Sabater, 1991), continúa con la formación de un radical orgánico ($R\cdot$) que en presencia de oxígeno [2] origina un radical peróxido ($ROO\cdot$), el cual, por reacción con otro ácido graso insaturado (RH) formará [3] un hidroperóxido lipídico ($ROOH$) como primer producto de oxidación. Los hidroperóxidos lipídicos se descomponen en presencia de iones generando nuevas especie de radicales libres (que continúan la peroxidación sobre moléculas adyacentes) y mezclas complejas de olefinas, alcanos y aldehidos. Las reacciones [4] y [5] corresponden a reacciones de terminación, en las que desaparecen los radicales.

La enzima lipoxigenasa (LOX) actúa sobre ácidos grasos insaturados, fundamentalmente linoleico y linolénico, liberados con anterioridad por la acción de lipasas. La secuencia de reacciones es muy similar, y en un sistema metabólicamente activo origina sustancias de gran importancia fisiológica (Ohta y col., 1990). Por otra parte, la actividad de esta enzima ha sido relacionada con los procesos de senescencia (Hildebrand, 1989) y envejecimiento (Priestley, 1986; Wang y col., 1990), debido a su capacidad para alterar la permeabilidad celular por actuar sobre los lípidos de membrana.

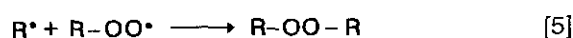
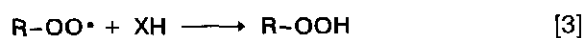
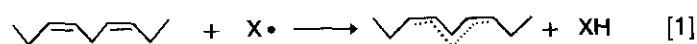


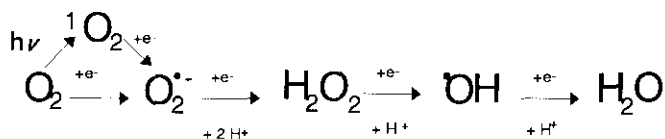
Figura 3. Secuencia de reacciones que tienen lugar durante la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, mediada por radicales libres. [1] y [2] iniciación; [3] propagación; [4] y [5] terminación.

La peroxidación lipídica tiene graves consecuencias para el funcionamiento celular. Los productos de la descomposición de los hidroperóxidos, entre los que se encuentran el etano y el malondialdehído, considerados como marcadores de la peroxidación, pueden actuar sobre las membranas alterando su funcionalidad, sobre el DNA, desnaturalizándolo (Fujimoto y col., 1984), sobre el RNA mensajero, inhibiendo la síntesis proteica (Dhindsa, 1982), sobre las proteínas modificándolas mediante enlaces covalentes, sobre aminoácidos entre los que se incluye la histidina, metionina, cisteína y lisina, oxidándolos (Priestley, 1986). Por otra parte, los productos de la peroxidación se encuentran asociados negativamente con la conductividad eléctrica en las semillas de trigo y mostaza (Rudrapal y Basú, 1980), lo cual parece implicar a las membranas celulares. No obstante, esta correlación se ha asociado con un descenso en la germinación de las semillas de cacahuete y guisante, más que con un estado inicial de envejecimiento (Pearce y Abdel-Samad, 1980; Powell y Harman, 1985).

1.4.3.1.2. Radicales libres

Los radicales libres son especies altamente reactivas capaces de atrapar o donar electrones de las moléculas próximas. Se conocen una gran variedad de radicales libres, pero los más abundantes en los sistemas biológicos son los que derivan de la reducción del oxígeno molecular¹. Estas especies activas de oxígeno se producen normalmente durante el metabolismo celular y están implicados en un gran número de procesos oxidativos ya que reaccionan con todo tipo de moléculas presentes en las células, afectando principalmente a las membranas, donde, como se ha comentado anteriormente, inician la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica, que conduce a la modificación de la funcionalidad de las mismas con la consiguiente alteración del metabolismo.

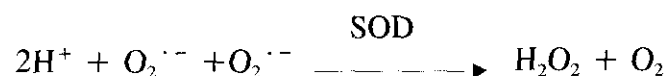
La reducción completa del oxígeno requiere cuatro electrones, con producción de una molécula de agua. Sin embargo, la reducción también puede ocurrir en pasos univalentes, dando lugar al radical libre superóxido ($O_2^{\cdot -}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical libre hidroxilo ($\cdot OH$):



Algunas enzimas son capaces de reducir univalentemente el oxígeno con formación del radical libre **superóxido**, bien como producto de reacción o como intermediario de la misma. Todas estas enzimas pertenecen a los grupos de las oxidasas y oxigenasas, que

¹Los radicales libres y especies afines constituyen un grupo muy amplio de especies químicas, tanto orgánicas como inorgánicas. Existen moléculas derivadas de la reducción del oxígeno, que no son propiamente radicales libres pero que presentan también una gran agresividad biológica. Para referirse al conjunto se usa correctamente la expresión "radicales libres y especies activas de oxígeno". Sin embargo, en la práctica, por razones de brevedad se emplea el término "radicales libres" o, simplemente "radicales".

contienen flavinas o metales, especialmente Fe y Cu, como grupos prostéticos (Sandalio y del Río, 1991). El **peróxido de hidrógeno**, a su vez, se forma durante la primera etapa de la β -oxidación de los ácidos grasos (proceso de gran importancia en las semillas oleaginosas), pudiendo originarse también por la dismutación espontánea del radical libre superóxido, o bien en la reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD):



La reducción del anión superóxido por ascorbato, tioles, ferredoxina o iones Mn, también lleva consigo la producción de peróxido de hidrógeno. Actualmente parece estar bien establecido que la reactividad del radical superóxido es más limitada de lo que en principio se pensaba y que su toxicidad proviene de la generación de especies bastante más reactivas, como el radical **hidroxilo**, que es uno de los oxidantes más potentes que se conocen y que puede actuar indiscriminadamente sobre todas las macromoléculas (Fig. 4), originando lesiones en el DNA, mutaciones o produciendo disfunciones metabólicas (Scandalios, 1993).

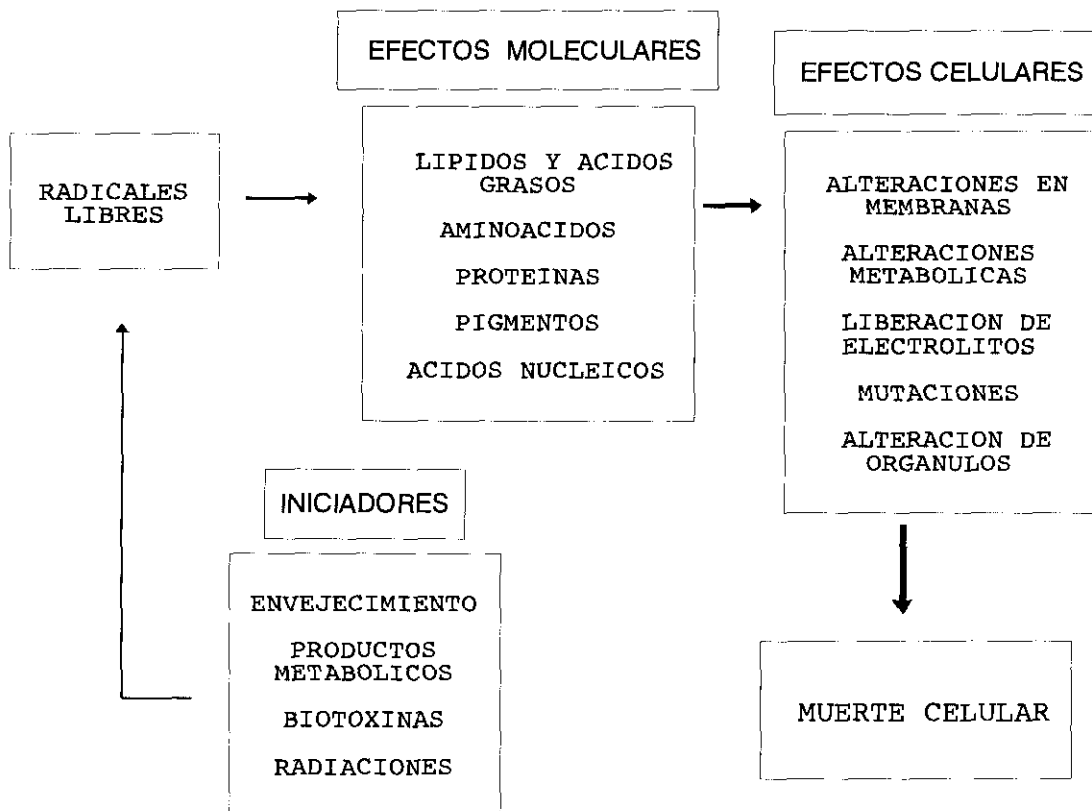
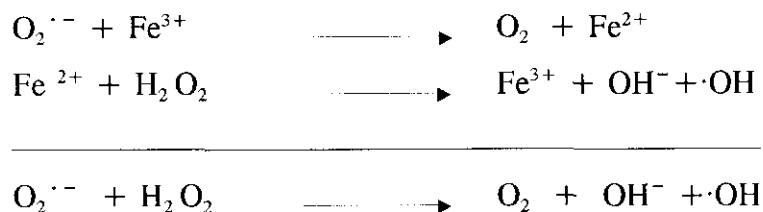


Figura 4. Secuencia de procesos de generación de radicales libres y sus consecuencias biológicas (Scandalios, 1993)

La principal fuente de este radical en sistemas biológicos es la reacción de Haber-Weiss catalizada por trazas de Fe (Minotti y Aust, 1987) o Cu:



Su formación dependerá, por tanto, no sólo de la disponibilidad de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 sino de la existencia y localización de los complejos metálicos que catalizan la reacción (Thompson y col., 1987).

El **oxígeno singlete** es otra especie de oxígeno activado, no radical, que se origina fundamentalmente en reacciones fotosensibilizadas en las que intervienen compuestos como las riboflavinas, clorofilas y porfirinas (Knox y Dodge, 1985). También se ha detectado la formación del oxígeno singlete (Thompson y col., 1987) como consecuencia de la interacción de radicales lipídicos tipo peróxidos que se producen durante las reacciones de propagación de la peroxidación lipídica:



El oxígeno singlete así formado puede contribuir a la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica en su fase de iniciación.

Las bicapas lipídicas que forman las membranas son especialmente sensibles a la acción de los radicales libres (Fig. 5), por varias causas:

- el radical superóxido puede actuar como nucleófilo provocando la desesterificación de los fosfolípidos de membrana (Navari-Izzo y col., 1992; Senaratna y col., 1988), lo que aumentará la saturación de las membranas por incremento de la relación esterol:ácidos grasos y disminuirá su fluidez,
- los ácidos grasos poliinsaturados actúan como sustrato de la enzima lipoxigenasa iniciando la peroxidación lipídica de carácter enzimático (Salama y Pearce, 1993),
- los iones metálicos catalizan la formación del radical hidroxilo a partir del anión superóxido, iniciando reacciones de peroxidación lipídica no enzimática, originando nuevos radicales lipídicos tipo alcoxi o peroxi que propagan el proceso por toda la estructura de la membrana (Thompson y col., 1987),
- los radicales libres y los productos de la peroxidación lipídica pueden alterar a las proteínas de la membrana, facilitando su hidrólisis y degradación (Wolf y Dean, 1986),
- los productos de la peroxidación lipídica se acumulan en las membranas y son los responsables de la formación de regiones en fase de gel, que modifican las propiedades físicas y funcionales de las membranas (Senaratna y col., 1988).

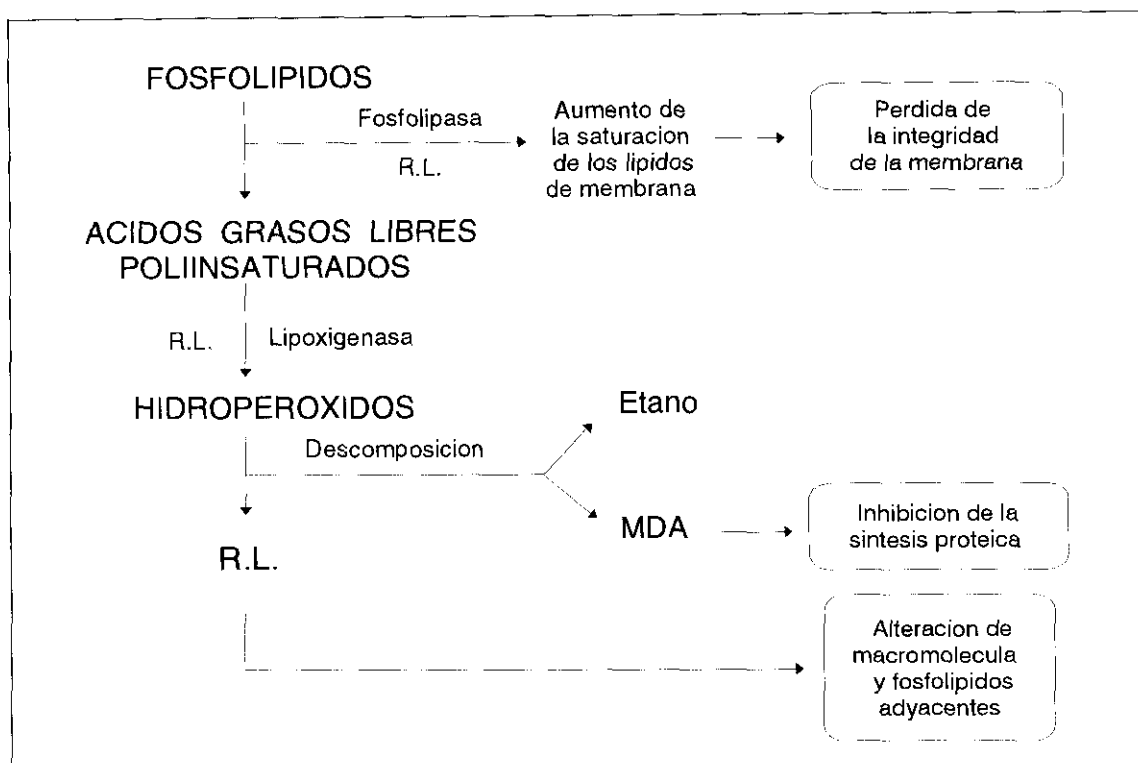


Figura 5. Procesos posibles que pueden tener lugar durante el envejecimiento. La desesterificación de los fosfolípidos por la acción radicales libres (R.L.) o de enzimas lipolíticas (fosfolipasas) aumenta el nivel de saturación de la membrana, incrementando su viscosidad y alterando su funcionalidad. Los ácidos grasos liberados se transforman en hidroperóxidos, por acción de los radicales libres o por la lipoxigenasa, y se descomponen en malondialdehído (MDA) y etano generando nuevos radicales libres. El MDA inhibe la síntesis proteica mientras que los radicales libres actúan sobre nuevos fosfolípidos adyacentes y producen daños en las macromoléculas, incluyendo DNA, RNA y proteínas (Kumar y Knowles, 1993).

Existen resultados contradictorios sobre el papel que los radicales libres tienen en los procesos de envejecimiento de semillas, debido no sólo a las diferencias que puedan existir entre las especies estudiadas, sino a las distintas condiciones de hidratación (Puntarulo y Boveris, 1990; Vertucci y Leopold, 1987) en que el envejecimiento tiene lugar. Los procesos de peroxidación mediados por radicales libres se facilitan, en general, cuando los niveles de hidratación son muy bajos, equivalentes a la Zona I de absorción, ya que el agua dificulta el acceso del oxígeno a los lugares sensibles, hidrata los iones metálicos, por lo que reduce su efectividad como catalizadores, forma puentes de hidrógeno que interfieren con la descomposición de los hidroperóxidos y facilita la difusión de moléculas antioxidantes (Priestley, 1986). Así mismo, la alteración de las propiedades físicas de las membranas durante la deshidratación, parece mediada también por la acción de radicales libres (Senaratna y col., 1985, 1987), y que finalmente resulta en la aparición de zonas de membrana en fase de gel debido a la pérdida de fosfolípidos.

La reactividad de los radicales libres hace muy difícil su detección y podría explicar también las divergencias existentes. Buchavarov y Gantcheff (1984) han indicado que hay una gran concentración de radicales libres en los ejes embrionarios de soja envejecidos natural y artificialmente, mientras que Priestley y col. (1985b) señalan que este incremento sólo se observa en las semillas artificialmente envejecidas, siendo las diferencias en estos niveles muy poco significativas en algunos casos (Priestley y col., 1980). Por su parte, Hepburn y col. (1986) han examinado el nivel de radicales libres en distintas especies procedentes de lotes comerciales como guisante, soja, judía, col y rábano, y no han observado una relación directa entre la viabilidad de las semillas y el contenido de radicales libres, que mayoritariamente se detecta en la testa de las semillas, lo que podría explicar la escasa influencia en la viabilidad de las mismas.

1.4.3.2. Alteraciones en la estructura de las proteínas y actividades enzimáticas

La estructura de las proteínas puede alterarse durante el envejecimiento, debido a procesos de desnaturalización, proteólisis, o a polimerizaciones o escisiones producidas por la interacción con productos de la peroxidación lipídica (Priestley, 1986). La oxidación de los grupos sulfhidrilo de los restos de cisteína puede ser un factor particularmente importante que puede alterar el funcionamiento de las proteínas.

Las actividades enzimáticas detectadas en las semillas también se encuentran afectadas por el envejecimiento. El almacenamiento prolongado de semillas de girasol a 65 °C provoca una disminución significativa de la actividad de las enzimas malato deshidrogenasa, tanto en la fracción soluble como en la mitocondrial (de Paula y col., 1993), glutation reductasa (de Paula, 1991) y leucín aminopeptidasa (Pérez Otaola, 1992), que fueron positivamente relacionadas con la pérdida de viabilidad de dichas semillas, por lo que su determinación se han utilizado como marcador de envejecimiento.

La determinación indirecta de la actividad deshidrogenásica de los tejidos mediante el empleo de distintos colorantes se ha empleado tradicionalmente como test de envejecimiento de semillas. Los reactivos como el cloruro de trifeniltetrazolium (véase apartado 1.6.3.) se reducen por la acción de las enzimas respiratorias, formándose un compuesto coloreado (formazano), que tiñe los tejidos dónde estas enzimas permanecen activas. Por el contrario, los tejidos incoloros indicarían la disminución o inexistencia de actividad deshidrogenásica. Sin embargo, Powell y Matthews (1981), utilizando semillas deterioradas de guisante, fueron capaces de detectar la actividad reductora sobre el tetrazolium mediante un aporte de succinato. Por lo tanto, la ausencia de tinción indicaría, en este caso, una ausencia de sustrato más que una alteración de la actividad enzimática. Del mismo modo, algunos autores (Priestley, 1986) han sugerido que un déficit de coenzimas (NAD⁺, NADP⁺) puede ser la causa de la disminución de la actividad de algunas enzimas en semillas deterioradas. Por otra parte, de Paula y col. (1991a)

detectaron una mayor formación de formazano en las semillas deterioradas por tratamiento térmico a 65 °C, indicando que la mayor facilidad de penetración y difusión del tetrazolium a través membranas dañadas por el tratamiento, resulta en una sobreestimación de la actividad deshidrogenásica.

Otros autores han detectado actividades enzimáticas incrementadas como consecuencia del envejecimiento. González-Juliá y col. (1982), observaron elevados niveles de proteinasas durante la germinación de semillas de pino artificialmente envejecidas (45 °C y humedad a saturación), mientras que Basavarajappa y col. (1991), observaron un incremento de las actividades de proteasas, amilasas y fosfolipasa A, en semillas artificialmente envejecidas de maíz. Ghosh y Chaudhuri (1984) detectaron una elevada actividad ribonucleásica en embriones de semilla de arroz con baja viabilidad debida a un almacenamiento prolongado en condiciones de elevada humedad relativa. Parece deducirse de estos estudios, que el incremento de las actividades enzimáticas sólo se ha observado en semillas envejecidas en las que se ha alcanzado un alto nivel de hidratación (Priestley, 1986).

1.4.3.3. Alteraciones metabólicas

1.4.3.3.1. Alteraciones en la respiración

El contenido de humedad de la semilla determina el inicio de la actividad mitocondrial, que se pone de manifiesto por un coeficiente respiratorio (relación molar entre el CO₂ producido y el O₂ consumido) próximo a 1 (Vertucci y Leopold, 1987). Sin embargo, durante la imbibición de semillas envejecidas se ha observado que la tasa de captación de oxígeno es baja (Dreyer y van de Venter, 1992) tanto en tejidos embrionarios como no embrionarios (Parrish y Leopold, 1977). En trigo, sin embargo, Anderson y Abdul-Baki (1971) hallaron que el consumo de oxígeno por parte del embrión disminuía como resultado del deterioro, mientras no se alteraba en el endospermo. Por otra parte,

la liberación del CO₂ es ocasional y sorprendentemente alta durante las primeras horas de imbibición en semillas ligeramente deterioradas, si bien la causa de este incremento todavía no se conoce. Woodstock y Taylorson (1981) sugieren que el desequilibrio entre la glicolisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos puede dar lugar a la acumulación de metabolitos como el piruvato, que posteriormente podrían ser sometidos a descarboxilación. Con independencia de la explicación de estos resultados, el hecho experimentalmente constatado es la existencia de un elevado cociente respiratorio característico de las semillas envejecidas durante las primeras horas de la imbibición (Woodstock y col., 1984).

En general, un descenso en el consumo de O₂ se asocia al deterioro de las mitocondrias. En semillas vigorosas, durante las primeras horas de imbibición, se produce la diferenciación mitocondrial, por síntesis de nuevos orgánulos o por modificación de los preexistentes (Attucci y col., 1991; Morohashi, 1986; Nakayama y col., 1980). Durante este período, la capacidad de la mitocondria para oxidar sustratos endógenos está, *in vitro*, incrementada y aumenta además, el acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación (Pradet, 1982). El consumo de oxígeno durante la imbibición de semillas envejecidas puede estar disminuido por dos factores:

- lesiones directas en la estructura de la mitocondria, inducidas por el envejecimiento, pero que pueden ser reparadas en etapas posteriores de la imbibición (Leopold y Musgrave, 1980),
- desarrollo mitocondrial lento que origina un menor número de orgánulos (Woodstock y col., 1984).

De Paula y col. (1991a), detectaron en semillas de girasol artificialmente envejecidas un marcado descenso de la actividad de la enzima malato deshidrogenasa, tanto en la fracción citosólica como mitocondrial, lo cual sugiere una alteración de las enzimas empleadas en el metabolismo respiratorio y que por tanto influirá en el desarrollo de la actividad mitocondrial durante la rehidratación.

Dreyer y van de Venter (1992), observaron que la disminución de la actividad mitocondrial durante la rehidratación de semillas envejecidas de maíz no se pone de manifiesto en condiciones favorables de temperatura (25 °C), pero se hace evidente a temperaturas sub-óptimas (13 °C), lo cual podría ser una de las causas de la mayor sensibilidad de las semillas envejecidas a las distintas condiciones de estrés ambiental.

La ruta de las pentosas fosfato es una vía metabólica de utilización de la glucosa que en semillas viables predomina durante las primeras horas de imbibición, hasta que la glicolísis se instaura como principal ruta catalítica. Kharlukhi y Agrawal (1984) observaron, sin embargo, que la ruta glicolítica y la vía de las pentosas fosfato en semillas envejecidas alcanzaban cotas similares de utilización de la glucosa.

Resultados de esta naturaleza sirven para poner de manifiesto que el envejecimiento produce desequilibrios metabólicos en las semillas imbibidas, aunque de todas formas hay que tener en cuenta que el deterioro no afecta de igual manera a todos los tejidos ni a todas las rutas metabólicas.

1.4.3.3.2. Alteraciones en el contenido y síntesis de ATP

Los niveles de ATP y la carga energética (relación entre el ATP y los niveles de ADP y AMP) tienden a ser muy bajos en las semillas secas, pero se incrementan de forma sustancial durante la imbibición. Algunos investigadores han sugerido que la fosforilación oxidativa se desarrolla con demasiada lentitud como para explicar esta súbita fluctuación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989). Por otra parte, Perl (1980) sugiere que el ATP se acumula rápidamente en las semillas hidratadas, por medio de la actuación de sistemas enzimáticos que utilizan AMP, fosfoenolpiruvato y fosfato inorgánico, aunque el grado de funcionalidad *in vivo* no está suficientemente claro. Así, Ching (1973), estudiando semillas de trébol en las primeras cuatro horas de imbibición, observó que el contenido de ATP variaba de 2,2 nmol en semillas totalmente viables a 0,02 nmol en semillas envejecidas.

La acumulación de otros nucleósidos trifosfato, asimismo, está disminuida durante la imbibición de semillas de bajo vigor, aunque no se ha estudiado específicamente en semillas envejecidas (Standard y col., 1983).

1.4.3.3.3. Alteraciones en ácidos nucleicos y síntesis proteica

La síntesis proteica que tiene lugar durante las primeras horas de la imbibición, está disminuida en semillas envejecidas (Anderson y Baker, 1983). Esta disminución puede estar parcialmente relacionada con la incapacidad para producir niveles adecuados de nucleósidos trifosfato, ATP y GTP fundamentalmente. Sin embargo, es evidente que el envejecimiento de semillas implica también deficiencias en los mecanismos responsables de la traslación del RNA mensajero (mRNA) hasta la proteína (Gidrol y col., 1990).

Durante las primeras etapas de la imbibición, el mRNA responsable de la síntesis de proteínas puede tener dos orígenes: el mRNA que permanece después de la desecación de la semilla y es activo durante la rehidratación (Spiegel y Marcus, 1975) y el mRNA de nueva formación que aparece a las pocas horas de la imbibición. Gidrol y col. (1990), en semillas de girasol, observaron que el envejecimiento acelerado induce alteraciones en la traslación de mRNA preexistente más que en la síntesis *de novo* de mRNA, mientras que en semilla de soja (Gidrol y col., 1988) las alteraciones derivan de la incapacidad para obtener mRNA de nueva síntesis.

Existen algunas evidencias que sugieren que parte del mRNA que perdura después de la desecación, se pierde durante períodos de almacenamiento muy prolongados. Es posible que este mRNA no sea esencial para la germinación, ya que normalmente es degradado durante las dos primeras horas de imbibición, incluso en semillas muy vigorosas (Smith y Bray, 1982). Se cree que su función es codificar polipéptidos que son importantes durante la maduración de las semillas, pero menos relevantes durante la germinación. En realidad, parece ser que la degradación de este tipo de mRNA, durante la rehidratación,

tiene lugar más lentamente en los embriones parcialmente deteriorados que en los vigorosos (Smith y Bray, 1984).

El mRNA de nueva formación puede faltar en las semillas envejecidas durante la fase de imbibición. Se piensa que el deterioro en las semillas origina una disminución de la síntesis de RNA que tiene lugar durante la hidratación (Fernández García de Castro y Martínez-Honduvilla, 1982; Gidrol y col., 1988) y que parece afectar a todos los tipos de RNA. Este descenso se relaciona parcialmente con una deficiencia general en los procesos biosintéticos y concretamente en la transcripción.

Se ha descrito asimismo, la degradación parcial de los ribosomas (Ghosh y Chaudhuri, 1984; Villiers, 1980) y la disminución del contenido en rRNA (Clarke y James, 1991) durante el almacenamiento prolongado, así como la modificación de las propiedades electroforéticas de las proteínas ribosomales, aunque el estudio de las características de sedimentación sugiere que los ribosomas son parcialmente funcionales incluso en las semillas severamente envejecidas.

Las lesiones más importantes inducidas por el envejecimiento están asociadas a los factores que intervienen en la unión del péptido al ribosoma, concretamente, el factor de elongación 1 (EF 1), cuya actividad disminuye paralelamente a la pérdida de capacidad de síntesis de proteínas (Dell'Aquila y col., 1978).

Los resultados señalados indican que todos los elementos del sistema de síntesis proteica sufren deficiencias en semillas envejecidas. El mRNA preexistente se pierde o es menos activo, disminuye la síntesis *de novo* de mRNA, la efectividad y la estructura del ribosoma están diferencialmente alteradas, y algunos de los factores responsables de la formación del péptido, están inactivados. A todo esto se añade la dificultad en el aporte de nucleósidos trifosfato, requeridos por el aparato biosintético. En suma, se produce una disminución en la capacidad de las semillas envejecidas para sintetizar proteínas.

Por otra parte, los cambios detectados en las moléculas de DNA durante el envejecimiento de las semillas son principalmente de carácter cualitativo, es decir, la cantidad de DNA no se altera, pero aparecen pequeños fragmentos de bajo peso molecular, lo cual dificulta el mantenimiento de su funcionalidad y limita la transcripción del RNA (Osborne, 1980; Priestley, 1986; Villiers, 1980). Asimismo, las causas de los defectos genéticos y las alteraciones cromosómicas asociadas con el envejecimiento se han atribuido al efecto de los radicales libres o de los productos de la peroxidación lipídica. Los radicales libres pueden producir alteraciones (oxidación, dimerización) en las bases del DNA, siendo la timina y la guanina las más afectadas; los peróxidos lipídicos pueden actuar causando escisiones en la doble cadena de DNA, lo que puede conducir a la rotura de cromosomas.

1.5. Mecanismos celulares de defensa frente al deterioro

En el apartado anterior hemos señalado las alteraciones que tienen lugar durante el envejecimiento de las semillas y la implicación de los radicales libres (orgánicos o especies activas de oxígeno) en los procesos de deterioro de carácter oxidativo que afectan tanto a la funcionalidad de las membranas, como a la estructura de macromoléculas, proteínas, lípidos y DNA. Sin embargo, la formación de radicales libres es un proceso que también tiene lugar durante el metabolismo celular. Por ello, las células han desarrollado mecanismos eficaces de defensa que previenen y/o eliminan la producción masiva de estos radicales. Así, durante las primeras etapas de la germinación, en las que se establece la respiración mitocondrial (Puntarulo y col., 1988, 1991) y la movilización de reservas, concretamente durante la β -oxidación de los ácidos grasos en semillas oleaginosas, se ha descrito la aparición de radicales libres por una reducción incompleta del oxígeno.

La respuesta celular frente a la acción de los radicales libres está mediada por sistemas enzimáticos específicos y sustancias con carácter antioxidante que impiden su propagación. Estas sustancias no actúan aisladamente, sino que están interrelacionadas para conseguir una mayor efectividad en la defensa celular.

Los sistemas antioxidantes se pueden clasificar según el radical sobre el que actúan (Tabla 3), o según la fracción donde ejercen su actividad (soluble o lipídica), pero, en general, se distingue entre antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

TABLA 3. Intermedios reactivos del oxígeno y sistemas antioxidantes

RADICALES Y ESPECIES DE OXIGENO ACTIVADO	ANTIOXIDANTES
SUPEROXIDO: $O_2^{\cdot -}$	SOD ACIDO ASCORBICO
PEROXIDO: H_2O_2	CATALASA PEROXIDASAS CICLO FOYER-HALLIWELL
HIDROXILO: $\cdot OH$	ACIDO ASCORBICO GLUTATION GLUCOSA MANITOL ETANOL
OXIGENO SINGLETE: $^1\Delta gO_2$	β -CAROTENOS α -TOCOFEROL ACIDO ASCÓRBICO

1.5.1. Antioxidantes no enzimáticos

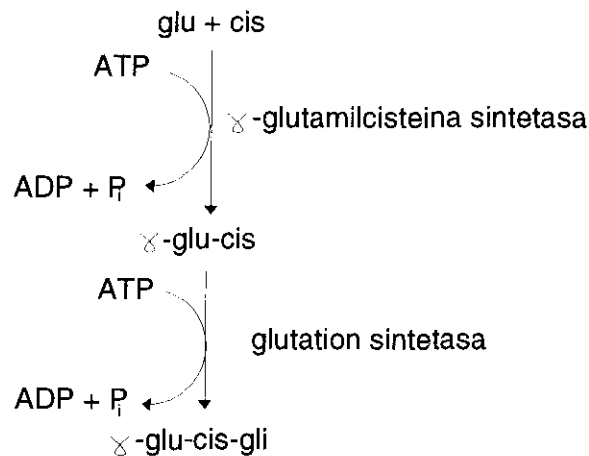
Existe un gran número de sustancias de las que se describe una actividad antioxidante (Tabla 4) y que están presentes en los tejidos vegetales. Sin embargo, en muchos casos las concentraciones necesarias para que esta capacidad se manifieste no se ajustan a las presentes en los tejidos. Otras veces, la función antioxidante se ha demostrado *in vitro* pero no *in vivo*. Por ello, nos limitaremos a detallar las características de los antioxidantes solubles cuya actividad *in vivo* está mejor establecida y que intervienen activamente en la protección de los lípidos frente a la peroxidación.

TABLA 4. Sustancias con actividad antioxidante en plantas superiores (Larson, 1988)

NATURALEZA QUIMICA	COMPUESTOS	
COMPUESTOS FENOLICOS	TOCOFEROLES	
	MIRICETINA	AC. CAFFEICO
	ROBINETINA	AC. CLOROGENICO
	QUERCITINA	AC. FERULICO
	KAEMPFEROL	ROSMARIDIFENOL
	BUTEINA	UBIQUINOL
COMPUESTOS NITROGENADOS	CAFEINA	
	ESPERMINA	
	TRIMETILAMINA	
	CISTEINA	
	METIONINA	
	TREONINA	
COMPUESTOS TERPENICOS	β -CAROTENO	
OTROS COMPUESTOS	ACIDO ASCORBICO	
	MANITOL	
	ETANOL	
	GLUCOSA	

1.5.1.1. Glutation

El glutatión (GSH) es un tripeptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina (γ -glutamil-cisteinil-glicina), que constituye el principal tiol no proteico celular. Su biosíntesis (Rennenberg, 1982) tiene lugar por la acción sucesiva de las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (EC 6.3.2.2) y glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3) en dos reacciones dependientes de ATP:



El glutatión se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos vegetales y desempeña numerosas funciones biológicas (Smith y col., 1990). Se ha descrito su actividad en el transporte y almacenamiento de azufre (Bielawski y Joy, 1986a; Schmidt y Jäger, 1992), así como en la destoxificación de xenobióticos (Fuerst y col., 1993) y contaminantes ambientales (Price y col., 1990; Wingsle y Hällgren, 1993) mediada por la glutatión-S-transferasa. Sin embargo, es la capacidad antioxidante la característica principal de este compuesto y la que le permite desarrollar un papel fundamental en la defensa celular frente a la acción de radicales libres.

La actividad antioxidante del glutatión reside en la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína que presenta una disposición espacial menos susceptible al ataque por sustancias oxidantes en comparación con otros compuestos con grupos sulfhidrilo (Alscher,

1989). Esta acción antioxidante tiene lugar por medio de reacciones enzimáticas (véase apartado 1.5.2.3) o no enzimáticas en las que puede actuar directamente sobre los radicales libres (orgánicos o especies activas de oxígeno). El paso inicial es la formación del radical tiil (GS·) mediante la cesión de un electrón del radical al glutation:



Dos moléculas del radical tiil reaccionan entre sí formando un puente disulfuro que da lugar a la aparición de glutation oxidado (GSSG). De esta forma el glutation es capaz de romper la cadena de propagación de los radicales libres y evitar los procesos de peroxidación lipídica responsables del envejecimiento celular.

Paradójicamente, el GSSG es una sustancia altamente tóxica para las células ya que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Dhindsa, 1991; Fahey y col., 1980) por interacción con uno de los factores de iniciación de la traslación (Kan y col., 1988), razón por la cual las células mantienen siempre una relación GSSG/GSH enormemente baja debido a la actividad de la enzima glutation reductasa (véase apartado 1.5.2.4.3.). Hasta tal punto esto es así, que la medida de dicha tasa es uno de los estimadores más fiables del grado de estrés oxidativo tisular.

En condiciones de estrés oxidativo (calor, estrés hídrico, exposición a contaminantes ambientales), se ha observado que las células responden aumentando los niveles de GSH como resultado de una estimulación de su biosíntesis (Albrecht y Wiedenroth, 1994; Nieto-Sotelo y Ho, 1986; Smith y col., 1985) lo que permite la adaptación de las plantas al estrés ambiental. Los resultados obtenidos por Smith (1985) en plantas tratadas con aminotriazol (inhibidor específico de la catalasa) permiten suponer que el peróxido de hidrógeno generado actuaría aumentando la tasa GSSG/GSH y el descenso de los niveles de glutation en su forma reducida, eliminándose así la inhibición

por retroalimentación (*feedback*) que este compuesto establece sobre las enzimas de su ruta biosintética. Sin embargo, May y Leaver (1993) consideran que las señales que ligan la formación de peróxido de hidrógeno con el aumento observado en los niveles de GSH son de naturaleza mucho más compleja, pero en cualquier caso se demuestra que la capacidad de las células para adaptarse al estrés ambiental viene, en gran medida, determinada por la capacidad de síntesis de GSH y su mantenimiento en estado reducido.

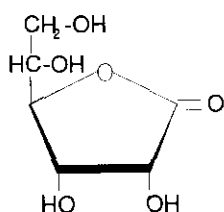
Recientemente (Wingate y col., 1988) se ha demostrado que el glutatión puede actuar favoreciendo la transcripción de los genes que codifican las enzimas que intervienen en la biosíntesis de lignina y fitoalexina. Sólo el glutatión reducido es capaz de actuar en este sentido, lo cual permite suponer que el aumento de glutatión como consecuencia del estímulo oxidativo, no sólo protegería a las células frente a la generación de radicales libres, sino que podría actuar como señal para desencadenar otra serie de respuestas que posibilitan la tolerancia al estrés (Alscher, 1989).

Las semillas tienen, respecto a su contenido en glutatión, ciertas características que las diferencian de otros tejidos presentes en las plantas superiores. Estas diferencias se manifiestan en la existencia de un mayor contenido total de glutatión y en que un alto porcentaje de este compuesto se encuentra en forma oxidada (Kranner y Grill, 1993; Fahey y col., 1980; Spragg y Yemm, 1959). Debido precisamente a este alto contenido en GSSG y a su acción inhibitoria sobre la síntesis de proteínas, se ha sugerido que el glutatión puede desempeñar un papel importante en el control de la síntesis proteica de las semillas en estado de latencia y dormición (Fahey y col., 1980). Por otro lado, Butt y Ohlrogge (1991) han sugerido que la formación de disulfuros mixtos entre glutatión y la proteína transportadora de acilos que se produce durante el proceso de deshidratación de las semillas podría actuar como un mecanismo protector de esta enzima frente a la oxidación. De todos estos estudios se deduce que el glutatión desempeña una función esencial en las semillas, ya que en su forma reducida (GSH) actúa como antioxidante evitando la acción perjudicial de los radicales libres y en su forma oxidada (GSSG) sirve como mecanismo de control de la síntesis proteica durante la dormición.

Finalmente, y dentro de la respuesta celular frente a distintos agentes ambientales mediada por glutatión, se encuentra la formación de polímeros de γ -glu-cis-gli. Son las llamadas fitoquelatinas (Rauser, 1990; Robinson y Jackson, 1986) cuya función principal consiste en formar complejos con metales tóxicos, fundamentalmente cadmio, para evitar así su efecto perjudicial (Rauser y col., 1991), aunque también se les atribuye un papel importante en la homeostasis de metales esenciales como Cu o Zn.

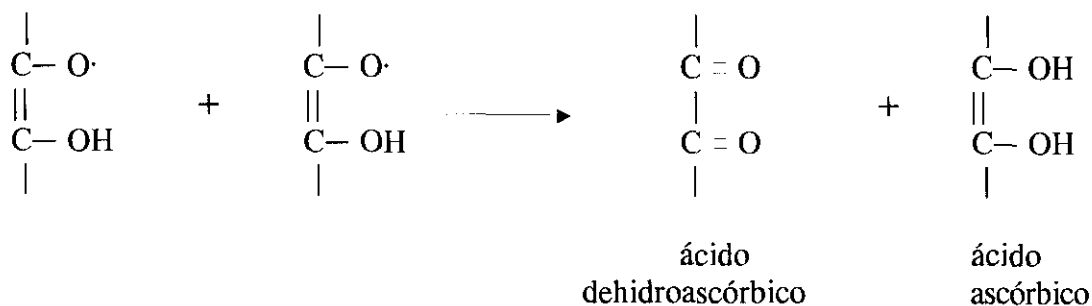
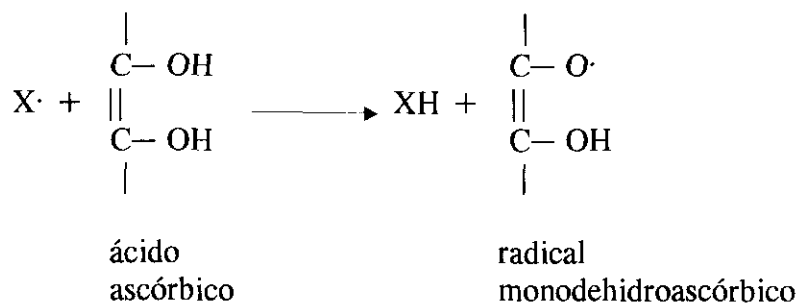
1.5.1.2. Acido ascórbico

Durante la germinación de las semillas se produce una síntesis rápida de ácido ascórbico (treo-hex-2-enono-1,4-lactona) a partir de la glucosa. Además se ha observado que existe una relación directa, durante todas las etapas de crecimiento, entre el aporte de carbohidratos y la cantidad de ascorbato formado (Gander, 1982). Los niveles de ascórbico en las células vegetales dependen por tanto de factores nutricionales, aunque también contribuyen en gran medida las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la planta. Así, Dalton y col. (1991) detectaron un incremento en la concentración de ácido ascórbico en las raíces de soja sometidas a una elevada presión parcial de oxígeno; Walker y McKersie (1993) observaron, en hojas de tomate, un incremento en la cantidad de ácido ascórbico y otros antioxidantes como respuesta al estrés por bajas temperaturas; Buckland y col. (1991) detectaron una disminución de los niveles de ascórbico en hojas de *Cochlearia atlantica* en situaciones de sequía y Borraccino y col. (1994) relacionaron los procesos de senescencia de las hojas de avena con una menor disponibilidad de ácido ascórbico. Por otra parte, Arrigoni y col. (1992) han descrito la evolución de los niveles de ácido ascórbico durante el período de formación de las semillas de judía, observando que el equipo enzimático para la biosíntesis de ascórbico se adquiere antes del inicio de la desecación para permitir un rápido incremento de este compuesto al comienzo de la germinación.



Acido ascorbico

En los sistemas biológicos, el ácido ascórbico desempeña un papel fundamental como antioxidante. Puede actuar sobre todas las especies activas de oxígeno (Tabla 3), reduce los radicales tñl y además interviene activamente impidiendo la propagación de la peroxidación lipídica por medio de la eliminación de los radicales peróxido (Larson, 1988). Su mecanismo de acción antioxidante se basa en la formación de un radical transitorio (radical monodehidroascórbico) que sufre dismutación para dar dos sustancias no radicales (dehidroascórbico y ascórbico):



Algunos autores (Finckh y Kurnert, 1985; Liebler y col., 1986) han demostrado la acción sinérgica entre el ácido ascórbico y el α -tocoferol (principal antioxidante liposoluble). Estos autores observaron que la extensión del daño peroxidativo inducido por herbicidas en hojas de distintas especies de plantas superiores depende de la concentración relativa de estas dos sustancias, siendo la relación 15:1 (ascórbico/ α -tocoferol) la que presenta mayor capacidad antioxidante.

Para reducir el deterioro de las semillas durante el almacenamiento se ha estudiado el efecto de distintas sustancias antioxidantes (glutathione, BHT, ácido ascórbico, α -tocoferol), ya sea como medida preventiva del deterioro (es decir, sumergiendo durante un tiempo las semillas en soluciones de estas sustancias y posterior secado y almacenamiento), ya sea como medio para invigorar las semillas, es decir, para revertir los efectos del deterioro. Los resultados obtenidos al tratar las semillas con estas sustancias son variables, pero en general se han descrito efectos beneficiosos en la longevidad de las semillas, sobre todo en el caso del α -tocoferol y del glutathione (Gorecki y Harman, 1987).

1.5.2. Antioxidantes enzimáticos

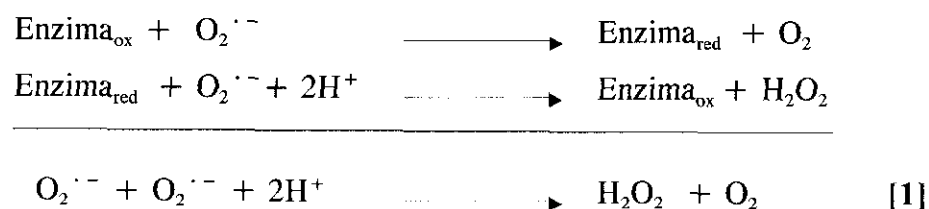
Los sistemas antioxidantes enzimáticos constituyen un grupo variado de enzimas con la propiedad común de ser capaces de eliminar, suprimir o neutralizar a los radicales libres y a las especies activas de oxígeno. La Tabla 5 muestra, de forma resumida, las distintas enzimas que intervienen en la defensa celular frente a la acción perjudicial de estas moléculas. En este epígrafe desarrollaremos con mayor amplitud las características de las enzimas relacionadas con nuestro trabajo experimental.

TABLA 5. Sistemas enzimáticos con actividad antioxidante en plantas superiores (Scandalios, 1993)

LOCALIZACIÓN SUCELULAR	ESPECIE ACTIVA	SISTEMA ENZIMÁTICO	PRODUCTOS DE REACCIÓN
Citosol	Superóxido H ₂ O ₂	SOD Catalasa Peroxidasas	H ₂ O ₂ H ₂ O, O ₂ H ₂ O
Mitocondria	Superóxido H ₂ O ₂	SOD Catalasa Peroxidasas	H ₂ O ₂ H ₂ O, O ₂ H ₂ O
Cloroplasto	Superóxido H ₂ O ₂	SOD Ascorbato peroxidasa	H ₂ O ₂ ác. dehidroascórbico GSH NADP ⁺
Glioxisoma	H ₂ O ₂	Catalasa	H ₂ O, O ₂
Peroxisoma	H ₂ O ₂	Catalasa	H ₂ O, O ₂

1.5.2.1. Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), originalmente descubierta por McCord y Fridovich en 1969, es una metaloproteína que cataliza la dismutación del radical superóxido para formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, según la reacción [1] en la que es necesario una oxidación y posterior reducción del metal de transición que acompaña a la enzima.



Se conocen tres familias principales de SOD que difieren en el metal constituyente del grupo prostético: cobre/zinc (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD) o hierro (Fe-SOD). Estos tres grupos de enzimas, con gran variedad de isoenzimas, presentan diferente localización subcelular y pueden diferenciarse experimentalmente por su sensibilidad al cianuro (CN^-) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tabla 6). La enzima Cu/Zn-SOD se inhibe de forma reversible por la acción del CN^- y de forma irreversible por H_2O_2 , debido a la acción de estos compuestos sobre el Cu. Las Fe-SOD y Mn-SOD, en cambio, sólo son inhibidas por H_2O_2 (irreversiblemente), y no se afectan por la presencia de CN^- (Bowler y col., 1992).

Hasta el momento, los orígenes evolutivos de las distintas isoenzimas SOD no están completamente claros. Sin embargo, el estudio de la secuencia de aminoácidos permite suponer que los tres tipos de isoenzimas provienen sólo de dos familias filogenéticas, la formada por la Cu/Zn-SOD y la que incluye a las Fe-SOD y Mn-SOD, ya que éstas últimas comparten un gran porcentaje de la secuencia aminoacídica (Hassan y Scandalios, 1990; Scandalios, 1993).

TABLA 6. Características diferenciales de las tres familias de superóxido dismutasas presentes en tejidos vegetales

SUPERÓXIDO DISMUTASAS		
COFACTOR METALICO	INHIBICION	LOCALIZACION SUBCELULAR
Cu/Zn	H_2O_2 KCN	Citosol Cloroplastos (estroma) Glioxisomas
Mn	-	Mitocondrias (matriz) Glioxisomas Peroxisomas
Fe	H_2O_2	Cloroplastos (estroma)

El papel fisiológico de la SOD ha sido objeto de numerosas investigaciones, en las que se le atribuye un efecto protector frente al daño oxidativo producido por distintas condiciones de estrés ambiental. La tolerancia a la desecación en plantas superiores (Burke y Hatfield., 1987; Zhang y Kirkham, 1994) y musgos (Dhindsa y Matowe, 1981; Seel y col., 1992) se ha relacionado con la existencia de elevados niveles de antioxidantes y con una mayor actividad SOD, capaces de evitar la peroxidación lipídica y las alteraciones de membrana (Leprince y col., 1990) inducidas por la deshidratación. La actividad SOD está también relacionada con la sensibilidad de los tejidos vegetales a las bajas temperaturas (Jahnke y col., 1991), a la anoxia (Monk y col., 1989) y a la invasión por patógenos (Aver'yanov y col., 1993; Bowler y col., 1992). La resistencia a la acción de ciertos patógenos se caracteriza por el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad que origina la muerte de las células próximas al lugar de penetración del patógeno. Para llevar a cabo esta respuesta, la célula mantiene muy bajos niveles de actividad SOD, lo que permite que el radical superóxido y las demás especies activas del oxígeno desencadenen los procesos degenerativos que desembocan en la muerte celular (Fig. 4).

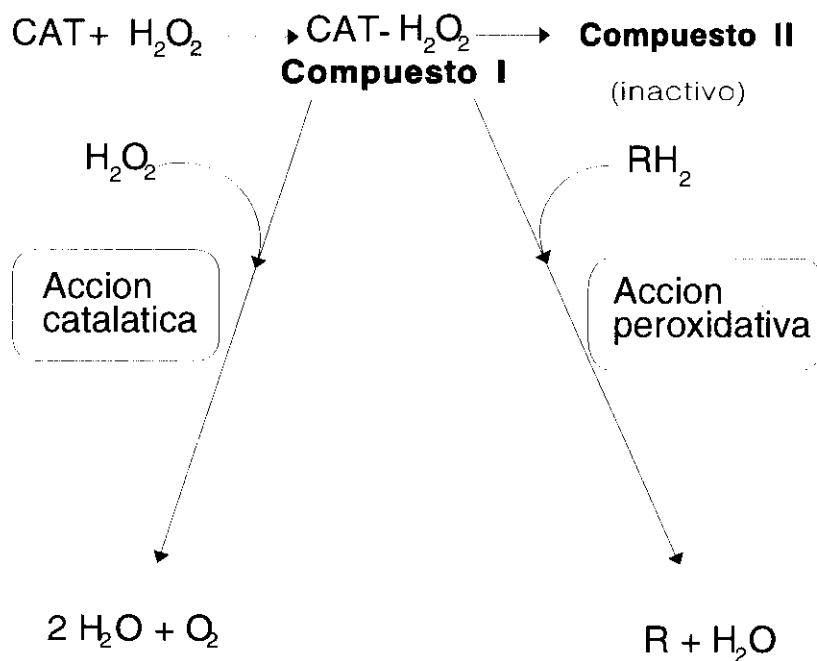
El efecto perjudicial de ciertos contaminantes ambientales como el ozono (O_3) o el dióxido de azufre (SO_2) está mediado por la formación del radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo que degradan las membranas (Navari-Izzo y col., 1992) e inician procesos de peroxidación, y en consecuencia, la sensibilidad de los tejidos vegetales a estas sustancias dependerá en gran medida de su capacidad para activar los mecanismos de eliminación de radicales libres (Badiani y col., 1993; Hausladen y col., 1990; Wingsle y Hällgren, 1993).

Los procesos de senescencia y envejecimiento también se han relacionado con la capacidad antioxidante de la SOD. Dhindsa y col. (1981) sugieren que la senescencia en la hojas de *Nicotiana tabacum* se inicia por alteraciones en los lípidos de membrana favorecidas por una actividad SOD disminuida. Asimismo, distintos autores (Puntarulo y Boveris, 1990; Stewart y Bewley, 1980) han observado que la síntesis/activación de la SOD tiene lugar durante las primeras horas de imbibición de semillas viables de soja,

mientras que en las semillas envejecidas no se detecta, lo que favorece el incremento de la peroxidación lipídica.

1.5.2.2. Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima tetramérica cuyo centro activo está formado por un grupo hemo en cada subunidad. Su función principal consiste en la eliminación del peróxido de hidrógeno, para lo cual puede presentar dos actividades: catalítica y peroxidativa, con características cinéticas completamente distintas (Elstner, 1987). Ambas actividades requieren la formación de un compuesto intermedio (Compuesto I) entre la enzima y una molécula de peróxido de hidrógeno unidos a través del hierro del grupo hemo, que pasa a tener estado de oxidación +5.



El Compuesto I, muy activo como oxidante, puede reaccionar con otra molécula de H₂O₂ (actividad catalítica) liberando oxígeno molecular o bien puede formar el

Compuesto II, inactivo. Así mismo, el Compuesto I puede actuar sobre otros compuestos donadores de electrones (actividad peroxidativa) formando los respectivos productos de oxidación.

Se han descrito tres isoenzimas de la catalasa, con distinta localización subcelular. CAT-1 y CAT-2 se han detectado en peroxisomas, glioxisomas y citosol y CAT-3 en mitocondrias y citosol (Gianinetti y col., 1993). Sin embargo, son los glioxisomas y peroxisomas los orgánulos donde esta enzima se encuentra mayoritariamente, ya que su actividad en los demás orgánulos es muy baja (Thompson y col., 1987) o no existe, como en cloroplastos donde la eliminación del peróxido de hidrógeno es llevada a cabo por las enzimas del ciclo del ascorbato-glutation (véase apartado 1.5.2.3.).

La catalasa actúa fundamentalmente sobre el peróxido de hidrógeno producido en la fotorrespiración (peroxisomas) y en la β -oxidación de los ácidos grasos (glioxisomas), pero a pesar de su restringida localización, esta enzima desempeña un importante papel en la defensa celular frente al estrés oxidativo, ya que el peróxido de hidrógeno es una molécula que difunde fácilmente a través de las membranas (Bowler y col., 1992) por lo que puede ser eliminado en zonas distantes de su lugar de formación.

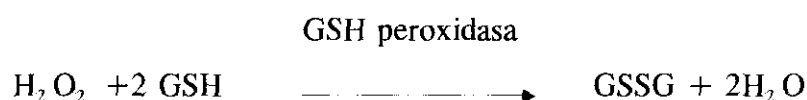
Los estudios realizados en semilla de soja (Puntarulo y col., 1988, 1991) demuestran que durante las primeras fases de la germinación, el peróxido de hidrógeno formado se elimina mayoritariamente por la acción de la catalasa cuya actividad es considerablemente mayor que la de otras enzimas que pueden contribuir a su eliminación. Otros autores (Cakmak y col., 1993; Klapheck y col., 1990) señalan, en cambio, que las enzimas del ciclo de Foyer-Halliwell participan en la eliminación del peróxido de hidrógeno durante las primeras horas de imbibición, aunque su actuación depende en gran medida de la disponibilidad de NADPH.

Se ha demostrado que la actividad de la catalasa disminuye durante los procesos de senescencia (Dhindsa y col., 1981, Thompson y col., 1987); un descenso en su actividad

se ha relacionado también con un aumento de la peroxidación lipídica inducida por aluminio (Cakmak y Horst, 1991), mientras que el mantenimiento de altos niveles de actividad de esta enzima (en coordinación con los demás sistemas antioxidantes) permite la adaptación de las células vegetales a distintas situaciones de estrés (Kumar y Knowles, 1993; Mishra y col., 1993; Spychalla y Desborough, 1990).

1.5.2.3. Enzimas que participan en el ciclo de detoxificación del peróxido de hidrógeno (ciclo de ascorbato-glutation)

La eliminación del peróxido de hidrógeno por la catalasa tiene lugar en glioxisomas y peroxisomas (véase apartado 1.5.2.2.) ya que su actividad es muy baja o no detectable en citosol, mitocondrias y cloroplastos. En las células animales, la detoxificación del peróxido de hidrógeno (y de otros peróxidos orgánicos) en el citosol y la mitocondria está catalizada por una enzima selenio-dependiente con actividad glutacion (GSH) peroxidasa (EC 1.11.1.9):



La existencia de esta enzima en plantas superiores es discutible, ya que, aunque ciertos autores han detectado su actividad (Drotar y col., 1985; Puntarulo y col., 1991; Yokota y col., 1988), no ha sido posible, hasta el momento, el aislamiento de la enzima.

En células vegetales, la detoxificación del peróxido de hidrógeno mediada por glutacion tiene lugar mediante un mecanismo alternativo que opera tanto en cloroplastos, donde fue originalmente descubierto por Foyer y Halliwell (1976) como en el citosol (Alscher, 1989; Bielawski y Joy, 1986b; Dalton y col., 1993). Este mecanismo antioxidante, llamado ciclo de Foyer-Halliwell, ciclo del ácido ascórbico o ciclo del ascorbato-glutation, implica sucesivas oxidaciones/reducciones del glutacion, ácido

ascórbico y NADPH en las que intervienen cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa, (EC 1.11.1.11), monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1) y glutathion reductasa (EC 1.6.4.2).

El ciclo (Fig. 6) se inicia con la reducción del peróxido de hidrógeno a agua por la acción de la ascorbato peroxidasa (Apo_x), formándose monodehidroascorbato (MD), que espontáneamente o por acción de la monodehidroascorbato reductasa (MD_{red}) produce dehidroascorbato (DH) (forma oxidada del ascorbato). La regeneración del ascorbato reducido (sustrato de la ascorbato peroxidasa) puede tener lugar de forma enzimática (dehidroascorbato reductasa, DH_{red}) o no enzimática, pero siempre mediada por glutathion que pasa a su forma oxidada. La posterior reducción del glutathion es catalizada por la glutathion reductasa (GSSG_{red}) en una reacción dependiente de NADPH.

La efectividad de esta ruta antioxidante ha sido relacionada con la capacidad de adaptación de las hojas (Gilham y Dodge, 1986, 1987; Jahnke y col., 1991; Walker y McKersie, 1993) y callos (Kuroda y col., 1991) a las variaciones ambientales, con una menor producción de plántulas anormales en el género *Dasypyrum* (de Gara, 1991), con la adaptación a la atmósfera de las plántulas sumergidas de arroz (Ushimaru y col., 1992) y con la resistencia de las hojas a distintos contaminantes ambientales (Buckland y col., 1991; Melhorn, 1990; Ranieri y col., 1993) y, en general, con la capacidad de los tejidos vegetales para adaptarse a distintas situaciones de estrés (Pastori y Trippi, 1992; Smith y col., 1989). Recientemente se ha observado que el ciclo opera también en semillas. Las enzimas de esta ruta antioxidante se han conseguido aislar de la fracción citosólica del endospermo de semillas de ricino (Klapheck y col., 1990) y de semillas de trigo (Cakmak y col., 1993), donde, sin embargo, no se ha encontrado actividad glutathion peroxidasa.

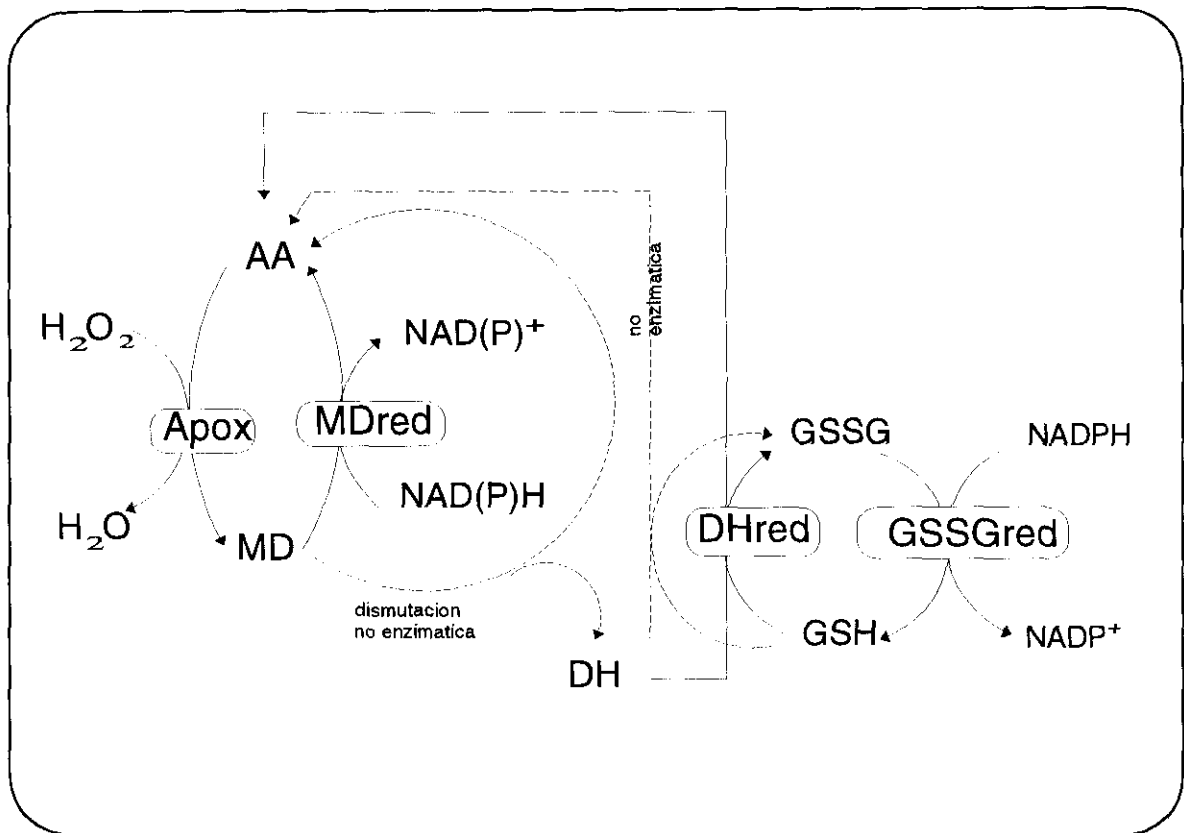


Figura 6. Ciclo de detoxificación del peróxido de hidrógeno (ciclo ascorbato-glutation) descrito por Foyer y Halliwell (1976).

1.5.2.3.1. *Ascorbato peroxidasa*

Las peroxidasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de distintas sustancias (donadores de electrones) por acción del peróxido de hidrógeno o de hidroperóxidos orgánicos.



Respecto a sus funciones, las peroxidasas se dividen en dos grupos: a) aquellas en las que el producto de oxidación desempeña un papel fisiológico (son las denominadas guayacol peroxidasas) y b) peroxidasas cuya función es la eliminación del peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos, utilizando para ello distintas sustancias como donadores de electrones (glutathion en células animales, citocromo c en levaduras y NADH en procariontes) lo que parece sugerir una distribución filogenética. En los tejidos vegetales el ácido ascórbico es el principal donador de electrones para este tipo de peroxidasas.

La peroxidasa del ascorbato es una hemoproteína que presenta dos isoenzimas (Apox I y Apox II) con ciertas características diferenciales (Asada, 1992; Thomsen y col., 1992). La Apox I se localiza en cloroplastos, presenta una gran especificidad por el ascórbico y se inactiva rápidamente en su ausencia. La Apox II se encuentra en citosol y es la isoforma mayoritaria en tejidos no fotosintéticos, tiene menor especificidad por el ascórbico (Dalton y col., 1987; Elia y col., 1992; Koshiba, 1993) ya que puede utilizar otros donadores de electrones. La afinidad de estas enzimas por el peróxido de hidrógeno es muy alta (superior a de la catalasa) por lo que son activas incluso cuando la concentración de H_2O_2 es muy baja.

Ambas isoenzimas son muy sensibles a la inactivación por tioles en presencia de peróxido de hidrógeno (Chen y Asada, 1992). Las Apox pueden catalizar la oxidación de los tioles por acción del peróxido de hidrógeno, formándose el radical tión que reacciona con el grupo hemo, inactivándolo. Sin embargo, su afinidad por el ácido ascórbico es

mayor que por los tioles y de esta forma, siempre que se mantengan niveles adecuados de este compuesto, la enzima está protegida de la inactivación por grupos tiólicos, muy abundantes tanto en el citosol como en los cloroplastos. Se deduce, por tanto, la importancia del sistema regenerador del ácido ascórbico que mantiene los niveles adecuados de este compuesto para que sea utilizado tanto como sustrato en la eliminación del peróxido de hidrógeno como para evitar la inactivación de la ascorbato peroxidasa.

1.5.2.3.2. Monodehidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa

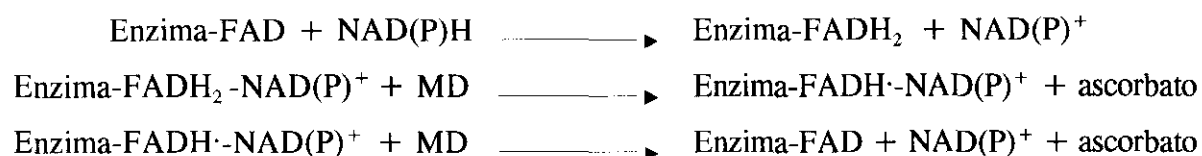
Las enzimas MDred y DHred son esenciales para el mantenimiento de los niveles de ácido ascórbico que garantizan el funcionamiento del sistema detoxificador del peróxido de hidrógeno. Ambas enzimas se han detectado tanto en el citosol como en los cloroplastos de las plantas superiores y, al menos la MDred, se ha observado también en las mitocondrias y los glioxisomas (Bowditch y Donaldson, 1990; Dalton y col., 1993).

El monodehidroascorbato (MD) es un radical que se origina por la oxidación univalente del ácido ascórbico en procesos no enzimáticos (por reacción directa con O_2^- ó $\cdot OH$; por reacción con radicales lipídicos o por autooxidación catalizada por metales) o debido a la acción de ciertas enzimas, como la ascorbato oxidasa, aunque fundamentalmente se forma como producto de reacción de la ascorbato peroxidasa (Arrigoni y col., 1981). El MD puede sufrir una dismutación espontánea que origina dehidroascorbato (DH) y ascorbato (Bielski y col., 1981). La regeneración del ácido ascórbico se puede realizar a partir de MD, por medio de la MDred, o a partir de DH en cuyo caso actúa la DHred.

La reductasa del MD es una flavoproteína que puede utilizar como donadores de electrones tanto NADH como NADPH (Borraccino y col., 1989; Dalton y col., 1992) y es la primera enzima cuyo sustrato aceptor de electrones es un radical (Hossain y Asada, 1985). Se le atribuyen funciones de conexión entre el metabolismo de los glioxisomas y

la respiración mitocondrial (Bowditch y Donaldson, 1990) y también se ha relacionado con el control de la lignificación de paredes celulares (Dalton y col., 1993), pero su función se ha estudiado fundamentalmente en relación con el metabolismo del ácido ascórbico y la eliminación del peróxido de hidrógeno.

El mecanismo de acción se inicia cuando la Enzima-FAD es reducida por NAD(P)H, formándose el complejo de transferencia de carga Enzima-FADH₂-NAD(P)⁺, que posteriormente dona electrones al MD en dos reacciones sucesivas en las que se transfiere un electrón:



El MD en ausencia de MDred puede formar ascorbato y DH como productos de su dismutación; este compuesto puede reducirse de nuevo a ascorbato en presencia de glutatión, de forma no enzimática cuando el pH es próximo a 7 o por acción de la DH red (Dipierro y Borraccino, 1991; Foyer y Halliwell, 1977):



Los estudios realizados en semillas de judía (Arrigoni y col., 1992) y en tubérculos de patata (Borraccino y col., 1986) muestran la interrelación entre estas dos enzimas, que compiten por el sustrato. Si existe una actividad elevada de MDred, disminuye mucho la cantidad de MD que puede sufrir dismutación y consecuentemente la cantidad de DH del medio. Por el contrario, si la actividad MDred es baja, la mayoría del MD pasa a formar DH lo que permite la actuación de la DHred. Por lo tanto, para el correcto funcionamiento del ciclo del ascorbato/glutatión no es necesaria la coexistencia de ambas enzimas.

1.5.2.3.3. *Glutation reductasa*

La enzima GSSGred es una flavoproteína que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a expensas de la oxidación de su grupo prostético NADPH, según la reacción:



Su función consiste en mantener una adecuada relación GSH/GSSG para permitir el desarrollo de la actividad antioxidante del glutatión, que además es necesario para la eliminación enzimática del peróxido de hidrógeno en el ciclo del ascorbato/glutatión.

La GSSGred ha sido detectada y purificada en una gran variedad de tejidos vegetales como acículas de pino (Anderson y col., 1990; Wingsle, 1989), plántulas y raíces de guisante (Bielawsky y Joy, 1986; Madamanchi y col., 1992), embriones de arroz (Ida y Morita, 1971), cotiledones de mostaza (Drumm-Herrel y col., 1989) donde se han aislado diferentes isoenzimas localizadas tanto en el citosol como en los cloroplastos. La afinidad por el GSSG y el NADPH es superior (presentan menores K_m) en las isoenzimas localizadas en los cloroplastos frente a la que se observa en las formas citosólicas (Anderson y col., 1990).

El centro activo de la enzima está formado por FAD y por un puente disulfuro que puede ser reducido por incubación con NADPH (Wingsle, 1989) provocando la inactivación de la enzima. El GSSG, por el contrario puede restaurar el puente disulfuro del centro activo, y protege a la enzima frente a los reactivos de los grupos -SH; sin embargo, se ha observado que la isoenzima presente en cloroplastos es menos sensible a la inhibición por NADPH (Connell y Mullet, 1986), probablemente debido a que la concentración de NADPH en cloroplastos es, en condiciones normales, bastante elevada.

Por otra parte, se ha descrito que esta enzima desempeña un papel fundamental en la defensa celular frente al estrés oxidativo (Edwards y col., 1994; Pastori y Trippi, 1992), ya que su actividad se incrementa o modifica en respuesta a la acción de herbicidas (Schmidt y Kurnet, 1986) y altas concentraciones de oxígeno (Foster y Hess, 1980, 1982), así como frente al estrés hídrico (Burke y Hatfield, 1987; Gamble y Burke, 1984; Sgherri y col., 1994) y bajas temperaturas (Esterbauer y Grill, 1978; Smith y col., 1989), aunque los cambios en la cantidad total de GSSGred parecen ser menos significativos que los que se producen en las diferentes isoenzimas (Foyer y col., 1991).

1.6. Métodos para la determinación de la viabilidad y vigor de las semillas

El valor de las semillas como medida de su calidad o bondad viene determinado por las características de viabilidad y vigor de las mismas. La velocidad y uniformidad de la germinación de semillas y del crecimiento de las plántulas y la velocidad y uniformidad de la emergencia de las plántulas y de su crecimiento en el campo, así como la capacidad germinativa de las semillas bajo un amplio rango de condiciones ambientales constituyen un valor estimativo de las semillas para siembra.

La consecuencia de todas las alteraciones fisiológicas y bioquímicas señaladas en el apartado 1.4.3. es la pérdida de la viabilidad y vigor de las semillas y, por tanto, el deterioro o envejecimiento de las mismas. Estos cambios ocasionan la aparición de una serie de síntomas o características que pueden servir de base para la determinación de la pérdida de viabilidad. Por otra parte, conviene señalar que la mala conservación de las semillas puede producir la denominada dormición secundaria, lo que puede dar lugar a falsos resultados en los ensayos de viabilidad y vigor.

De cualquier modo, y como norma general, las pruebas de viabilidad deben ser capaces de estimar de una forma adecuada, y a ser posible rápida, estos cambios en los materiales biológicos a ensayar. Sin embargo, los ensayos de viabilidad y vigor de semillas no pueden predecir el porcentaje de plántulas que emergerán en el campo, pero sí pueden indicar el comportamiento de las semillas en condiciones sub o supraóptimas. Esta característica se utiliza para la comparación de distintos lotes de semillas y sirve para identificar aquellos lotes que presentan máximos niveles de tolerancia y adaptabilidad a las condiciones ambientales, pudiéndose utilizar alternativamente para identificar lotes de semillas con emergencia rápida y uniforme.

1.6.1. Ensayos de germinación

El objetivo final de un ensayo de germinación es el aportar información sobre el valor de las semillas que van a ser destinadas a la siembra en el campo y, por otro lado, comparar la capacidad germinativa entre distintos lotes. Sin embargo, el control de las condiciones en los terrenos de experimentación generalmente no es satisfactorio, ya que los resultados no pueden repetirse en las mismas condiciones. Por ello, se emplea la experimentación en el laboratorio, puesto que las condiciones se pueden controlar e incluso pueden ser óptimas, con lo que la germinación para la mayoría de las especies se realiza de forma rápida y completa. Además si las condiciones están normalizadas se permite una reproductividad, que disminuye las variaciones al utilizar diferentes lotes de semillas.

Precisamente la necesidad de una uniformidad en los resultados ha dado lugar a la aprobación de diversas recomendaciones señaladas en la Normas Internacionales de Ensayos de Semillas dictadas por la International Seed Testing Association (ISTA, 1985). En general, los ensayos de germinación se realizan con fracciones de semillas puras, sin pretratamientos. Se deben efectuar varias repeticiones sobre distintos sustratos (papel, arena o medios artificiales). Las semillas deben colocarse uniforme y adecuadamente en el medio de germinación y se han de señalar también las condiciones en las que se ha realizado (tiempo, temperatura constante/alternas, luz/oscuridad, humedad, etc.) Con las semillas duras, impermeables, durmientes o recientemente recolectadas se permiten ciertos pretratamientos (ISTA, 1985). Se puede proceder también a la desinfección del material antes del ensayo y finalmente, se debe indicar el número de semillas vacías y dañadas (insectos, rotas, etc.). Bajo estas condiciones la capacidad germinativa, expresada como el porcentaje final de germinación, es el parámetro utilizado para señalar la calidad de las semillas. Sin embargo, este parámetro no informa del comportamiento de las semillas durante el período de germinación, aspecto que es muy relevante en relación al comportamiento de las semillas en el campo e indicativo de la calidad comercial de las mismas.

Un comportamiento posible y frecuente de las semillas, en un ensayo de germinación realizado en condiciones óptimas de laboratorio se presenta en la Figura 7. En dicha figura se pone claramente de manifiesto que las semillas correspondientes a las curvas **A**, **B**, **C** y **D** muestran un comportamiento totalmente diferente durante el período de germinación, a pesar de que tienen la misma capacidad germinativa. Por tanto, el porcentaje final de germinación es un parámetro necesario, pero no suficiente, para describir la germinación de las semillas, ya que el comportamiento de éstas puede variar dependiendo de distintos factores ambientales y genéticos.

Los métodos para evaluar la respuesta de la germinación de un lote de semillas son diversos, pudiéndose dividir en dos grandes grupos: analíticos y gráficos. Entre los primeros se puede citar el análisis de la capacidad germinativa, distintos índices de germinación, análisis probit, métodos de regresión no lineal a modelos matemáticos, análisis de supervivencia y la regresión de Harzard; mientras que la representación de Arrhenius es el método gráfico más frecuentemente utilizado (Scott y col., 1984).

A pesar de esta diversidad, no existe un procedimiento normalizado y universalmente aceptado para evaluar la germinación de semillas y la emergencia de plántulas, debido a que la selección apropiada de un determinado método depende -en gran medida- de la información que se desee obtener y de la descripción matemática que cada investigador o analista quiera utilizar. En este sentido, los métodos gráficos proporcionan menos información que los métodos de regresión no lineal, los análisis de supervivencia o la regresión de Harzard, mientras que el tradicional análisis de la capacidad germinativa, expresada como porcentaje final de germinación, es un simple valor que, aunque puede ser comparado, sólo refleja la proporción final de respuesta de una población de semillas. Otros métodos analíticos, considerados también tradicionales, como el análisis probit (Wilson y col., 1989) y los índices de germinación no proporcionan suficiente información sobre la localización y dispersión en el tiempo (Steiner y col., 1989).

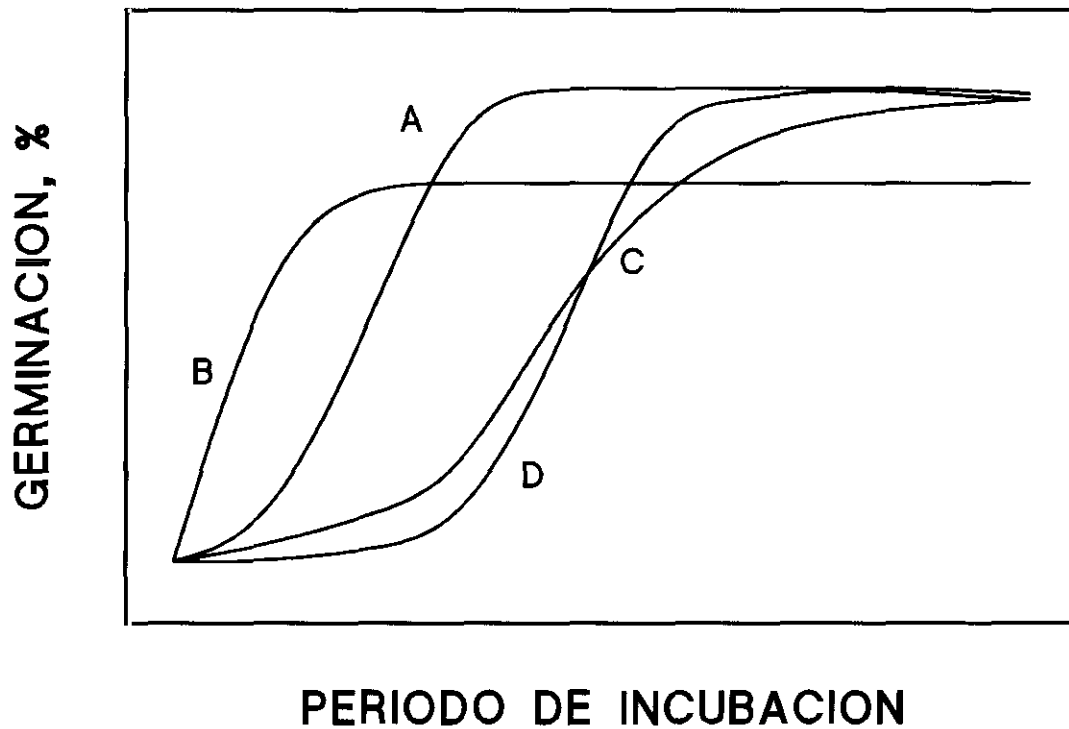


Figura 7. Evolución de la germinación de semillas en función del período de incubación. **A, B, C y D,** algunas posibles situaciones que se pueden producir en ensayos de germinación de semillas.

Otra consideración que hay que tener en cuenta es la peculiaridad de los datos de germinación de semillas. La germinación es un proceso que puede ser considerado como una respuesta cualitativa de una semilla individual que sucede, en determinadas condiciones, en un momento concreto. Sin embargo, cuando un lote de semillas es expuesto a un determinado tratamiento, las semillas del mismo no responden, o pueden no responder, de una manera uniforme y generalmente presentan un comportamiento distinto, pudiéndose producir casos de ausencia de germinación, entre los que se incluyen la falta de viabilidad inicial de las semillas, las pérdidas de viabilidad debidas a los tratamientos, pérdidas accidentales, contaminaciones y pérdidas debidas a una terminación prematura o anticipada del ensayo de germinación. Por tanto, es conveniente considerar la distinción entre la ausencia de germinación debida a la falta de viabilidad inicial y la debida a otras causas, al contribuir estas últimas a la distribución de la población. En consecuencia, en un ensayo de germinación sólo podemos observar el comportamiento general de un lote de semillas. Teniendo en cuenta esta hipótesis, el tiempo medio de germinación de un lote de semillas puede ser considerado como una variable aleatoria, mientras que la media y la varianza de este tiempo medio de germinación reflejan el comportamiento poblacional de un lote de semillas.

Por consiguiente, a la hora de abordar el problema de la selección de métodos para evaluar la germinación de semillas nos encontramos en una circunstancia en la que el investigador o el analista decide, en un balance dificultad-información, la alternativa más adecuada para una situación concreta.

1.6.2. Ensayos de evaluación y crecimiento de plántulas

Estos ensayos generalmente se utilizan como ensayos complementarios a los de germinación, ya que estos últimos no proporcionan información acerca de la robustez de las plántulas. En un ensayo de germinación las semillas se dividen en semillas germinadas y no germinadas y las plántulas en normales y anormales.

Según la ISTA (1985) se entiende por:

PLÁNTULA NORMAL:

- a) La que manifiesta la capacidad para continuar su desarrollo hacia la planta normal, cuando crece en suelo de buena calidad, y bajo condiciones favorables de agua, temperatura y luz.

- b) La que posee todas las estructuras esenciales siguientes cuando se ensaya en un sustrato artificial: 1) un sistema radicular bien desarrollado; 2) un hipocótilo bien desarrollado e intacto y/o un epicótilo sin lesiones en los tejidos conductores; 3) una hoja primaria bien desarrollada en las Gramíneas, y 4) uno o dos cotiledones para monocotiledóneas o dicotiledóneas, respectivamente.

PLÁNTULA ANORMAL:

es aquella que no manifiesta capacidad para continuar su desarrollo hacia planta normal cuando crecen en un suelo de buena calidad, y bajo condiciones favorables de agua, temperatura y luz.

No obstante, se clasifican como plántulas anormales las que presentan los siguientes defectos cuando se ensayan en un sustrato artificial: 1) Plántulas dañadas: sin cotiledones, con constricciones, con hendiduras, grietas o lesiones en las estructuras esenciales, sin raíz, etc., y 2) Plántulas deformadas: con un desarrollo de las estructuras esenciales débil o desequilibrado (plúmulas, hipocótilos o epicótilos retorcidos en espiral o atrofiados), raíces atrofiadas, plántulas acuosas o vítreas o en las que se ha detenido el desarrollo con posterioridad a la aparición de los cotiledones.

Todas estas anomalías se encuentran perfectamente tipificadas en los anexos de las normas internacionales de ensayos de semillas (ISTA, 1985), las cuales también

distinguen entre semillas frescas no germinadas y semillas muertas. Estas últimas son aquellas semillas que no han producido gérmenes al finalizar el período de ensayo prescrito y que no son ni duras (manifiestan una impermeabilidad al agua impuesta por los tegumentos) ni frescas (las que permanecen cerradas y aparentemente viables después del período de germinación).

Además de la evaluación de plántulas, otra línea de actuación viene dada por la medida del crecimiento de las plántulas. En general, se determina la longitud de la raíz como propusieron Smith y col., (1973) para determinar el vigor de las semillas de lechuga o la longitud de la plúmula para los cereales según la propuesta de Perry (1977). Estos ensayos junto con la medida de la longitud del hipocótilo o epicótilo y la determinación del peso fresco y peso seco de las plántulas son habituales en la mayoría de los estudios relacionados con la viabilidad y vigor de semillas, lo que ha dado lugar, por otra parte, a la formulación de distintos índices de vigor, que consideran los parámetros de crecimiento de las plántulas, para establecer comparaciones entre distintos lotes de semillas como el índice de vigor (longitud de la plántula x porcentaje de germinación), índice de uniformidad que mide la variación de la altura de una plántula en una población o el índice de vigor mejorado si el anterior se multiplica por el porcentaje de germinación (Huang, 1989).

1.6.3. Ensayos de coloración

Desde 1930 numerosos ensayos de coloración se han ido desarrollando para conocer la viabilidad de semillas debido fundamentalmente a la posible presencia de semillas durmientes, que pueden falsear los ensayos de germinación ya comentados. Distintos colorantes orgánicos como carmín índigo, violeta ácido, rojo neutro, azul de metileno, marrón de Bismark, azul de Evans, naranja G y verde malaquita, y sales inorgánicas de selenio y telurio se han utilizado con estos fines. La validez de estas técnicas de coloración tiene por objeto establecer correlaciones, estadísticamente significativas, entre el porcentaje

de semillas viables y los resultados obtenidos en los ensayos de germinación. Sin embargo, la coloración obtenida mediante estos ensayos depende de la penetración del colorante en los tejidos. En relación con este aspecto cabe señalar que los colorantes de carácter ácido no penetran, o lo hacen muy despacio, en las células vivas, las cuales pueden permanecer sin colorear durante largos períodos, mientras que las células y tejidos muertos se tiñen rápidamente (Duke y Kakefuda, 1981; Schoettle y Leopold, 1984). Según Overaa (1984), los colorantes que no penetran completamente en la células vivas se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- I. Colorantes trifenilmetano: fuschina ácida, verde ácido, violeta ácido, anilina azul soluble en agua.
- II. Colorantes azo: rojo Congo, rojo Bordeaux, rojo Bierbrich.
- III. Carmín de índigo, que según Rostovtsev y Lyubich (1978) parece el más adecuado.

Paralelamente al desarrollo de estos métodos se ha producido una intensa investigación en relación con algunos procesos metabólicos como la respiración y las enzimas implicadas. Entre los métodos que detectan estas alteraciones se puede señalar el ensayo del dinitrobenzol, que se convierte por la respiración de las células en nitrofenilhidroxilamina y nitranilina. Cuando las semillas son expuestas a vapores de amoníaco, la nitrofenilhidroxilamina se tiñe de un color púrpura característico, indicativo del grado de viabilidad de las semillas. Otros, sin embargo, no han prosperado y sólo aquellos basados en la presencia de las deshidrogenasas de los tejidos vivos se han encontrado satisfactorios. El ensayo topográfico del tetrazolium es el más ampliamente utilizado y ha sido adoptado como ensayo de obligada realización, según las normas dictadas por la International Seed Testing Association (ISTA, 1985; Martínez-Vasallo y Burgos Ródenas, 1987), para la certificación de la calidad de algunas especies por diversas estaciones de análisis de semillas, incluido el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (INSPV) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El fundamento del método se basa en que las semillas captan el cloruro o bromuro de 2,3,5 trifeniltetrazolium en forma de solución incolora. Este compuesto interacciona en el interior de los tejidos y gracias a los procesos reductores de las células viables, acepta el hidrógeno de las deshidrogenasas transformándose en trifenil formazano (sustancia estable, no difusible y de color rojo). En las células no viables, la actividad de las deshidrogenasas está disminuida o no existe, por lo que no se produce la reducción del trifeniltetrazolium y los tejidos aparecen incoloros.

Este ensayo principalmente cubre la posibilidad de identificar semillas viables y no viables, pero si lo que se quiere es realizar una evaluación para reseñar distintas categorías, la determinación debe ser mucho más precisa, p.e. debe realizarse en embriones o estructuras esenciales como los meristemos, que como se sabe son necesarios para el desarrollo normal de las plántulas. Para ensayos oficiales de la ISTA, este procedimiento está limitado a las especies aprobadas y enumeradas en la Reglas Oficiales (ISTA, 1985). Se utiliza en el caso de especies que normalmente tardan mucho en germinar o presentan latencia al utilizar los métodos de germinación descritos en las reglas ISTA para determinar rápidamente la viabilidad de las muestras de semillas y también para determinar la viabilidad, bien en una muestra de trabajo, o en semillas individuales en el caso particular de las muestras que al finalizar el ensayo de germinación presentan un elevado porcentaje de semillas latentes.

El objeto del ensayo en usos no oficiales es obtener rápida información acerca de la viabilidad, indemnidad de las semillas viables y de la probabilidad o causas para una disminución del rendimiento en el almacenamiento o bajo condiciones de siembra. Sin embargo, en los estudios realizados en semillas de girasol (de Paula y col., 1991a), soja (Mason y col., 1982) y trigo (Aspinall y Paleg, 1971) se observa la falta de correspondencia entre los ensayos de germinación y la prueba topográfica de tetrazolium, que se traduce en una sobreestimación de la viabilidad, tanto mayor cuanto mayor es el deterioro. Esta variable selectividad del ensayo del tetrazolium podría también atribuirse a una falta de activación de las enzimas respiratorias que daría lugar a una coloración

heterogénea y aleatoria (de Paula y col., 1991a).

Finalmente, cabe citar también otros métodos para la determinación de la viabilidad relacionados con los anteriores y basados en la utilización de las técnicas de contraste de rayos X, mediante los cuales se analiza la absorción de sales de bario que penetra en las semillas deterioradas. Esta técnica ofrece la ventaja de ser un método rápido, no destructivo, de fácil utilización y de carácter topográfico y semicuantitativo. Recientemente, van der Burg y col. (1994), así como el equipo de Chavagnat, en el Instituto Agronómico de Angers (Francia), han revitalizado este método obteniendo resultados espectaculares en semillas (secas, bajo contenido en humedad e inmaduras) y en otros órganos como flores, yemas, espigas e inflorescencias (Chavagnat, 1987; Chavagnat, 1989a, 1989b).

1.6.4. Ensayos de liberación

La liberación de solutos tiene lugar de forma natural durante la primera etapa de la germinación de las semillas, que comprende la captación de agua y la consiguiente hidratación de las células para permitir el restablecimiento de la actividad metabólica. Durante este proceso de imbibición (véase apartado 1.3.) se produce la salida de numerosos componentes orgánicos, generalmente sustratos energéticos, y de electrolitos necesarios para la germinación y el desarrollo de las plántulas. Los solutos liberados son el sustrato idóneo para el crecimiento de patógenos, que pueden fácilmente infectar los tejidos durante la imbibición (Duke y col., 1983; Woodstock, 1973), lo que afectaría negativamente al vigor. Por otra parte, la alteración y desorganización de las membranas durante el envejecimiento permite una mayor liberación de estos compuestos lo que ha permitido desarrollar una serie de ensayos rápidos, sencillos y de bajo costo basados en la cuantificación de los solutos liberados durante la rehidratación de las semillas

1.6.4.1. Medida de la liberación de sustancias al medio

Algunos autores han estudiado la liberación de solutos al medio mediante la determinación de la absorbancia a 260 y 280 nm (que corresponden a compuestos de naturaleza fenólica, ciertos aminoácidos, nucleótidos y fundamentalmente ácidos nucleicos) en los exudados procedentes de semillas envejecidas de sorgo (Perl y col., 1978), soja (Schoettle y Leopold, 1984), girasol (Torres y Martínez-Honduvilla, 1990), guisante, garbanzo y algodón (Deswal y Sheoran, 1993).

Existe otro tipo de ensayos basados en la detección de compuestos específicos que son liberados en mayor medida en las semillas envejecidas, como es el caso de la sinapina, sustancia fluorescente que se ha observado en los exudados de semillas de repollo no viables (Hill y col., 1988; Taylor y col., 1988) y que ha permitido desarrollar un método sencillo de determinación de la viabilidad de estas semillas. Asimismo, la glucosa liberada por las semillas deterioradas se detecta fácilmente mediante la inmersión en los lixiviados de tiras o tabletas reactivas utilizadas en los análisis de orina (Martínez-Honduvilla y Santos-Ruiz, 1975). Cuando las semillas son viables no se altera el color de las tiras, mientras que cuando son inviables adquieren distintas tonalidades de color verde dependiendo de la concentración de azúcar exudada al medio. Como en el caso anterior, este ensayo cubre la posibilidad de identificar semillas viables y no viables, siendo necesario la cuantificación por métodos de espectrofotometría visible para la identificación de estados intermedios o dudosos. La determinación del pH de los exudados a los treinta minutos de imbibición ha sido propuesto recientemente (Tyagi, 1993) como método para estimar rápidamente la capacidad germinativa en semilla de soja, aunque su efectividad no se ha confirmado para otro tipo de semillas.

Por otra parte, algunos autores (Duke y Kakefuda, 1981; Duke y col., 1983, 1986) han observado también la liberación de distintas enzimas marcadoras de orgánulos y sustancias citoplasmáticas de alto peso molecular durante el proceso de imbibición de semillas de soja lo que pone de manifiesto la alteración y desorganización de las

membranas y el grado de destrucción celular. Asimismo, el estudio de la diferente cinética de liberación de determinados iones presentes en los exudados de las semillas, fundamentalmente potasio y sodio (Mukhtar y Laidman, 1982; Mullet y Considine, 1980; Senaratna y McKersie, 1983; Woodstock y col., 1985) se ha sugerido también como método para la evaluación de la calidad de las semillas, pero los resultados son contradictorios.

Se han desarrollado, por tanto, diferentes métodos para determinar la calidad de las semillas basándose en el análisis de los componentes de los exudados. Estos ensayos son un índice de la debilidad de las membranas y por tanto una medida indirecta del deterioro de las semillas. Sin embargo, la detección global de los electrolitos liberados durante la imbibición de las semillas se puede realizar analizando la conductividad eléctrica de sus exudados, lo que ha posibilitado el desarrollo de un método mucho más simple y preciso (Powell, 1986) para detectar las alteraciones de membrana producidas durante el envejecimiento celular.

1.6.4.2. Ensayo de la conductividad eléctrica

La medida de la conductividad eléctrica (CE) para determinar la viabilidad de las semillas fue propuesta por primera vez por Fick y Hibbard en 1925, al observar la gran resistencia al paso de corriente eléctrica de los lixiviados procedentes de semillas de alfalfa y trébol. Desde entonces se han realizado numerosos trabajos que relacionan la conductividad eléctrica, la viabilidad y el vigor de las semillas. La germinación de distintos lotes de semillas de judía, soja y algodón fue determinada adecuadamente por este método (Steere y col., 1981) y posteriormente este procedimiento ha revelado su utilidad no sólo para determinar la germinación de diversos lotes comerciales de semillas de algodón (Perl y Feder, 1983), sino también para indicar la tasa de emergencia en condiciones óptimas y de campo y el peso de las plántulas.

La medida de la conductividad de los exudados de las semillas durante la imbibición permite monitorizar el proceso de rehidratación de las semillas y detectar la capacidad de reorganización celular, que es un requisito indispensable para permitir la adecuada germinación de las semillas (Hampton y Coolbear, 1990). Las primeras determinaciones de la conductividad eléctrica se realizaban por medida de la resistencia/conductancia (μmhos) de los exudados de las semillas sumergidas en agua. Sin embargo, la constante investigación en este campo ha dado lugar al desarrollo de un nuevo instrumento denominado **analizador automático de semillas** (ASA, Automatic Seed Analyzer) (Steere y col., 1981), mediante el que se puede predecir la germinación de un lote de semillas por medida individualizada de la intensidad ($\mu\text{amperios}$) de corriente eléctrica (ICE) de los exudados de 100 semillas, y el cual se describe detalladamente en el apartado de materiales y métodos.

Sin embargo, el método presenta algunas limitaciones que se han puesto de manifiesto en distintos trabajos (Hepburn y col., 1984; Queiroga, 1989; Smith y Dobrenz, 1987). En general, los factores que afectan la medida de la conductividad eléctrica son, entre otros, los siguientes: temperatura y tiempo de imbibición, voltaje de trabajo, caracteres morfológicos de la semilla, contenido de humedad de la semilla, daño de las semillas, especie y cultivar.

De todos estos factores los más intensamente estudiados son los que a continuación se describen:

A. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE IMBIBICIÓN:

El aumento de la intensidad de corriente eléctrica que se observa al aumentar la temperatura se atribuye fundamentalmente al aumento de los electrolitos liberados de las semillas (Dadlani y Agrawal, 1983; Queiroga, 1989), pues, aunque la temperatura influye en la conductividad eléctrica de las soluciones (Hopper y Hinton, 1987), este efecto es

difícil de cuantificar en los exudados de las semillas. Del mismo modo, Givelberg y col., (1984) ha señalado que la continua liberación de iones (observado por un aumento progresivo en la conductividad eléctrica) que tiene lugar durante todo el período de imbibición de las semillas cuando la determinación se realiza a temperaturas elevadas (45 y 50 °C) se debe a la alteración de las propiedades de permeabilidad de las membranas. Por otra parte, Murphy y Noland (1982), consideran que la liberación de electrolitos depende de la velocidad de captación de agua, que a su vez está favorecida por el descenso de la viscosidad que tiene lugar al aumentar la temperatura.

Diversos autores han señalado asimismo que la temperatura de imbibición es la causa principal de la alteración de la ICE (Bruggink y col., 1991; Halloin, 1975; McDonald y Wilson, 1979), por lo que para conseguir una óptima predicción de la germinación y permitir la comparación entre distintos lotes de semillas es necesario realizar las determinaciones manteniendo la temperatura constante.

B. EFECTO DEL TIEMPO DE IMBIBICIÓN:

La salida de electrolitos se produce de forma continuada durante todo el proceso de imbibición, pero es necesario fijar un tiempo adecuado de imbibición que permita comparar los valores finales de conductividad eléctrica de distintos lotes de semillas y que por otra parte no sea muy prolongado ya que la semilla puede iniciar el proceso de protrusión radicular, que afecta necesariamente a la cinética de liberación de solutos. Por ello es necesario realizar ensayos previos para adecuar el tiempo de imbibición en cada tipo de semilla, especie y cultivar; así el tiempo recomendado para las lecturas de conductividad eléctrica es de 24 horas para semillas de girasol (de Paula, 1994), 20 horas en semillas de algodón (Hopper y Hinton, 1987), 8 horas en semillas de repollo (Hill y col., 1988) y 73 horas en maíz (Bruggink y col., 1991).

C. EFECTO DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS:

El peso y la superficie específica (cm^2/g) son las características morfológicas más estrechamente relacionadas con la cantidad total de electrolitos y la velocidad con que éstos aparecen en el exudado, por lo que al analizar el exudado individual de las semillas por medio del equipo ASAC es necesario corregir el efecto del tamaño, clasificando las semillas en lotes uniformes (McDonald y Wilson, 1979).

Hoy y Gamble (1985) observaron en semillas de soja que los niveles de corriente por semilla, medidos con un equipo ASA-610 se incrementaban al aumentar el tamaño de la semilla. El test individualizado de conductividad (ASA-610) reveló también diferencias de vigor entre los distintos tamaños de las semillas dentro de un mismo lote.

D. EFECTO DE LA HUMEDAD DE LA SEMILLA:

El contenido inicial de humedad de la semilla influye en la velocidad de liberación de electrolitos (Simon y Wiebe, 1975) y también en las lecturas de CE (Parrish y Leopold, 1977). Con el aumento de humedad de la semilla disminuyen los valores de ICE. Las semillas de baja humedad presentan un aumento de la liberación de electrolitos como consecuencia de la rápida entrada de agua, culminándose con la rotura de las membranas y el deterioro de las semillas (Dadlani y Agrawal, 1983). Las semillas con mayor porcentaje de humedad presentan una menor liberación de electrolitos debido a una baja velocidad de entrada de agua, (Tao, 1978). Asimismo, Halder y Gupta (1980) detectaron menores valores de CE en semillas de girasol almacenadas a humedad a saturación, que en aquellas sometidas a un 50 % de humedad relativa. Por otra parte, la hidratación lenta y controlada de las semillas mediante soluciones de polietilenglicol, reduce el daño de las membranas durante la imbibición y evita la salida masiva de electrolitos (Powell y col., 1986; Woodstock y Taylorson, 1981).

Otros autores (Leopold, 1980; Parrish y Leopold, 1977; Vertucci y Leopold, 1983) por el contrario, han observado en semilla de soja que la velocidad de entrada de agua durante los primeros minutos de hidratación es superior en las semillas con un mayor contenido de humedad. Estos autores proponen que es debido a que los tejidos parcialmente hidratados presentan una menor resistencia a la humectación. Sin embargo, la liberación de electrolitos, medida por CE, fue siempre superior en las semillas menos hidratadas, lo que demuestra que el daño producido por la entrada de agua (lenta o rápidamente) se atenúa con la hidratación de las semillas.

El contenido inicial de humedad de la semilla altera la predicción de la germinación estimada a través de la conductividad eléctrica y, por lo tanto, el empleo de semillas con distinto contenido de humedad puede dar lugar a resultados considerablemente distintos, tanto más cuanto más diferentes sean los porcentajes de humedad de los distintos lotes (Queiroga, 1989).

E. EFECTO DEL DAÑO MECÁNICO:

Matthews y Rogerson (1976), encontraron variaciones en la conductividad eléctrica de distintos lotes de semillas, las cuales fueron directamente asociadas con las lesiones observadas mediante el ensayo del tetrazolium. Powell y Matthews (1979) observaron que las hendiduras en la testa permiten una rápida absorción de agua, que asociaron a las áreas muertas en el cotiledón y a la gran conductividad del agua de imbibición. Las investigaciones realizadas posteriormente (Bruggink y col., 1991; Duke y col., 1986; Wann, 1986) sobre el efecto del daño mecánico de la testa en la conductividad eléctrica, concluyen que la ruptura de las capas protectoras de las semillas contribuye al aumento de la liberación de electrolitos y por tanto al aumento en la conductividad eléctrica de los exudados.

La eliminación de la testa/pericarpio en las semillas influye de forma determinante en las lecturas de conductividad eléctrica. La testa de las semillas de soja (Duke y col., 1986) tiene como función evitar la entrada rápida de agua en la semilla y por tanto su eliminación resulta en un importante daño en el embrión durante el proceso de imbibición. En semillas de cacahuete (Abdel Samad y Pearce, 1978), la testa no actúa como una barrera física para la captación de agua, además de liberar sustancias durante el proceso de imbibición contribuyendo por tanto al aumento de la conductividad eléctrica

1.6.5. Determinación de actividades enzimáticas

Aunque las investigaciones sobre alteraciones bioquímicas en semillas deterioradas también se han centrado en el estudio de enzimas, sin embargo, las determinaciones de actividades enzimáticas como técnicas para predecir la viabilidad y vigor de semillas que con mayor frecuencia se utilizan hacen referencia a la actividad glutamato descarboxilasa (Bautista y col., 1964; James, 1968; Ram y Wiesner, 1988), malato deshidrogenasa (de Paula y col., 1993), alcohol deshidrogenasa y citocromo oxidasa (Throneberry y Smith, 1955).

En otros casos, se realizan determinaciones indirectas con el empleo de distintos colorantes como hemos señalado con anterioridad en el apartado 1.6.3., mediante las cuales se ha interpretado el deterioro de semillas, sobre todo en relación con las alteraciones observadas en las mitocondrias.

Conviene señalar, no obstante, que la determinación de actividades enzimáticas como sistema indicador de la viabilidad y vigor de semillas, constituye uno de los procedimientos más exactos y rigurosos, que ofrecen una mayor información sobre la calidad o bondad de las semillas. Paradójicamente, y de acuerdo con lo anteriormente indicado, este tipo de determinaciones no está generalizado, debido fundamentalmente a los propios condicionantes de estos ensayos, los cuales requieren mayor tiempo de

ejecución y personal especializado, lo que contribuye, junto con su coste, al hecho concreto de ser una alternativa poco utilizada por las estaciones e institutos dedicados a la certificación oficial de semillas.

1.6.6. Ensayos de envejecimiento acelerado y deterioro controlado

El envejecimiento natural suele requerir, según el tipo de semilla (Harrington, 1972), períodos más o menos prolongados para alcanzar una pérdida total de viabilidad (semillas totalmente envejecidas). Por ello, desde hace algunos años se aplican métodos que permiten acelerar el proceso de envejecimiento mediante el almacenamiento de semillas en condiciones ambientales extremas. Estos métodos o técnicas reciben el nombre de envejecimiento artificial y constituyen, con algunas limitaciones, un sistema adecuado de estudio del fenómeno de envejecimiento de semillas, ya que en poco tiempo pueden obtenerse muestras con distintos grados de viabilidad. Así pues el envejecimiento artificial se diferencia del natural en su rapidez.

La aplicación de este tipo de métodos de envejecimiento artificial se está convirtiendo en una práctica habitual en los grupos de investigación dedicados a estos temas (Tabla 7), especialmente cuando se trabaja con especies altamente interesantes desde el punto de vista económico o con aquellas que necesitan períodos muy largos de almacenamiento para perder su viabilidad de forma natural (Matthews, 1994). Estas técnicas también se utilizan en estudios de rendimientos de cultivos. En este sentido, Saxena y Maheswari (1980) han demostrado, como cabría esperar, que el envejecimiento artificial aplicado a semillas de soja produce plántulas con vigor muy reducido, por lo que su utilización puede considerarse como un buen estimador del rendimiento en el campo.

En general, parece que las alteraciones observadas en semillas artificialmente envejecidas son muy similares a las encontradas en semillas envejecidas de forma natural, lo que supone la conveniencia de la utilización de este tipo de técnicas para el estudio

de la pérdida de viabilidad, dada la rapidez que reportan en cuanto a la obtención de muestras con diferentes grados de viabilidad. No obstante, presentan el inconveniente de que en muchas ocasiones conducen al crecimiento de microorganismos y hongos en las semillas, los cuales podrían ser los causantes de numerosas alteraciones en las mismas.

TABLA 7. Algunos ejemplos de especies de interés sometidas a diferentes ensayos de envejecimiento artificial (acelerado y controlado).

ESPECIE	AUTORES Y REFERENCIAS
Cebada	Hubber y col., 1982. Agron. J. 74, 387-389 Anderson, 1980. Crop Sci. 10, 36-39
Girasol	Halder y col., 1983. Seed Sci. Technol. 11, 331-339
Maíz	Berjak y Villiers, 1972. New Phytol. 71, 135-144
Pino	González-Juliá y col., 1983. Rev. Esp. Fisiol. 39, 409-416
Sésamo	Saxena y col., 1985. Indian J. Plant Physiol. 28, 35-42
Soja	Stewart y Bewley, 1980. Plant Physiol. 65, 245-248 Priestley y Leopold, 1983. Physiol. Plant. 59, 467-470
Sorgo	Gelmond y col., 1978. J. Exp. Bot. 28, 489-495 Perl y col., 1978. Ann. Bot. 28, 227-236
Tomate	Francis y Coolbear, 1985. J. Exp. Bot. 53, 1764-1770
Trigo	Dell'Aquilla, 1987. Plant Physiol. Biochem. 25, 761-768

Conviene señalar que existen datos contrarios sobre la semejanza de efectos observados entre ambos tipos de envejecimiento. Consecuentemente, es necesario no olvidar que el envejecimiento artificial es un modelo experimental del que hay que verificar en cada caso su posible similitud o paralelismo con el envejecimiento natural. Así por ejemplo, según Priestley y Leopold (1983), semillas de soja sometidas a

envejecimiento natural (44 meses a 4 °C y baja humedad) sufrieron una marcada reducción de vigor y viabilidad que fue asociada a una disminución en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. En cambio, cuando las mismas semillas fueron sometidas a un envejecimiento acelerado (varios días a 40 °C y alta humedad) se observó una disminución comparable de vigor y viabilidad, pero sin cambios en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

Como ya se ha indicado, la pérdida total de viabilidad puede considerarse como el resultado final de una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y genéticos que suceden durante el envejecimiento. Sin embargo, antes de que se produzca la muerte de las semillas, la tasa de envejecimiento aumenta en distintas proporciones, dependiendo principalmente del contenido en humedad de la semilla, de la temperatura y de la presión de oxígeno a que hayan estado sometidas las semillas durante su almacenamiento. Puesto que la pérdida de viabilidad depende del entorno en que son almacenadas las semillas, las técnicas de envejecimiento artificial suelen consistir en el almacenamiento de semillas a altas temperaturas, alto contenido en humedad y distinta composición atmosférica, y se logran mediante los ensayos de envejecimiento acelerado y controlado.

El primero de estos ensayos fue desarrollado por Delouche en 1965 como ensayo de calidad de semillas en la Universidad Estatal de Mississippi, aunque algunos años antes Helmer (1962) había sugerido que el ensayo de envejecimiento acelerado podría utilizarse para predecir el comportamiento de semillas durante su almacenamiento. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado en semillas de soja y se ha adoptado como método de análisis de vigor en algunos laboratorios privados.

El envejecimiento acelerado consiste, básicamente, en someter a las semillas a un ambiente de humedad a saturación (96-100 %) y a altas temperaturas (superiores a 40 °C) durante tiempos variables, que oscilan según el material de que se trate entre 2 y 60 días. No obstante, las combinaciones tiempo-temperatura más habituales varían entre 72 y 96 horas en un rango de 40 a 45 °C. Durante este tiempo y a estas temperaturas se producen

graves daños en las células y alteraciones en los sistemas enzimáticos y en los ácidos nucleicos, lo que origina un rápido deterioro de las semillas.

El envejecimiento artificial de semillas también puede realizarse mediante el denominado ensayo de envejecimiento controlado o de deterioro controlado. Este ensayo descrito en 1980 por Matthews en especies hortícolas de pequeño tamaño, se basa en el mismo principio que el ensayo de envejecimiento acelerado; sin embargo, mediante el ensayo controlado se incorpora un mejor control de la temperatura y del contenido de humedad de la semilla. Para su realización se requiere disponer de un baño de agua termostaticado, una balanza y paquetes de aluminio para introducir las semillas. El ensayo se realiza con lotes de semillas de humedad conocida, determinada de acuerdo con las normas internacionales de ensayos de semillas, que se colocan en círculos de papel de filtro humedecido para que se embeban hasta la humedad deseada, controlándola por sucesivas y frecuentes pesadas. Una vez embebidas las semillas, se colocan en un recipiente precintado y se mantienen toda la noche en un lugar fresco (10 °C) con el fin de que la humedad se distribuya homogéneamente. Luego las muestras se colocan en paquetes cerrados y se incuban 24 horas a 45 °C. Del mismo modo, finalizado el ensayo se procede a la evaluación de las semillas envejecidas. Sin embargo, los resultados obtenidos para algunas especies como la lechuga, no son totalmente satisfactorios (Powell y col., 1984) y en consecuencia se han ido desarrollando otros métodos o proponiendo métodos alternativos como el descrito por Bruggink (1989) basado en equilibrar el contenido de humedad de las semillas de maíz con la humedad relativa durante el almacenamiento. Otros métodos de envejecimiento acelerado propuestos incluyen distintos sistemas. Entre éstos cabe señalar:

- 1) Inmersión en agua caliente durante períodos variables como se ha utilizado en algodón (Bourland y col., 1988), judías (Pandey, 1989) y trigo (Bhattacharya y col., 1985).

- 2) Tratamientos térmicos (de Paula, 1991; Likhatchev y col., 1985; Roberts y Abdalla, 1968).
- 3) Métodos que implican irradiación y altas presiones de oxígeno (Wilson y McDonald, 1986).
- 4) Tratamientos conjuntos de altas y bajas temperaturas en combinación con otros ensayos de vigor como el propuesto por Barla-Szabó y Dolinka (1988) para las semillas de trigo y maíz.

En general, puede decirse que la técnica de envejecimiento artificial de semillas constituye un test de vigor rápido, económico y sencillo, aplicable a todas las especies de interés industrial, y que sólo requiere optimizar el período de envejecimiento dependiendo de la sensibilidad de la especie a la que se aplica este método.

1.6.7. Otros métodos

Además de los ensayos comentados en los apartados anteriores, la determinación de la viabilidad y vigor de las semillas puede realizarse mediante otros procedimientos. Entre estos cabe señalar:

- a) Ensayos en frío, diseñados inicialmente para la determinación de la viabilidad de semillas destinadas a siembra temprana o primaverales, y que han sido empleados frecuentemente como hemos descrito con anterioridad (Mason y col., 1982; Torres y Martínez-Honduvilla, 1990).
- b) Ensayos para la identificación de patógenos como el ensayo de Hiltner, que fue inicialmente propuesto para el reconocimiento de *Fusarium* spp.
- c) Determinación del consumo de oxígeno (Torres y Martínez-Honduvilla, 1987).

2. OBJETIVOS

Las semillas presentan ciertas características diferenciales respecto del resto de los organismos vivos, que les permiten sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales, manteniendo la capacidad de generar nuevos individuos de su misma especie. Sin embargo, la longevidad de las semillas, así como la calidad y/o bondad de las mismas, depende en gran medida de la existencia de mecanismos celulares de protección tanto frente a los ambientes adversos, como a las operaciones y manipulaciones a que son sometidas, desde su maduración hasta la siembra. En este sentido, las condiciones de almacenamiento tienen una especial influencia, ya que con frecuencia conducen al envejecimiento de las semillas, lo que conlleva la pérdida de viabilidad y vigor de las mismas.

Desde un punto de vista bioquímico, el estudio del envejecimiento en las semillas presenta un especial interés, ya que permite investigar las reacciones de deterioro, así como las principales estructuras afectadas por ellas, en sistemas biológicos donde la actividad metabólica está muy disminuida y por tanto no es posible la reposición o reparación de los componentes alterados. Asimismo, la incidencia de las condiciones de almacenamiento en los procesos degenerativos y el estudio de la respuesta fisiológica de las semillas durante la germinación, proporcionan una información de vital importancia para preservar las características de la nueva planta.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, y de acuerdo con el estado actual de las investigaciones sobre la fisiología y bioquímica de las semillas, señalado en el apartado anterior, el trabajo que se presenta implica la siguiente formulación de objetivos:

- 1.- Evaluación de la capacidad germinativa y características de vigor de las semillas de girasol cv. Peredovik sometidas a condiciones adversas de almacenamiento que

favorecen su envejecimiento precoz, considerando los dos principales factores implicados en el desarrollo de reacciones de deterioro, la humedad y la temperatura.

- 2.- Una vez analizadas las posibles alteraciones fisiológicas que implican la pérdida de la viabilidad de las semillas, se profundizará en el estudio de las modificaciones de la funcionalidad de las estructuras celulares directamente afectadas por acción del envejecimiento.
- 3.- Asimismo, se abordará el estudio de los mecanismos de protección que actúan tanto en las semillas en estado seco o quiescente, y, por tanto, metabólicamente inactivas, como en las semillas en la fase pregerminativa, durante la cual se ponen a punto los sistemas enzimáticos de reparación y los procesos metabólicos que permiten la culminación del proceso de germinación.
- 4.- Se analizará además la posible influencia del tamaño de las semillas de acuerdo con su correspondiente categoría comercial, como único elemento diferencial entre las semillas de girasol procedentes del mismo cultivar, en cada uno de los objetivos anteriormente planteados.

Finalmente, cabe señalar que el conocimiento de los distintos procesos relacionados con el envejecimiento de las semillas podría servir de base para el desarrollo de tratamientos específicos encaminados a contrarrestar los efectos del deterioro, así como para la puesta a punto de técnicas que permitan estimar de forma rápida y fiable la calidad de las semillas, lo que reviste un especial interés para la conservación de recursos fitogenéticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

El girasol pertenece al género *Helianthus*. Este género reúne más de cincuenta especies con una gran diversidad genética, siendo *Helianthus annuus* la especie a la que pertenece el girasol cultivado. Su sistemática, según Cronquist (1981), es la siguiente: Clase, *Magnoliopsida*; Subclase, *Asteridae*; Orden, *Asterales*; Familia, *Asteraceae* (*Compositae*); Género, *Helianthus* L.; Especie, *H. annuus* L.

El girasol se reproduce sexualmente mediante la siembra directa de aquenios. El ²aquenio es un fruto comprimido conocido vulgarmente como "pipa", de tamaño variable dependiendo fundamentalmente de la posición que ocupe en la inflorescencia (capítulo). El tamaño medio tiene de 7,5 a 17 mm de largo, 3,5 mm de ancho y de 2 a 2,5 mm de espesor. Los aquenios de girasol están constituidos por distintas capas (Fig. 8), que desde el exterior al interior reciben los siguientes nombres:

- a. **PERICARPIO:** Envoltura externa del fruto, de consistencia fibrosa, fina, normalmente de color negruzco en los cultivares de alto contenido en aceite, que permanece adherida a la verdadera semilla, excepto en las criptas, a través de una fina película de endospermo.
- b. **ALEURONA:** Capa de células normalmente uniestratificada, provista de células aplanadas, que es la sede de una importante actividad enzimática (Bewley y Black, 1978; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989), especialmente en el momento en que se inicia la germinación.

².- En este tipo de trabajo se adopta la denominación "semilla" ya que este término se encuentra universalmente aceptado cuando se hace referencia a los órganos relacionados con la propagación sexual.

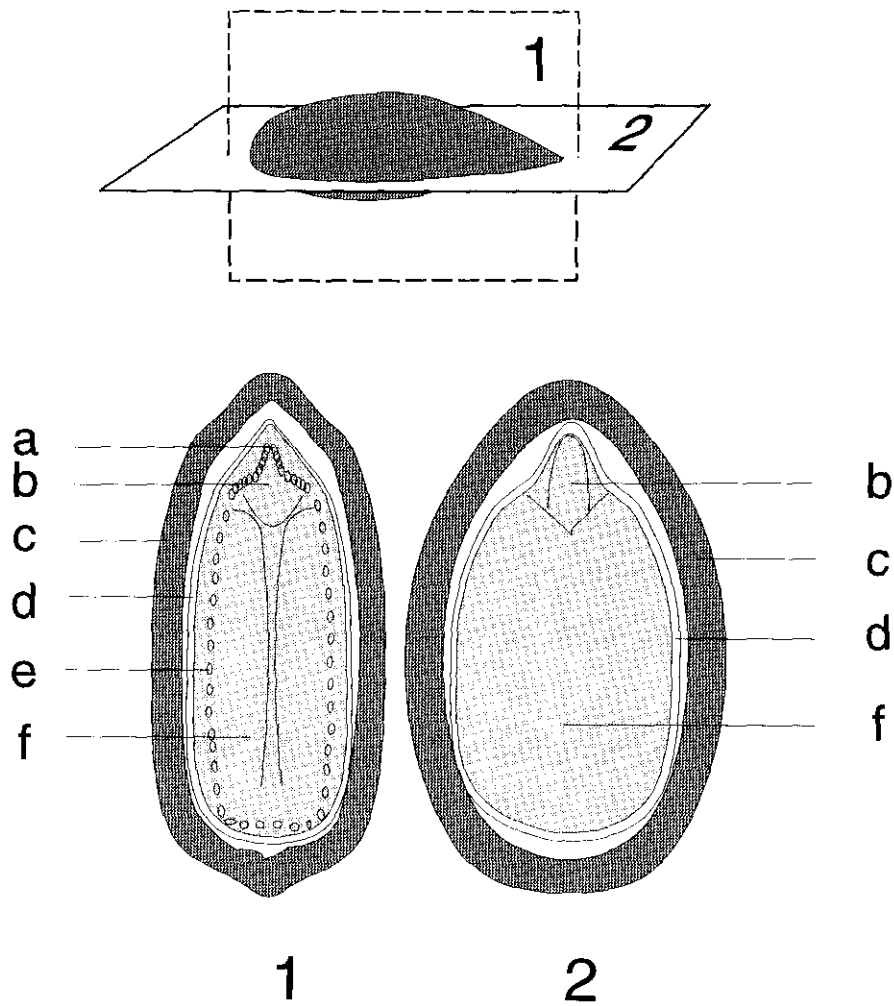


Figura 8. Fruto (aquenio) de girasol: **a.** anillo precambial, **b.** radícula, **c.** pericarpio, **d.** capa de aleurona, **e.** vena precambial, y **f.** cotiledón.

- c. **SEMILLA:** Constituida por los cotiledones y el eje embrionario. **COTILEDONES:** Parte más voluminosa de la semilla, formados por dos hojas incipientes, carentes de cloroplastos, pero capaces de transformarse en hojas fotosintéticamente activas durante el estado de plántula por acumulación de clorofila, y con un alto contenido en aceite (32-46 %) debido a la acumulación de abundantes cuerpos lipídicos de forma esférica. **EJE EMBRIONARIO:** Formado por la radícula, con gravitropismo positivo, y la gémula (yema vegetativa), con gravitropismo negativo, cuyo desarrollo dará lugar al sistema radicular y a la parte aérea, respectivamente.

Los aquenios de girasol (*Helianthus annuus* L.) utilizados en este trabajo pertenecen al cultivar Peredovik. Este híbrido de polinización libre, procedente de la cosecha de 1989, fue proporcionado por la compañía KOIPESOL, S.A. Las semillas utilizadas corresponden a la categoría STANDARD F (16000 semillas/kg, equivalente a ≤ 70 g/1000 semillas) y STANDARD G (11050 semillas/kg, equivalente a ≥ 90 g/1000 semillas). Durante todo el período de experimentación las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente, realizándose controles periódicos de la capacidad germinativa de las semillas para verificar la calidad del material utilizado.

Para facilitar la lectura de este trabajo, a las semillas de menor tamaño se las denomina **SP** y a las de mayor tamaño **SG**.

3.2. Envejecimiento acelerado

El modelo experimental de envejecimiento realizado consiste en el almacenamiento de las semillas de girasol en condiciones adversas de temperatura (43 °C) en combinación con una elevada humedad relativa (75 ± 5 %), lo que permite simular en un corto período las reacciones degenerativas que desembocan en la pérdida de viabilidad de las semillas. Este procedimiento ha sido adoptado por diversos grupos de investigación (Gidrol

y col., 1989, 1990; Halder y Gupta, 1980; Halder y col., 1983) en los estudios sobre el deterioro de distintos tipos de semillas.

Los ensayos de envejecimiento acelerado se realizaron en una cámara Revco (modelo RI-23-555-U) provista de un sistema de control de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento. Las semillas se mantuvieron en la cámara durante 1, 3, 5, 7 y 11 días. Después de cada tratamiento se tomó una muestra para la determinación del porcentaje de humedad (3 horas en estufa a 130 °C). Las semillas restantes se introdujeron en un desecador (sílica gel) a temperatura ambiente hasta recuperar su humedad inicial. El material así tratado fue utilizado para los siguientes ensayos.

3.4. Determinación de la viabilidad y vigor de semillas

3.4.1. Ensayos de germinación

Los ensayos de germinación se realizaron de acuerdo con las recomendaciones internacionales de ensayos de semillas (ISTA, 1985) mediante la técnica de papel enrollado. Se utilizó como sustrato papel de cromatografía Whatman 3 MM (46 x 57 cm) entre dos hojas de papel Whatman n° 1 (42 x 52 cm). Todo el conjunto se humedeció con agua destilada y los rollos de papel resultantes se introdujeron en bolsas de polietileno, incubándose en posición vertical en una cámara de germinación Selecta a 25°C (± 1 °C) en oscuridad durante 10 días. La determinación del número de semillas germinadas (G) se realizó diariamente durante el período de germinación señalado, considerándose como tales aquellas semillas que presentaron una longitud de radícula superior o igual a 0,5 cm. Los ensayos de germinación se realizaron con 100 semillas con 4 repeticiones de 25 semillas cada una y el número de semillas germinadas cada día se utilizó para determinar el tiempo medio de germinación (TMG), definido por la expresión (Dell'Aquila, 1987):

$$TMG = \Sigma Dn / \Sigma n$$

donde,

n = número de semillas que germinaron en el día D

D = día de germinación contado desde el inicio de la imbibición

3.4.2. Ensayos de vigor: crecimiento de plántulas e índices relacionados

Los ensayos de evaluación y crecimiento de plántulas se realizaron al finalizar el período de germinación, determinándose el número de semillas que dieron lugar a plántulas normales (**N**), plántulas anormales (**A**) y semillas muertas (**M**), según las características que se describen a continuación (ISTA, 1985):

PLÁNTULAS NORMALES:

◇ Sistema Radicular: **raíz primaria** intacta o con sólo ligeros defectos:

- decoloración o manchas necróticas
- grietas o hendiduras cicatrizadas
- grietas o hendiduras de poca profundidad

◇ Sistema Apical: **hipocótilo** intacto o sólo con ligeros defectos:

- decoloración o manchas necróticas
- grietas, hendiduras o roturas cicatrizadas
- grietas o hendiduras de poca profundidad
- ligeros retorcimientos

cotiledones intactos o con sólo ligeros defectos

- menos del 50 % de necrosis
- tres cotiledones

yema terminal intacta

PLÁNTULA ANORMAL:

◇ Sistema Radicular: **raíz primaria** defectuosa:

- raquílica o mazuda
 - ahilada
 - rota
 - hendida desde el extremo
 - con constricción
 - atrofiada o ausente
 - atrapada en la cubierta seminal
 - con geotropismo negativo
 - vítrea
 - podrida como resultado de una infección primaria
-

◇ Sistema Apical: **hipocótilo** defectuoso

- vítreo
- podrido como consecuencia de una infección primaria
- estrechamente retorcido o formando una espiral
- corto y grueso o ausente
- agrietado profundamente o roto
- con hendidura longitudinal
- curvado o formando un lazo
- con constricción
- ahilado

cotiledones defectuosos en una extensión tal que más del 50 % del tejido original no funciona normalmente:

- dañados
- separados o ausentes
- decolorados o necróticos
- vítreos
- podridos como resultado de una infección primaria

yema terminal o tejidos próximos defectuosos

◇ Plántula: una o varias de las estructuras esenciales anormales como han quedado descritas, o con el desarrollo normal impedido a causa de que la plántula considerada como un todo, es defectuosa:

- podrida como consecuencia de una infección primaria
 - cotiledones emergiendo antes que la raíz
 - deformada
 - fracturada
 - dos fusionadas
 - ahilada o vítrea
-

Una vez clasificadas las distintas plántulas se seleccionaron aleatoriamente 25 plántulas normales de cada tratamiento y se procedió a realizar los siguientes ensayos de vigor:

- 1) longitud del hipocótilo (**H**),
- 2) longitud de la raíz (**R**),

Además el vigor se determinó calculando la relación longitud de la raíz/ longitud del hipocótilo (**R/H**) y los índices de uniformidad (**SUI**) y de vigor (**IVI**) propuestos por Huang (1989) definidos por las siguientes expresiones:

$$SUI = \frac{\bar{H}^2}{\Sigma (H - \bar{H})^2}$$

$$IVI = SUI \times G$$

donde,

H = longitud individual (cm) del hipocótilo de las plántulas normales en una muestra de 25 plántulas,

\bar{H} = longitud media del hipocótilo de 25 plántulas normales,

G = porcentaje de germinación a los 10 días del inicio de la imbibición, referida a plántulas normales.

3.4. Análisis de los exudados de las semillas

3.4.1. Obtención de los exudados

Para realizar este conjunto de ensayos, a excepción de la determinación de la conductividad eléctrica, se tomaron muestras de semillas de cada tamaño sometidas a los diferentes tiempos de envejecimiento. Las muestras (1 g) se dispusieron en placas individuales a 25 °C a las que se añadió un volumen de 3,5 ml de agua desionizada. Los exudados se recogieron a las 24 horas de imbibición y se congelaron a una temperatura de -20 °C hasta su utilización. Para cada ensayo se realizaron cuatro determinaciones independientes.

3.4.2. Determinación del pH de los exudados

La determinación del pH de los exudados obtenidos se realizó mediante un pH-metro (pH M 80, Radiometer Copenhagen), a los 30 minutos y a las 24 horas de imbibición, antes de la congelación de los mismos.

3.4.3. Determinación de fósforo

Este ensayo se realizó según el método descrito por Rouser y col. (1969), basado en la reducción del fosfomolibdato a óxido de molibdeno por acción del ácido ascórbico, previa digestión ácida de las muestras con objeto de eliminar la materia orgánica presente en las mismas. Este procedimiento consiste en transferir 100 μ l de la muestra problema a tubos de vidrio especiales de paredes gruesas que contienen 0,7 ml de ácido perclórico (Panreac) al 70 %. Otros 100 μ l de agua desionizada se utilizaron como blanco. Los tubos se colocaron en un bloque compacto de aluminio termostatzado (Multibloc, P. Selecta)

a una temperatura de 200 °C durante 2 horas y posteriormente se redujo la temperatura a 100 °C durante otras 2 horas. Transcurrido ese tiempo se dejaron enfriar los tubos y se añadió un volumen igual de agua desionizada (3,5 ml).

▷ **CURVA DE CALIBRACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN LAS SOLUCIONES**

PROBLEMAS:

Se preparó una solución patrón (5 µg/ml) de fosfato monopotásico (Merk), de la que se tomaron volúmenes desde 0,1 a 2 ml. A continuación se añadieron 0,5 ml de ácido perclórico al 70 % y se ajustó el volumen de los tubos a 4 ml con agua destilada, con lo que se consiguió igualar el volumen y la acidez de los problemas y patrones. A continuación se añadieron 0,5 ml de la solución de molibdato amónico (Merk) al 2,5 % y 0,5 ml de ácido ascórbico (Sigma) al 5 %. Los tubos se mantuvieron a 100 °C en baño de agua durante 5 minutos y posteriormente se efectuaron las lecturas de la absorbancia a 800 nm, en un espectrofotómetro Hitachi U-2000, frente a un blanco de agua destilada.

3.4.4. Espectro de absorción de los exudados

El espectro de absorción de los exudados, entre 200 y 400 nm, se realizó en muestras diluidas en agua desionizada (1:10 v/v). La absorbancia de las muestras se determinó a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Hitachi, modelo U-2000.

3.4.5. Determinación de la intensidad de corriente eléctrica

La determinación de la intensidad de corriente eléctrica (ICE) de los lixiviados procedentes de las semillas sometidas a los distintos tratamientos, fue monitorizada de forma continua e individualizada durante las 24 horas siguientes al comienzo de la imbibición, mediante un Analizador Automático de semillas (ASAC-1000B, Agrosience, Ann Arbor, Michigan, USA).

3.4.4.1. Analizador automático de semillas

Un analizador automático de semillas es un equipo electrónico que permite predecir la capacidad germinativa y vigor de las semillas de acuerdo a la ICE de sus lixiviados durante el tiempo que éstas permanecen sumergidas en agua desionizada en condiciones estándar de imbibición (Agrosciences, 1984).

El analizador automático de semillas (Figs. 9 y 10) consta de los siguientes elementos:

1. **BANDEJA DE PLÁSTICO**, con 100 compartimentos o celdas individuales que permiten sumergir separadamente las semillas (Fig. 10),
2. **CABEZAL MULTISENSOR**, formado por 100 pares de electrodos, los cuales son incorporados en las celdas de la bandeja portasemillas.
3. **INTEGRADOR**, que controla la forma de actuar del electrodo y recoge los datos de cada celda individualmente.
4. **INTERFASE**, que conecta los sensores eléctricos y el microprocesador.
5. **MICROPROCESADOR**, que permite la entrada/salida de datos, la representación de los resultados y el análisis estadístico descriptivo de los datos.
6. **IMPRESORA**, u otros periféricos.

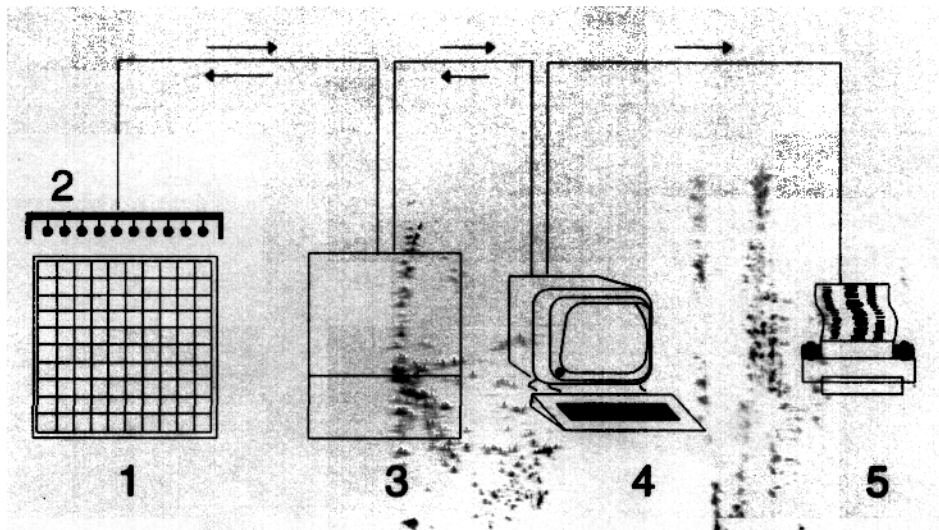
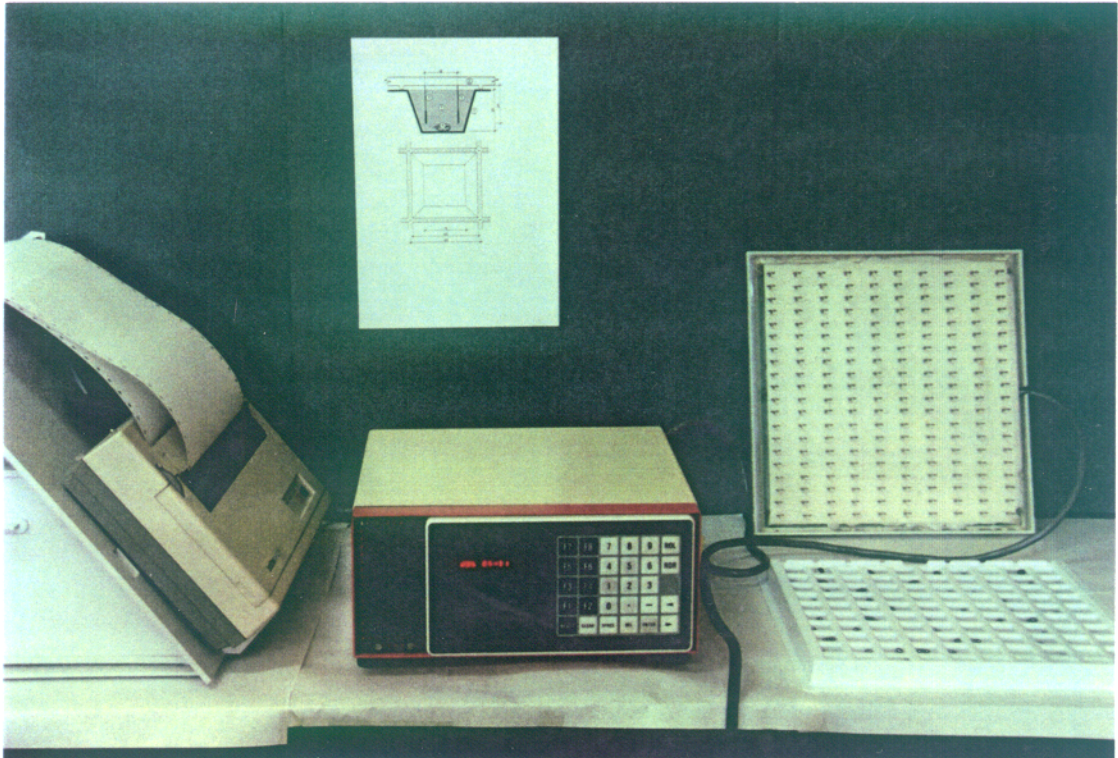


Figura 9. Esquema de analizador automático de semillas (ASAC-1000B): 1, bandeja de plástico para la inmersión de 100 semillas de forma individual; 2, cabezal con 100 pares de electrodos; 3, interfase; 4, microprocesador; 5, impresora.

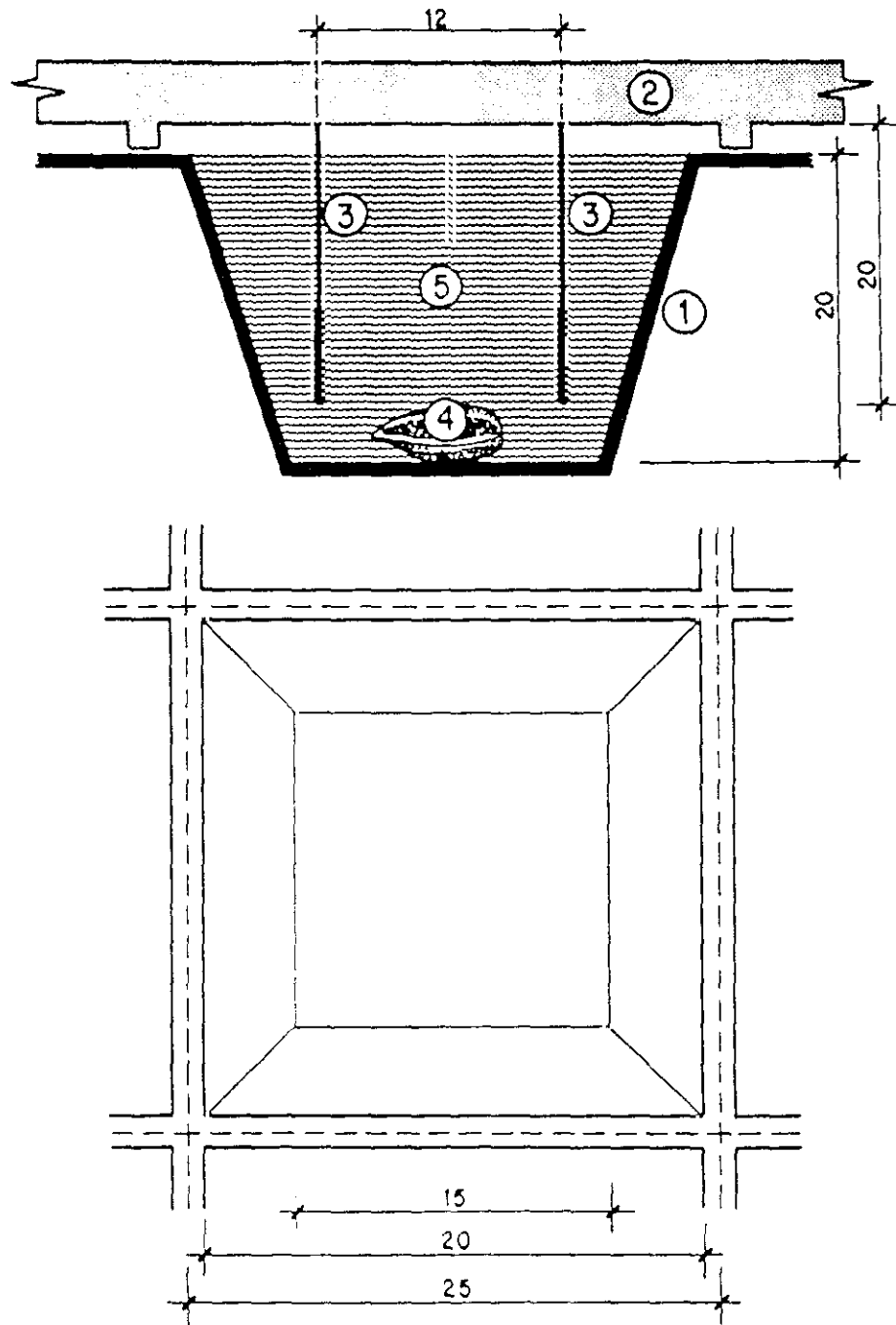


Figura 10. Representación esquemática de cada una de las celdas (dimensiones en mm) utilizadas para medir la intensidad de corriente eléctrica de los exudados procedentes de las semillas de girasol: 1. celda, 2. cabezal portaelectrodos, 3. electrodo, 4. semilla y 5. exudado.

3.4.4.2. Preparación de las muestras

Para medir la intensidad de corriente eléctrica, 100 semillas, completas o previamente desprovistas de pericarpio, fueron colocadas en las bandejas de plástico del equipo ASAC-1000B (Fig. 9) a razón de un aquenio por celda. Para asegurar una lectura uniforme, a cada celda se añadió igual volumen (3,5 ml) de agua desionizada (obtenida a partir de un destilador Millipore.- milli Q) con objeto de obtener lecturas comparables en condiciones de laboratorio. Con el fin de lograr la máxima homogeneidad, las semillas fueron sumergidas en cada celda con un dosificador-dispensador calibrado de acuerdo con el tamaño de las semillas. El cabezal multisensor portaelectrodos fue colocado adecuada y cuidadosamente en la bandeja, situándose todo el conjunto en un baño termostatzado a 25 °C con el fin de mantener constante la temperatura durante el período de imbibición.

3.4.4.3. Lectura automática de la intensidad de corriente eléctrica

La lectura automática de la ICE mediante el equipo ASAC-1000B se realiza una vez preparadas adecuadamente las muestras. Este equipo fue programado para trabajar con una diferencia de potencial 1 voltio, que se consideró el voltaje más adecuado para este tipo de semilla, según los estudios realizados previamente (de Paula y col., 1994). El autoanalizador ASAC-1000B fue programado para que las lecturas fueran realizadas durante 24 horas a intervalos de 120 minutos, excepto durante las 4 primeras horas de imbibición que se realizaron a intervalos de 60 minutos.

3.5. Cinética de captación de agua

La cinética de captación de agua se realizó por seguimiento durante 12 horas del incremento de peso de las semillas determinada cada 60 minutos. Este ensayo se realizó con semillas (SP y SG) control (almacenadas a temperatura ambiente) y envejecidas

durante 11 días. El tamaño de la muestra fue de 25 semillas. Cada grupo de semillas se colocó en una placa, entre dos hojas de papel Whatman n° 1 humedecida con 10 ml de agua desionizada.

3.6. Determinación de malondialdehido

La determinación de malondialdehido como producto final del proceso de peroxidación lipídica se realizó según el método descrito por Cakmak y Horst (1991) en semillas secas e hidratadas.

Se tomaron 0,5 g de semillas, libres de pericarpio, que se homogenizaron en frío con 3 ml de agua destilada. Posteriormente, se añadieron otros 3 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma) al 0,5 % disuelto en ácido tricloroacético (TCA, Sigma) preparado al 20 %. Las muestras así preparadas se dispusieron en un baño a 95 °C durante 30 minutos, formándose un compuesto de color rojo correspondiente a la cantidad de malondialdehido que reacciona con el TBA. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción colocando los tubos en un baño de hielo y posteriormente fueron centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante recogido se utilizó para la determinación espectrofotométrica a 532 nm, sustrayendo la absorción inespecífica a 600 nm. La cantidad de malondialdehido de las muestras se calculó a partir del coeficiente de extinción molar $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7. Determinación de antioxidantes

Este epígrafe desarrolla la metodología de un grupo de ensayos enzimáticos y no enzimáticos utilizado como medida de la capacidad antioxidante presente en los tejidos. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando semillas secas e hidratadas de los dos pesos considerados. El tiempo de imbibición fue de 4 y 12 horas para las SP y SG respectivamente, que permite la completa hidratación de los tejidos. Las semillas sometidas

a estos períodos de hidratación se encuentran en fase pregerminativa (Raymond y col., 1992).

3.7.1. Antioxidantes no enzimáticos

3.7.1.1. Determinación de ácido ascórbico reducido y total

La determinación de ácido ascórbico (AA) se realizó mediante el método descrito por Wang y col. (1991). El ensayo se basa en la reducción del ion férrico a ion ferroso por ácido ascórbico en solución ácida, seguido de la formación de un quelato rojo entre el ion ferroso y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batofenantrolina), que absorbe a 534 nm. La determinación del nivel de ácido ascórbico total (AA más ácido dehidroascórbico) se realizó mediante la reducción del ácido dehidroascórbico (DH) a AA por la acción del ditiotreitól.

Para la determinación tanto de ácido ascórbico total como reducido se homogenizaron en frío (4 °C) 0,5 g de semillas en 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y 80 mg de polivinilpirrolidona insoluble (PVP, Serva). El homogenado se centrifugó 16.000 x g (Kontron Hermile Centrikon, modelo H-401) durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante recogido se utilizó para los correspondientes ensayos.

⇒ CURVA DE CALIBRADO:

Se prepararon soluciones estándar de AA (Sigma) en TCA al 5 %, a concentraciones variables (desde 0 a 10 μ mol).

a) ACIDO ASCÓRBICO:**⇒ MEZCLA DE REACCIÓN:**

Se tomaron 100 μl de sobrenadante y se añadieron 500 μl de etanol absoluto, 300 μl de TCA al 50 %, 150 μl de H_3PO_4 al 0,4 % (v/v) en etanol, 300 μl de batofenantrolina al 0,5 % (p/v) en etanol, y 150 μl de Cl_3Fe al 0,03 % (p/v) en etanol. La mezcla de reacción (1,5 ml) se mantuvo durante 90 minutos a 30 °C para permitir la formación del complejo Fe^{2+} -batofenantrolina, y posteriormente se midió la absorbancia a 534 nm.

b) ACIDO ASCÓRBICO TOTAL:**↳ MEZCLA DE REACCIÓN:**

Se toman 100 μl de sobrenadante y se añadieron 150 μl de ditioneol 3,89 mM y 350 μl de etanol absoluto. La mezcla de reacción (0,6 ml) se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la reducción del DH a AA. A continuación se añadieron 150 μl de N-etilmaleimida al 0,24 % en etanol y 150 μl de TCA al 20 %. Para el desarrollo del color se añadieron 150 μl de H_3PO_4 al 0,4 % (v/v) en etanol, 300 μl de batofenantrolina al 0,5 % (p/v) en etanol y 150 μl de Cl_3Fe al 0,03 % (p/v) en etanol. Una vez adicionados todos los reactivos, se mantuvo la mezcla de reacción (1,5 ml) durante 90 minutos a 30 °C, realizándose la lectura de la absorbancia a 534 nm.

⇒ CÁLCULOS:

Para cada grupo de extractos se realizó la correspondiente curva patrón representando los valores de absorbancia a 534 nm de las soluciones estándar frente a sus concentraciones. La ecuación de la recta obtenida permite calcular la concentración de AA.

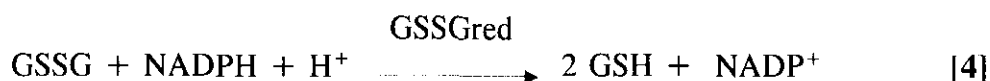
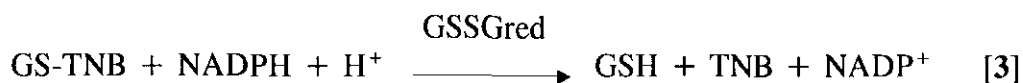
3.7.1.2. Determinación de glutatión total, y de sus formas reducida y oxidada

La determinación de los niveles de glutatión se realizó por el método de Griffith (1980), basado en la reacción específica con el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB). La secuencia de reacciones se inicia cuando el GSH reacciona no enzimáticamente con el DTNB rindiendo GSSG y ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) [1] y [2]:

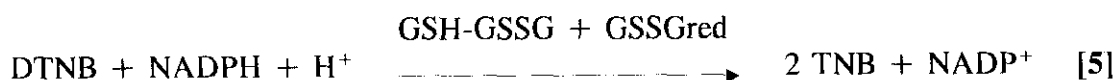


Dado que el DTNB es un reactivo de grupos tiólicos, su inespecificidad frente al GSH da lugar a distintas interferencias por parte de la cisteína, por lo que es necesario realizar un acoplamiento de reacciones que haga el método específico para el glutatión.

El GS-TNB y GSSG formado en esta primera reacción, más el existente en el extracto, son reducidos por la glutatión reductasa, la cual necesita un aporte de NADPH para su funcionamiento [3] y [4]:



En esta reacción se vuelve a generar GSH que reacciona nuevamente con el exceso de DTNB, entrando de forma sucesiva en un ciclo de reacciones enzimáticas y no enzimáticas hasta el consumo de DTNB o NADPH ya que el GSSG, GSH y GSSGred permanecen en el medio, lo que se traduce en una reacción global [5]:



Las concentraciones de DTNB, NADPH y GSSGred se eligieron para que la reacción [5] sea proporcional y lineal (que la enzima se encuentre a saturación de sustrato y exista DTNB en exceso para reaccionar con todo el GSH) a la concentración de glutatión total.

La formación del producto final TNB se siguió espectrofotométricamente a 412 nm utilizando un espectrofotómetro Uvikon-810.

Para las determinaciones de glutatión total y GSSG, se homogenizaron en frío 0,5 g de semillas libres de pericarpio con 4 ml de ácido 5-sulfosalicílico al 5 % (p/v). El homogenado obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante recogido se dividió en dos alícuotas que se utilizaron en estas determinaciones.

a) GLUTATION TOTAL:

↳ Curva de calibración:

Se prepararon soluciones estándar a partir de GSH comercial (Boeringer-Manheim) cuyas concentraciones en la cubeta estaban comprendidas entre 0,5 y 3 nmol.

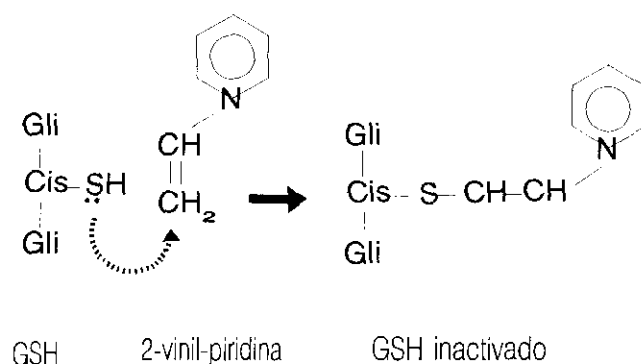
↳ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por: 700 μl de tampón fosfato 0,125 M que contenía EDTA 6,3 mM; 100 μl de DTNB 6 mM disuelto en tampón fosfato, y muestra problema (diluida 1:4) o soluciones estándar a volúmenes variables hasta un máximo de 200 μl . La adición de los reactivos de la mezcla se realizó manteniendo el orden fijado hasta la estabilización de la absorbancia. A continuación se inició la reacción por adición de 5 μl de GSSGred (Boeringer-Manheim) diluida en tampón fosfato, que

corresponden a 1 unidad de enzima (cantidad de enzima que consume 1 μmol de NADPH por minuto).

b) **GSSG:**

El método utilizado para la determinación del glutathion total consiste básicamente en oxidar el GSH inicial a GSSG, que una vez formado, conjuntamente con el GSSG existente en el extracto queda expuesto a una serie de reacciones. Una modificación del método consiste en eliminar el GSH reducido del medio mediante inactivación del grupo -SH en una reacción de derivación con 2-vinilpiridina. De esta forma, en el medio está presente el GSSG original del extracto:



Para la inactivación del GSH se añadieron 2 μl de 2-vinilpiridina y 6 μl de trietanolamina al 70 % por cada 100 μl de sobrenadante, manteniendo el pH entre 6-7. La muestra se agitó fuertemente durante 1 minuto y a continuación se mantuvo a 25 $^{\circ}\text{C}$. Después de 60 minutos se detiene la reacción por introducción de los extractos en un baño de hielo.

⇒ Curva de calibración:

Se prepararon soluciones estándar a partir de GSSG comercial, que fueron sometidas al mismo proceso descrito para los extractos, y cuyas concentraciones en la cubeta estaban comprendidas entre 0,1 y 0,6 nmol.

⇒ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción es la misma que la utilizada en la determinación de glutatión total, salvo que por ser las concentraciones de GSSG endógeno, en condiciones normales, unas 10 veces menores a las de GSH, la reacción se inició con la adición de 20 μ l de GSSGred que corresponden a 4 unidades de enzima.

⇒ Cálculos:

Para cada grupo de extractos se realizó la correspondiente curva patrón, que se obtuvo representando los valores del $\Delta A/\Delta t$ a 412 nm frente a las concentraciones de las soluciones estándar. En cada caso, la ecuación de la recta obtenida permite calcular la concentración de glutatión total y GSSG. El GSH se determinó por diferencia, según la ecuación:

$$[\text{GSH}] = [\text{Glutacion total}] - [\text{GSSG}]$$

3.7.2. Antioxidantes enzimáticos

3.7.2.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La determinación de la actividad SOD se realizó según el método descrito por Giannopolitis y Ries (1977), basado en la producción fotoquímica de $\text{O}_2^{\cdot -}$, que reduce el NBT ("nitro blue tetrazolium") a formazán azul. En presencia de SOD la reacción es inhibida y el porcentaje de inhibición permite cuantificar la enzima.

Para la producción fotoquímica de $\text{O}_2^{\cdot -}$ es necesaria la presencia de un fotosensibilizador (riboflavina). Esta sustancia es activada por un fotón, pasando a estado excitado; de esta forma oxida a un donador de electrones (metionina) y pasa a la forma de semiquinona, que reduce el oxígeno a $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Beyer y Fridovich, 1987).

La preparación del extracto enzimático se realizó en frío (4 °C) mediante la homogenización de 0,5 g de semillas (libres de pericarpio) con 5 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH =7,8) que contenía EDTA 0,1 mM. El homogenado se centrifugó a 13.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido participa en el medio de reacción.

⇒ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 10 μ l de riboflavina (Sigma) 0,4 mM, 50 μ l de metionina (Sigma) 78 mM, 40 μ l de NBT (Sigma) 4,73 mM y 50 μ l de carbonato sódico (pH=10,2) 0,3 M. Se añadió una cantidad de extracto comprendida entre 25 y 200 μ l y el volumen final se llevó a 3ml con tampón fosfato.

Las mezclas fueron iluminadas en cubetas de espesor uniforme y como blanco se utilizaron mezclas idénticas no iluminadas. Como fuente luminosa se emplearon tubos fluorescentes que proporcionaban una luz uniforme sobre todas las muestras. La reacción era iniciada y finalizada por encendido y apagado de la fuente luminosa. No se detectó reacción bajo la luz ambiental durante la preparación de las soluciones y la medida espectrofotométrica.

La velocidad inicial de la reacción era determinada por el incremento de la absorbancia a 560 nm a una temperatura constante de 25 °C. Bajo las condiciones descritas, el incremento de absorbancia en ausencia de SOD fue de 0,100 a los 5 minutos, que se mantuvo linealmente hasta los 15 minutos. En presencia del extracto enzimático la reacción es inhibida y el porcentaje de inhibición es utilizado para cuantificar la enzima.

⇒ Unidades:

Beauchamp y Fridovich (1971) definieron 1 unidad de SOD como la cantidad de enzima que inhibe la fotorreducción del NBT al 50 % y cuantificaron la enzima en función del porcentaje de inhibición que causaba. Sin embargo, el porcentaje de inhibición no es lineal respecto a la concentración de SOD. Giannopolitis y Ries (1977) observaron, en el

sistema de medida descrito, una relación lineal entre la concentración de SOD y la velocidad de la reacción en presencia y ausencia de enzima, según la ecuación:

$$V/v = 1 + k' [\text{SOD}]$$

donde,

V = velocidad máxima de la reacción, en ausencia de enzima

v = velocidad de la reacción en presencia de enzima

Esta ecuación puede expresarse también como:

$$k'[\text{SOD}] = (V/v) - 1$$

Cuando el porcentaje de inhibición es del 50 % ($V/v = 2$), el producto $k'[\text{SOD}]$ se iguala a la unidad. Si la unidad SOD se redefine como la cantidad de enzima para la cual $k'[\text{SOD}]$ es igual a la unidad, entonces la actividad SOD puede ser determinada directamente del cociente V/v de acuerdo con la ecuación:

$$\text{SOD (U/g)} = [(V/v) - 1] d$$

donde,

d = factor de dilución de la muestra

La constante k' , que corresponde a la pendiente de la línea en la representación de la concentración de SOD frente a V/v , es función de la concentración de NBT y de la afinidad de la SOD por los iones superóxido.

3.7.2.2. Determinación de la actividad catalasa

La actividad enzimática de la catalasa se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1983). El método se basa en el seguimiento del descenso de la absorbancia a 240 nm debido a la descomposición de H₂O₂.



La cinética de la CAT no obedece a un modelo normal, ya que, a diferencia de las enzimas que se determinan a saturación de sustrato, la descomposición enzimática del H₂O₂ es una reacción de primer orden. Por un lado no es posible saturar la enzima con el sustrato dentro de un rango de concentraciones factible (hasta 5 M) y por otra parte existe una rápida inactivación de la enzima a concentraciones de H₂O₂ superiores a 100 mM, cuando el compuesto I (enzima-H₂O₂) activo es convertido en el compuesto II (véase el apartado 1.5.2.2.). La medida de la actividad a saturación de sustrato es por consiguiente, imposible.

Como la energía de activación para la descomposición de H₂O₂ catalizada por la CAT es muy baja, existe sólo una ligera dependencia de la temperatura, de manera que las medidas pueden realizarse entre 0 y 37 °C. Sin embargo, es recomendable trabajar a temperatura ambiente por la posible inactivación de la enzima a temperaturas elevadas. Se fijó como temperatura de trabajo 25 °C, manteniendo las cubetas termostalizadas a esa temperatura durante todo el tiempo de medida.

Todas las soluciones deben estar exentas de metales, que podrían catalizar la descomposición del H₂O₂, lo que sobreestimaría entonces la actividad CAT; por ello el agua utilizada en las soluciones fue de máxima pureza.

↳ Preparación del extracto enzimático:

0,5 g de semillas, libres de pericarpio, fueron homogenizadas en frío con 5 ml de tampón fosfato 25 mM (pH=7,0). El homogenado se centrifugó luego a 14.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante recogido se utilizó para la determinación de la actividad enzimática.

↳ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 500 μ l de tampón fosfato 50 mM (pH=7,0) y 400 μ l de enzima (diluida 1:10). La reacción se inició con la adición de 100 μ l de H₂O₂ 100 mM, determinándose la actividad catalítica por monitorización del descenso de absorbancia a 240 nm.

3.7.2.3. Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation

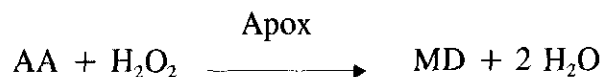
Para la determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, a excepción de la glutatión reductasa, se realizó según el método descrito por Cakmak y col., (1993), utilizando el mismo extracto enzimático.

↳ Extracto enzimático:

1 g de semillas, libres de pericarpio, fueron homogenizadas en 10 ml de tampón EPPS (ácido N-2-hidroxietilpiperazin propano sulfónico, Sigma) 25 mM que contenía EDTA 0,2 mM y polivinilpirrolidona al 2 %. El homogenado obtenido se centrifugó posteriormente a 18.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante recogido se utilizó para las determinaciones enzimáticas.

3.7.2.3.1. Ascorbato peroxidasa

La determinación de ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) se basa en la monitorización de la velocidad de oxidación del ácido ascórbico a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 25 °C, según la reacción:



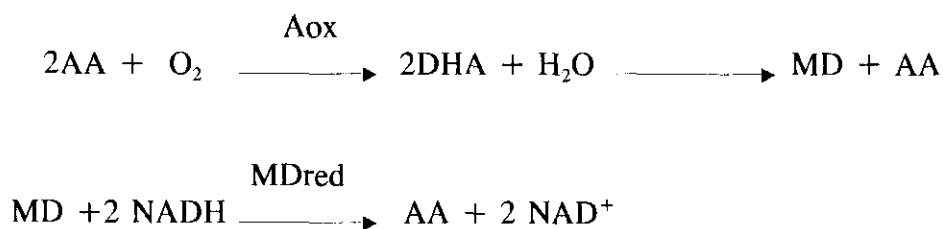
⇒ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 500 μl de tampón fosfato (pH=7,0) 50 mM que contenía EDTA 0,2 mM, 100 μl de ascorbato 2,5 mM y extracto enzimático. Para detectar la presencia de ascorbato oxidasa, que puede interferir la reacción, se determinó el incremento de la absorbancia a 25 °C. Posteriormente se inició la reacción por adición de 100 μl de H_2O_2 10 mM.

Para comprobar si la destrucción del H_2O_2 por la catalasa afecta a la reacción, se realizó un ensayo paralelo en el que se añadió aminotriazol 5mM, inhibidor específico de la catalasa, al extracto enzimático.

3.7.2.3.2. Monodehidroascorbato reductasa

En la determinación de la monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4) se utiliza la enzima ascorbato oxidasa (Aox) para producir dehidroascorbato, que de forma no enzimática se dismuta formando MD y AA.



La actividad enzimática se determinó por monitorización de la oxidación de NADH ($\epsilon=6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por medida del descenso de absorbancia a 340 nm.

↳ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 500 μl de tampón EPPS 50 mM (pH=7,8) que contenía EDTA 0,4 mM, 100 μl de ácido ascórbico 1mM, 0,5 unidades de ascorbato oxidasa, 100 μl de NADH 1 mM y extracto enzimático, hasta completar un volumen final de 1 ml.

3.7.2.3.3. Dehidroascorbato reductasa

La actividad de la enzima dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1) se determinó por monitorización del incremento de absorbancia a 265 nm debido a la formación de ascorbato ($\epsilon=14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), según la reacción:

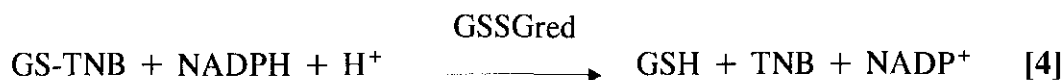
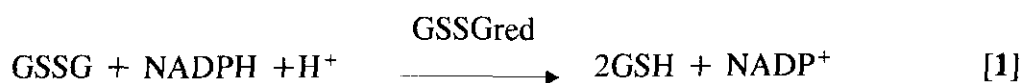


↳ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 500 μl de tampón fosfato (pH=7,0), 100 μl de GSH 35 mM y 100 μl de DHA 4mM, iniciándose la reacción por adición del extracto enzimático. Para minimizar el efecto de la reducción no enzimática del DH por GSH, la reacción se realizó a pH 7, desarrollándose paralelamente un ensayo blanco, sin enzima, para cuantificar dicha reacción y evitar que enmascarase la reacción principal.

3.7.2.3.4. Glutation reductasa

La determinación de la actividad enzimática de la glutatión reductasa (EC 1.6.4.2) se realizó según el método de Smith y col. (1988), más adecuado para tejidos vegetales que la medida tradicional del descenso de absorbancia a 340 nm por consumo de NADPH. El ensayo se basa en el incremento de absorbancia a 412 nm cuando el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma) es reducido por GSH para producir ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), según las siguientes ecuaciones:



Si bien este ensayo no puede utilizarse para la caracterización cinética de la enzima, debido a que presenta diferente afinidad (diferente Km) para GSSG y GS-TNB, presenta, no obstante, diversas ventajas para las determinaciones en extractos vegetales crudos. La absorbancia basal de los extractos vegetales es menor a 412 nm que a 340 nm; el incremento de absorbancia a 412 nm, en respuesta a una misma cantidad de enzima, es muy superior al descenso de absorbancia que se observa a 340 nm y por último, este ensayo es muy específico para la GSSGred, por lo que no está influido por la presencia de otras enzimas dependientes de NADPH.

⇒ Preparación del extracto enzimático:

El extracto enzimático se preparó a partir de 0,5 g de semillas, libres de pericarpio, que fueron homogenizadas en frío con 5 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH = 7,5) que contenía EDTA 0,5 mM. El homogenado se centrifugó a 20.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante recogido se utilizó para la determinación de la actividad enzimática.

⇒ Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 500 μ l de tampón fosfato potásico 0,2 M (pH = 7,5) conteniendo EDTA 1 mM, 250 μ l de DTNB (Sigma) 3 mM disuelto en tampón fosfato potásico 0,01 M a pH 7,5, 50 μ l NADPH (Boeringer-Manheim) 2 mM, 50 μ l de H₂O y 200 μ l de extracto enzimático. La reacción se inició con la adición de 50 μ l de GSSG 20 mM y la actividad catalítica se midió a 25 °C por monitorización del incremento de absorbancia a 412 nm, utilizando un espectrofotómetro Uvikon 810.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), utilizándose los siguientes modelos: 1) diseños jerárquicos con un sólo factor y, 2) diseños factoriales con dos factores principales, siendo los modelos matemáticos que los representan los siguientes:

1.- Modelo jerárquico: $x_{ij} = \mu + A_i + \epsilon_{i(j)}$

donde,

x_{ij} = variable estudiada

μ = media general

A_i = efecto del factor principal

$\epsilon_{i(j)}$ = error experimental

2.- Modelo factorial: $x_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{K(ij)}$

donde,

x_{ij} = variable estudiada

μ = media general

A_i = efecto debido al factor principal A

B_j = efecto debido al factor principal B

AB_{ij} = efecto debido a la interacción A x B

$\epsilon_{K(ij)}$ = error experimental

Los porcentajes de germinación que intervinieron en los análisis de varianza fueron previamente normalizados mediante la transformación angular de Bliss [$y = \arcsen (\bar{x}/100)^{1/2}$], tomándose como niveles de significación los siguientes: $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ y $P \leq 0,001$ para las diferencias significativas y NS para las no significativas.

Siempre que fue necesaria la comparación de medias, la menor diferencia significativa (MSD) se calculó a partir del test múltiple de Duncan para el nivel de significación (α) encontrado en el correspondiente análisis de varianza, estimado de la siguiente forma:

$$MSD = k [(CM/n)^{1/2}]$$

donde,

k = valor de la tabla Duncan para el nivel de significación α y los grados de libertad del término de comparación

CM = cuadrado medio del término de comparación

n = número de observaciones dentro de cada tratamiento

El análisis de regresión no lineal se llevó a cabo mediante el empleo del programa BMDP-AR y el análisis de la varianza se realizó con el programa BMDP-2V (Universidad de California).

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidad y vigor de las semillas de girasol

4.1.1. Ensayos de germinación

La cuantificación de la germinación se realizó cada 24 horas durante el período de imbibición (10 días) recomendado por la ISTA (1985) para esta especie, considerándose germinadas aquellas semillas que presentaron una radícula de longitud superior a 0,5 cm. Los resultados, expresados como porcentaje de germinación acumulado, se muestran en la Figura 11. La germinación final, en ambos tipos de semillas, no difiere significativamente ($P \geq 0,05$) de la presentada a los 4 días (Tabla 8).

En la Figura 12 se representa el porcentaje final (valores normalizados) de semillas germinadas, en función del tiempo de envejecimiento, donde se observa que la germinación de las SP es superior a la de las SG y que ambos tipos de semillas responden de diferente manera al tratamiento, lo cual se manifiesta fundamentalmente a partir del tercer día de envejecimiento. El análisis estadístico de estos resultados refleja que las diferencias encontradas son debidas tanto al tiempo de envejecimiento como al tamaño de las semillas (Tabla 9).

Las diferencias en la capacidad germinativa se ponen de manifiesto por una disminución del porcentaje final de emergencia de la radícula y por un retraso de la germinación. El primero de estos efectos se puede observar en la Figura 12, donde se advierte que las condiciones de envejecimiento afectan al porcentaje final de germinación de forma dosis dependiente. A corto plazo se puede observar un incremento importante de este parámetro, tanto en las SP como en las SG. El mantenimiento de las condiciones de envejecimiento durante períodos superiores a 1 día para las SP y de 3 días para las SG

producen un marcado descenso del número de semillas germinadas. El efecto dosis dependiente de las condiciones de envejecimiento en la capacidad germinativa se refleja por la alta correlación que presentan estos dos parámetros tanto en las SP ($r = -0,8320^{***}$) como en las SG ($r = -0,7622^{***}$). El análisis estadístico de los resultados (Tabla 10) muestra que el tiempo de envejecimiento artificial afecta de forma muy significativa a la capacidad germinativa de cada uno de los tipos de semillas.

El segundo de los efectos señalados se muestra en las Figuras 13 y 14, que reflejan las variaciones en la velocidad de germinación de las SP y SG, respectivamente. En el primer caso, las semillas envejecidas durante 1, 3, 5 y 7 días germinan de manera uniforme a los dos días de la siembra, mientras que el envejecimiento prolongado durante 11 días afecta de una forma importante a este parámetro. En este período, el mayor número de semillas germinadas se mantiene en el segundo día de imbibición, pero se aprecia un desplazamiento en el día de aparición de la radícula. Las SG, por el contrario, presentan un comportamiento distinto, que da lugar a dos grupos diferenciados de semillas: a) las semillas no tratadas y las sometidas a 1 y 3 días de envejecimiento germinan mayoritariamente durante el segundo día de imbibición, aunque en el tercer día aparece también un porcentaje importante de semillas con radícula visible, y b) las semillas tratadas durante 5, 7 y 11 días de envejecimiento no germinan de manera uniforme ya que el número máximo de semillas germinadas se desplaza hacia el tercer día de imbibición, haciéndose más evidente este desplazamiento cuanto mayor es el tiempo de tratamiento.

El retraso de la germinación, definido por el tiempo medio de germinación (TMG), se presenta en la Figura 15 y en las Tablas 11 y 12 que resumen el análisis estadístico de los resultados obtenidos. Se puede observar en primer lugar que, en todos los casos, las SP germinan más rápidamente que las SG (Fig. 15), presentándose diferencias muy significativas entre ambos tipos de semillas (Tabla 11). Por otra parte, el envejecimiento afecta a las SG aumentando de forma drástica el tiempo medio de germinación, mientras que en las SP sólo se observa un ligero incremento de este parámetro en las semillas más envejecidas, siendo en ambos casos estadísticamente significativo (Tabla 12). La

separación de medias por el test múltiple de Duncan se muestra en la Figura 15, donde se observa que el envejecimiento produce un aumento significativo del TMG de las SP en el día 11 de tratamiento, mientras que en las SG, 5 días son suficientes para alterar significativamente este parámetro. Asimismo, en ambos casos se obtienen buenas correlaciones entre el TMG y el tiempo de envejecimiento ($r=0,8123^{***}$ y $r=0,8719^{***}$, para las SP y SG, respectivamente).

Una vez finalizado el período de germinación (a los 10 días), se procedió a la evaluación y cuantificación del número de plántulas en cada uno de los tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, donde se presenta el número de plántulas normales y anormales, así como las semillas muertas que aparecen en cada ensayo de germinación. Esta diferenciación es necesaria puesto que el número de plántulas normales representa la viabilidad de las semillas de forma más rigurosa que la cuantificación de las semillas que han culminado su proceso germinativo. En este sentido, resulta interesante comentar que las diferencias encontradas entre el porcentaje de semillas que han alcanzado la *protrusión radicular* y las semillas que posteriormente dan lugar a plántulas normales (viables) corresponden lógicamente a las plántulas anormales y son las responsables de la sobreestimación de la viabilidad que se produce cuando el conteo se realiza a tiempos cortos de imbibición. Esta sobreestimación sería más evidente en las SG puesto que, al final del período germinativo, presentan mayor número de anormalidades (Fig. 16B).

El análisis estadístico del número de plántulas normales y anormales y de semillas muertas, muestra diferencias muy significativas (Tabla 13) entre los dos tipos de semillas, respecto a las dos fuentes de variación analizadas.

En la Figura 16A se puede observar que el número de plántulas normales procedentes de las SP sometidas a las condiciones de envejecimiento, disminuye gradualmente a medida que se incrementa el tiempo de envejecimiento. Este descenso es estadísticamente significativo ($P \leq 0,001$) y muy evidente en las semillas tratadas durante 11 días, donde el porcentaje de plántulas normales se reduce un 38 %. Paralelamente, se

detecta un aumento del número de semillas muertas, mientras que las plántulas anormales se mantienen por debajo del 20 % en todos los casos, sin incrementos significativos ($P \geq 0,05$) por efecto del tratamiento (Tabla 14). Por el contrario, las SG (Fig. 16B) disminuyen su viabilidad por efecto del envejecimiento de una forma mucho más drástica, la cual se hace más evidente a partir del día 3 de tratamiento. Esta significativa disminución ($P \leq 0,001$) viene acompañada por un ligero aumento del número de plántulas anormales ($P \leq 0,05$) y por un incremento mucho más importante y significativo ($P \leq 0,001$) del número de semillas muertas. Las Tablas 14 y 15, recogen el estudio estadístico anteriormente señalado y en la Figura 17 se presentan los principales tipos de anormalidades observadas. Las lesiones, deformaciones y podredumbres se localizaron a nivel de raíz, hipocótilo y de plántula completa, siendo los tejidos de reserva, representados por los cotiledones, los menos afectados por el tratamiento.

Por otra parte, hay que señalar que las semillas sometidas a las condiciones de envejecimiento acelerado durante cortos períodos de tiempo presentaron un incremento significativo del número de plántulas normales respecto a las semillas no tratadas, con la consiguiente disminución del número de semillas muertas. Este efecto es más evidente en las SP envejecidas durante 1, 3 y 5 días, las cuales presentaron un porcentaje de plántulas normales superior o igual al de las semillas no envejecidas. En cambio, este efecto sólo se detecta en las semillas de mayor tamaño almacenadas durante 1 y 3 días.

Los resultados porcentuales de estos ensayos de germinación, normalizados según la transformación angular de Bliss, se utilizaron para realizar el análisis estadístico anteriormente comentado y se muestran de esta forma en la Figura 18. El tiempo de envejecimiento presenta una buena correlación con la presencia de plántulas normales, anormales y semillas muertas. Las ecuaciones que definen la relación lineal entre estas variables se presentan en la Tabla 16.

La evaluación de la capacidad germinativa se realizó periódicamente en las semillas almacenadas a temperatura ambiente con objeto de detectar la posible existencia de un envejecimiento natural en el material biológico utilizado. Los resultados se muestran en la Figura 19, donde se observa que la viabilidad de estas semillas se mantiene con ligeras variaciones durante el período de experimentación. Sin embargo, hay que señalar que las SP presentan menores alteraciones que las SG durante el tiempo de almacenamiento, comportándose en este sentido de forma semejante a la observada durante el proceso de envejecimiento acelerado.

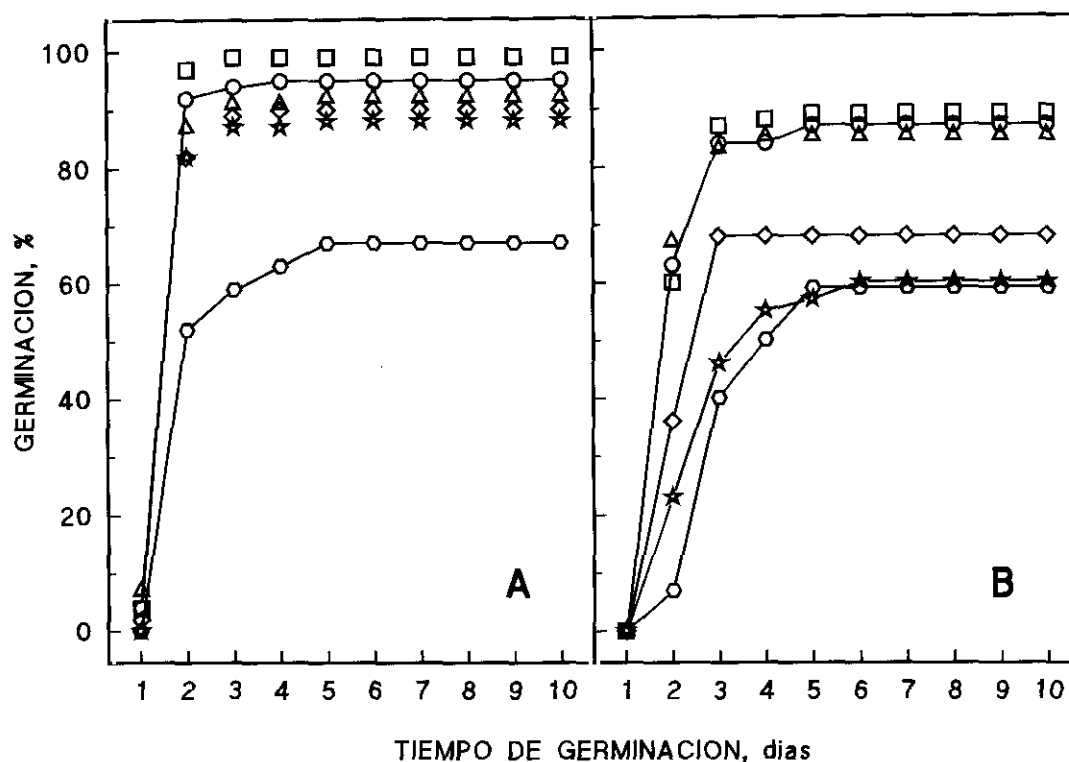


Figura 11. Evolución del porcentaje de germinación acumulado durante los 10 días de incubación en condiciones de laboratorio (ISTA, 1985) de las semillas de girasol cv. Peredovik artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR). **A**, SP; **B**, SG. Semillas no tratadas (círculos), y envejecidas durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (cuadrados, triángulos, rombos, estrellas y hexágonos, respectivamente). Cada punto representa la media de cuatro repeticiones independientes, cada una con 25 semillas.

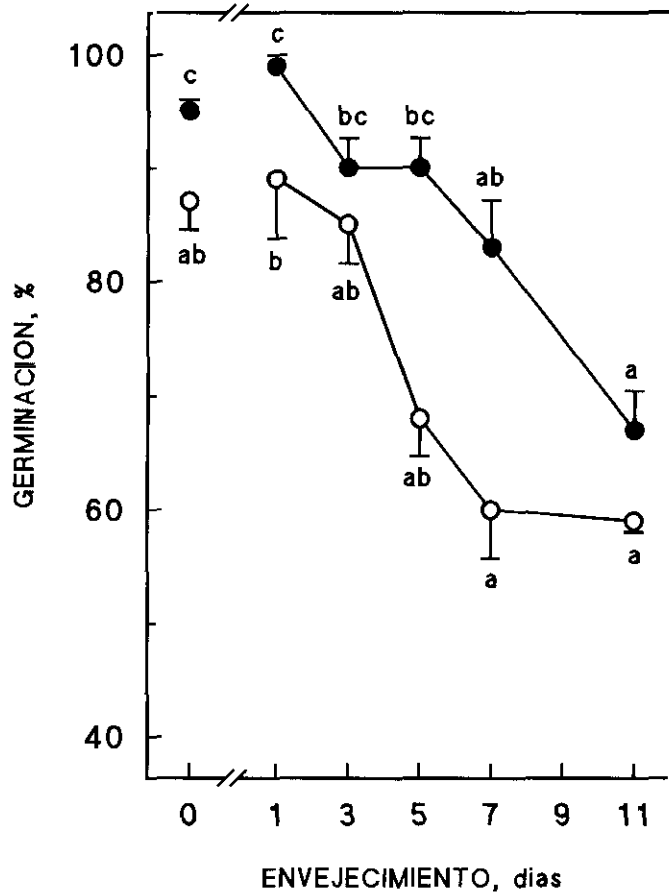


Figura 12. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el porcentaje semillas de girasol cv. Peredovik germinadas a los 10 días de incubación a 25 °C. Círculos negros, SP; círculos blancos, SG. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Para cada tipo de semilla, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 10).

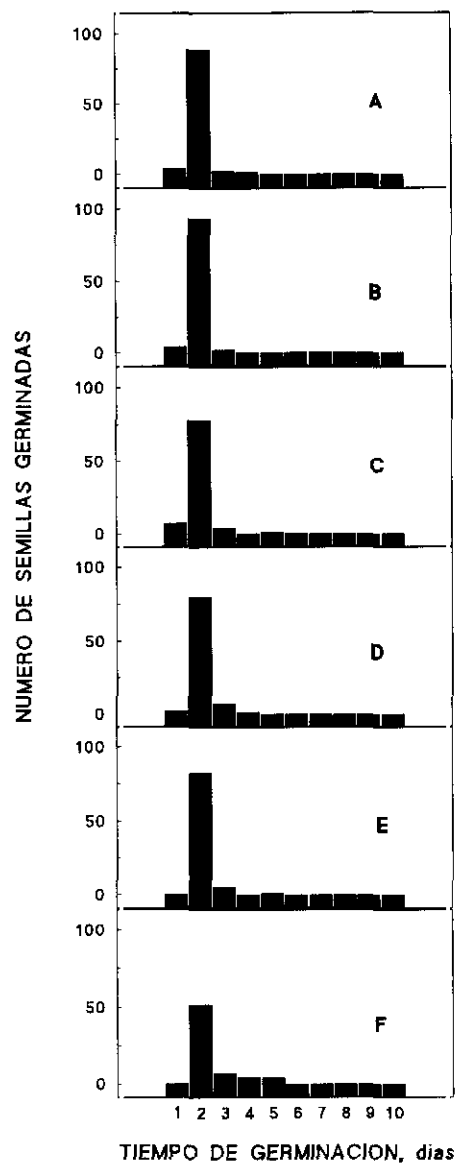


Figura 13. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el número de semillas (SP) germinadas en cada uno de los 10 días de incubación en condiciones de laboratorio. Semillas no tratadas (A) y semillas envejecidas durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (B, C, D, E y F, respectivamente).

RESULTADOS

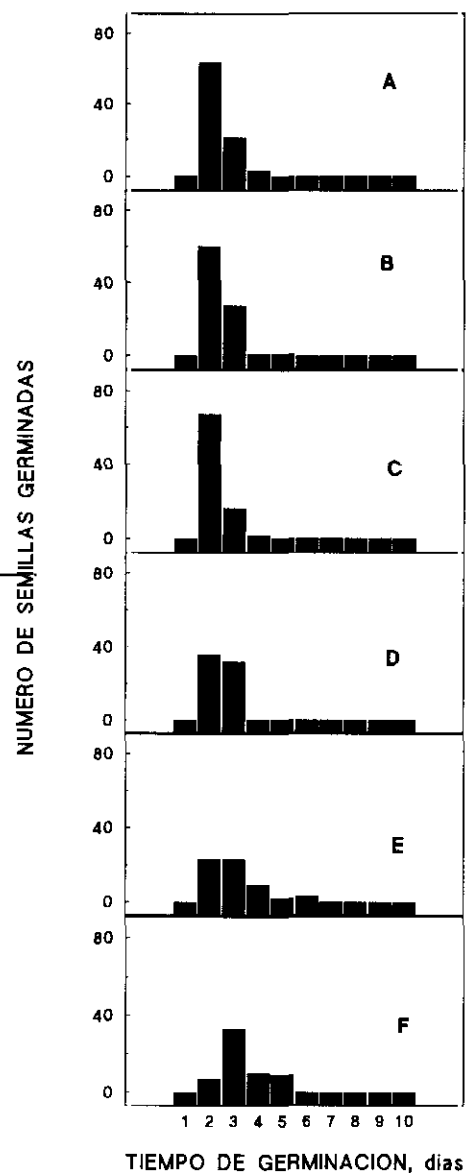


Figura 14. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el número de semillas (SG) germinadas en cada uno de los 10 días de incubación en condiciones de laboratorio. Semillas no tratadas (**A**); Semillas envejecidas durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (**B, C, D, E y F**, respectivamente).

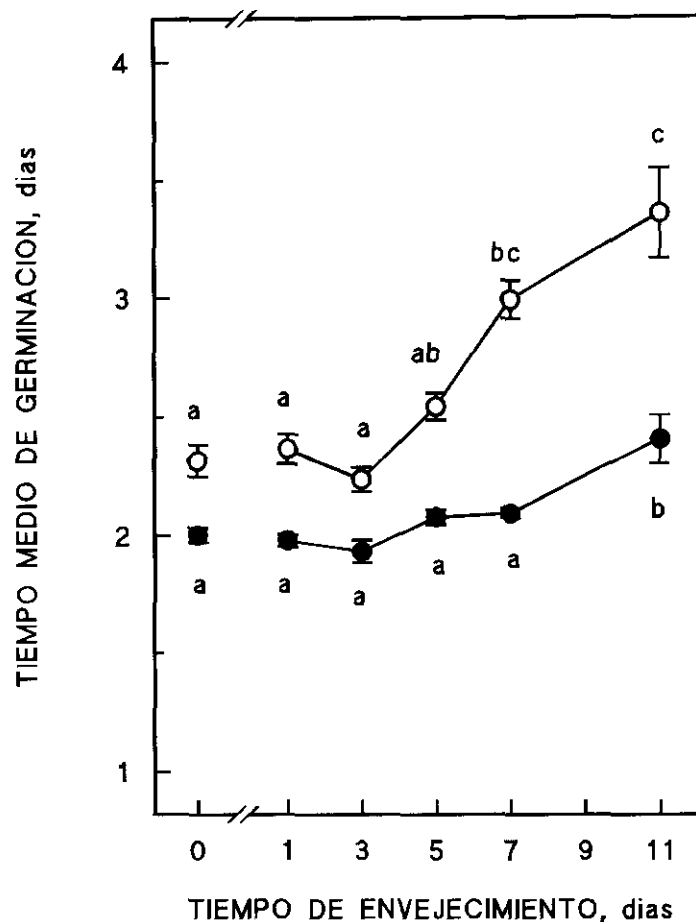


Figura 15. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el tiempo medio de germinación de las semillas de girasol cv. Peredovik, calculado según se describe en el apartado de Material y Métodos. Símbolos negros, SP; símbolos blancos, SG. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes. Para cada tipo de semilla, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 12).

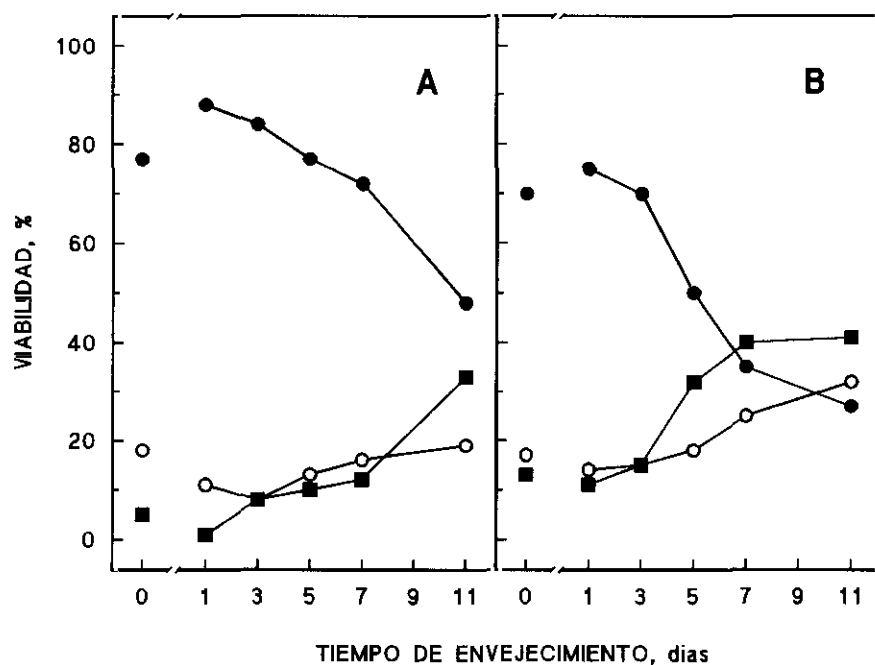


Figura 16. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la viabilidad de semillas de girasol cv. Peredovik. SP, **A**; SG, **B**. Círculos negros, semillas viables (plántulas normales), círculos blancos y cuadrados, semillas no viables (plántulas anormales y semillas muertas, respectivamente).

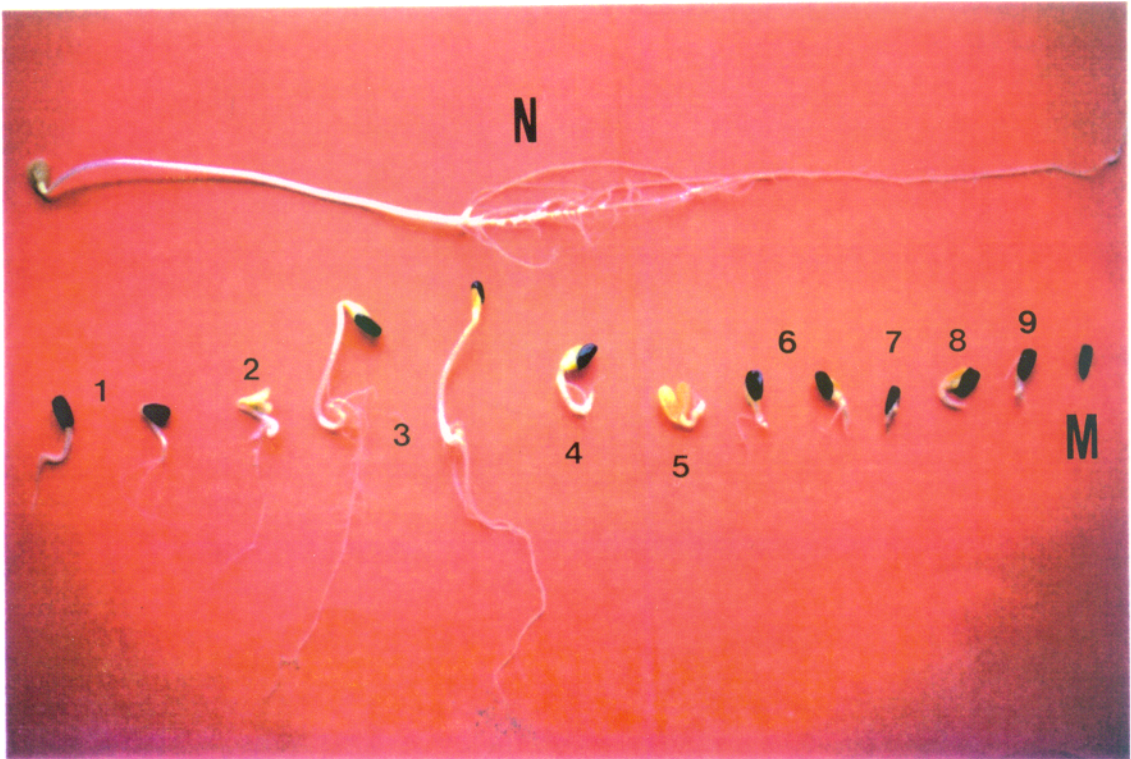


Figura 17. Anormalidades observadas en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) obtenidas a partir de semillas artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR). Localización y tipificación de anomalías según la ISTA (1985): I) Raíz: atrofiada (9), retrasada (8), podrida (7), segmentada y dividida (6) y corta y gruesa (5); II) Hipocótilo: podrido (1), estrecho y curvo (2) y formando un asa o en espiral (3); y III) Plántula: deforme (4). **N**, plántula normal y **M**, semilla muerta.



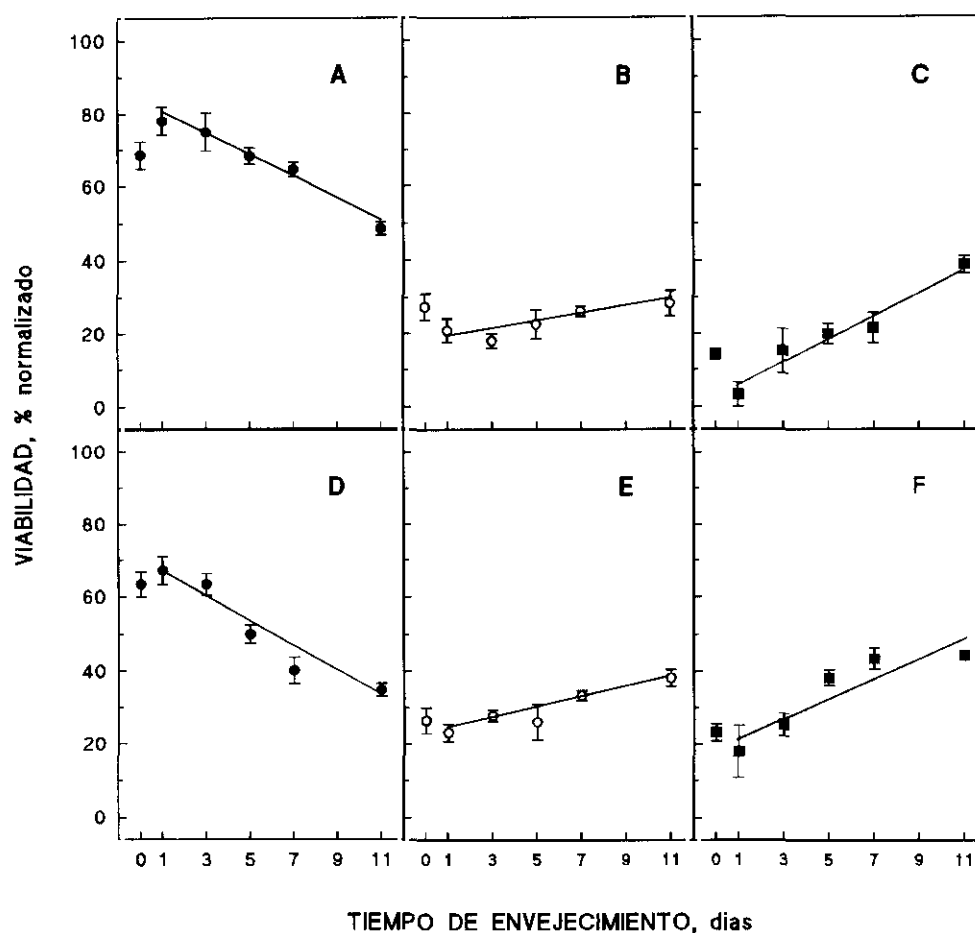


Figura 18. Relación entre el tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y la aparición de plántulas normales (círculos negros), anormales (círculos blancos) y semillas muertas (cuadrados) de girasol cv. Peredovik. SP (A, B y C) y SG (D, E y F). Cada punto representa el valor medio normalizado \pm SE de cuatro repeticiones independientes de 25 semillas cada una.

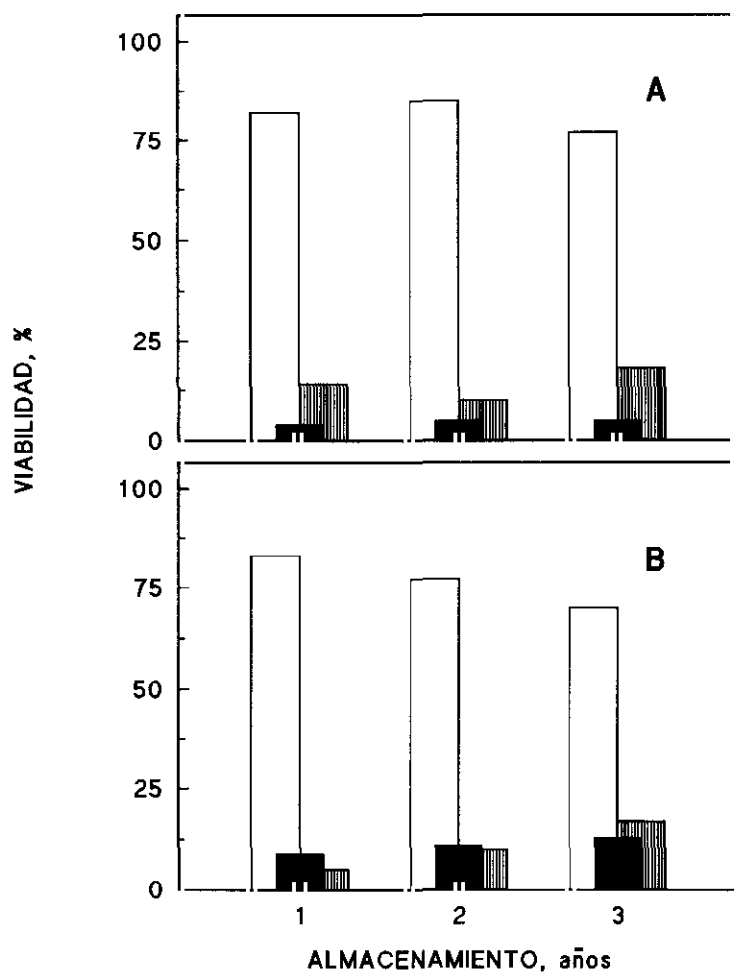


Figura 19. Evolución de la viabilidad de las semillas (SP y SG) de girasol cv. Peredovik, durante el período de experimentación (A y B, respectivamente). Barras blancas, plántulas normales; barras rayadas, plántulas anormales y barras negras, semillas muertas.

TABLA 8. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, a los 4 y 10 días (primer y segundo conteo) de la imbibición a 25 °C, artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR). +Porcentajes de germinación normalizados previa transformación angular de Bliss. Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	GERMINACION ⁺	
		SP	SG
Conteo	1	5,260 NS	27,060 NS
Error	46	170,906	171,590

TABLA 9. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a los 10 días de la imbibición a 25 °C, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. +Porcentajes de germinación normalizados previa transformación angular de Bliss. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	GERMINACION ⁺
Envejecimiento (t)	5	1726,440*
Tamaño (T)	1	4921,893*
Interacción (txT)	5	413,317NS
Error	36	1768,322

TABLA 10. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, a los 10 días de la imbibición a 25 °C, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). +Porcentajes de germinación normalizados previa transformación angular de Bliss. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de Variación	gl	GERMINACION ⁺	
		SP	SG
Envejecimiento	5	2755,243*	2579,967*
Error	18	812,204	956,117

TABLA 11. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del TMG de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	TMG, días
Envejecimiento (t)	5	3,680*
Tamaño (T)	1	3,685*
Interacción (txT)	5	0,876*
Error	36	0,879

TABLA 12. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del TMG de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	TMG, días	
		SP	SG
Envejecimiento	5	0,575*	3,987*
Error	18	0,190	0,689

TABLA 13. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del número de plántulas normales (N), plántulas anormales (A) y semillas muertas (M) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**) y a $P \leq 0,01$ (*).

Fuente de variación	gl	N	A	M
Envejecimiento (t)	5	5193,904**	789,452*	4930,656**
Tamaño (T)	1	2618,278**	321,264*	2111,523**
Interacción (txT)	5	604,107NS	143,058NS	385,884NS
Error	36	1758,7212	1313,748	1935,084

TABLA 14. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del número de plántulas normales (N), plántulas anormales (A) y semillas muertas (M) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), a $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP			SG		
		N	A	M	N	A	M
Envejecimiento	5	2146**	329NS	2756**	3686**	604*	2560**
Error	18	830	688	927	694	626	963

TABLA 15. Valores medios normalizados del porcentaje de plántulas normales (N), plántulas anormales (A) y semillas muertas (M) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). En cada columna los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test múltiple de Duncan, para el nivel de significación del correspondiente análisis de varianza (Tabla 14).

ENVEJECIMIENTO, días	SP			SG		
	N	A	M	N	A	M
0	68,60b	27,37	14,18a	63,33b	26,54ab	23,21a
1	78,30b	20,87	3,21a	67,11b	24,13a	17,97ab
3	75,05b	17,97	15,15a	63,28b	25,28ab	25,32ab
5	68,32b	22,61	19,95ab	50,01ab	26,85ab	38,26b
7	64,59ab	26,11	21,55ab	40,10a	33,28ab	43,50b
11	48,72a	28,28	38,86b	34,70a	38,19b	44,24b

TABLA 16. Relación lineal entre el porcentaje normalizado (y) de plántulas normales, plántulas anormales y semillas muertas y el tiempo de envejecimiento (x), procedentes de semillas, SP y SG, de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik). Significación del coeficiente de correlación, a $P \leq 0,001$ (***) y $P \leq 0,05$ (*).

TAMAÑO	$y = a x + b$	r
Semillas SP:		
Normales	$-2,8596 x + 83,1158$	$-0,8649^{***}$
Anormales	$0,9488 x + 18,0445$	$0,5153^*$
Muertas	$3,2709 x + 2,0793$	$0,8385^{***}$
Semillas SG:		
Normales	$-3,5244 x + 70,0699$	$-0,8866^{***}$
Anormales	$1,4836 x + 21,6973$	$0,7180^{***}$
Muertas	$2,7399 x + 19,0593$	$0,7597^{***}$

4.1.2. Ensayos de vigor: crecimiento de plántulas e índices relacionados

Los ensayos del crecimiento de plántulas se realizaron a partir de plántulas consideradas normales a los 10 días de imbibición, procedentes de semillas germinadas y que no mostraban ningún tipo de anomalía. En estos ensayos el crecimiento se expresa en función de la longitud total de la plántula, así como de la raíz e hipocótilo, medidos de forma independiente.

El análisis estadístico (Tabla 17) muestra que, respecto a la longitud total de las plántulas, no existen diferencias significativas debidas al tamaño de las semillas, aunque presentan una respuesta diferente frente al envejecimiento. El estudio de esta fuente de variación en cada tipo de semillas (Tabla 18) revela que el envejecimiento artificial afecta significativamente a la longitud de las plántulas. El test múltiple de Duncan (Tabla 19) señala que las diferencias más importantes corresponden, en las SP, a las envejecidas durante 7 y 11 días y en las SG a las envejecidas durante 11 días, aunque, en estas últimas, los valores medios son en todos los casos inferiores a los detectados en las semillas no tratadas.

Posteriormente se procedió a la determinación de la longitud correspondiente a la raíz y al hipocótilo (Fig. 20) de las plántulas procedentes de semillas sometidas a envejecimiento artificial. El análisis estadístico de los resultados obtenidos con ambos tipos de semillas (Tabla 20) muestran que respecto a la raíz no existen diferencias significativas debidas al tamaño de la semillas, aunque el tiempo de envejecimiento afecta de diferente forma a las SP y las SG. Por el contrario, ambos tipos de semillas difieren significativamente ($P \leq 0,001$) en relación a la longitud del hipocótilo, tanto por efecto del tamaño de la semilla como por el tiempo de envejecimiento.

Asimismo, se puede observar que las SP (Fig. 20A) muestran una alteración significativa (Tabla 21) de la longitud de la raíz y de la longitud del hipocótilo cuando el tiempo de envejecimiento se prolonga a 7 y 11 días. En el caso de las SG (Fig. 20B) se detectan fluctuaciones en la longitud de la raíz durante el período de envejecimiento, presentando en todos los casos valores inferiores a los observados en las semillas no tratadas. Respecto al hipocótilo, las mayores diferencias se detectan en las plántulas procedentes de semillas envejecidas durante 7 y 11 días.

El análisis del vigor de las plántulas mediante los índices de uniformidad (SUI) y de vigor (IVI) descritos por Huang (1989), ponen de manifiesto el efecto del tratamiento. La aplicación de estos índices a los datos experimentales obtenidos se indican en la Tabla 22.

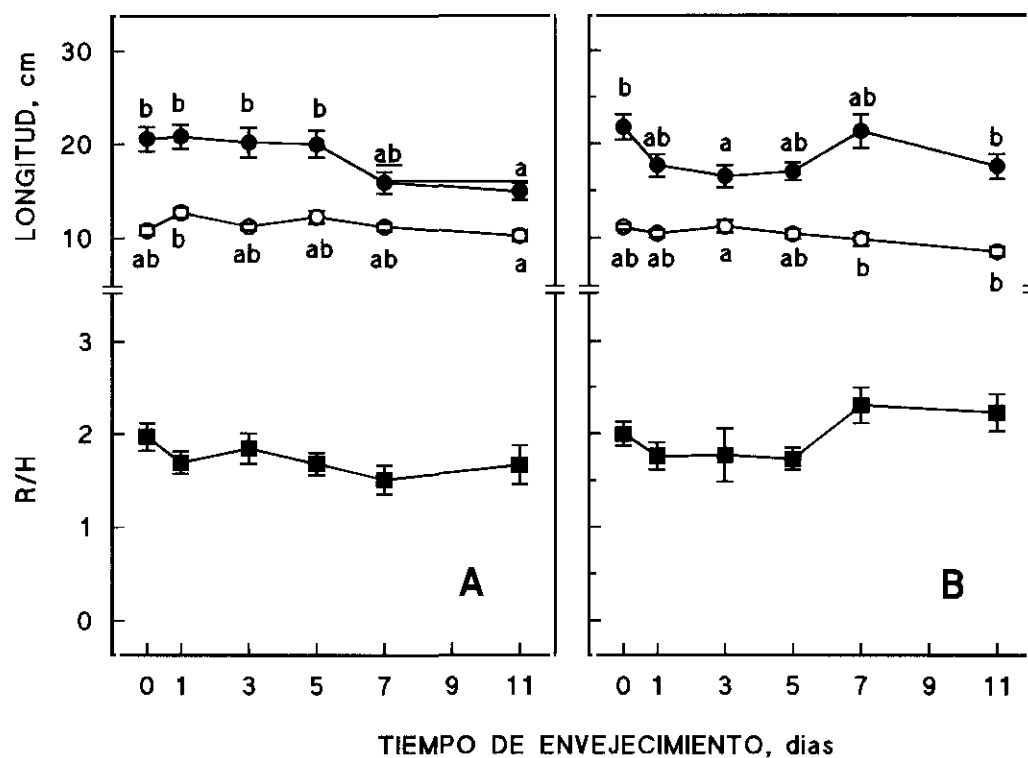


Figura 20. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el vigor de las semillas de girasol (SP y SG) cv. Peredovik (A y B, respectivamente). Vigor expresado como longitud de la raíz (círculos negros), longitud del hipocótilo (círculos blancos), y relación longitud de la raíz/longitud del hipocótilo (R/H). Cada punto representa el valor medio \pm SE de 25 plántulas. Los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 21).

TABLA 17. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la longitud total de las plántulas normales procedentes de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a los 10 días de imbibición a 25 °C, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	LONGITUD, cm	
Envejecimiento (t)	5	1236,328**	
Tamaño (T)	1	122,752NS	
Interacción (txT)	5	976,388*	
Error	288	15729,067	

TABLA 18. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la longitud de las plántulas procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,01$ (**) y $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	LONGITUD, cm	
		SP	SG
Envejecimiento	5	1357,281**	855,435*
Error	144	7779,547	7950,052

TABLA 19. Longitud total (cm) de las plántulas normales a los 10 días de germinación a 25 °C, procedentes de semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) sometidas a envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Cada valor representa la media \pm SE de la longitud de 25 plántulas. Los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias para el nivel de significación del correspondiente análisis de varianza (Tabla 18), según el test múltiple de Duncan.

ENVEJECIMIENTO, días	SP	SG
0	31,39 \pm 1,48bc	32,92 \pm 1,41b
1	33,57 \pm 1,48c	28,09 \pm 1,28ab
3	31,43 \pm 1,62bc	27,66 \pm 1,43ab
5	32,26 \pm 1,89bc	27,36 \pm 1,13ab
7	27,06 \pm 1,10ab	31,13 \pm 2,03ab
11	25,11 \pm 1,08a	25,98 \pm 1,48a

TABLA 20. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la longitud (cm) de la raíz e hipocótilo de plántulas normales procedentes de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a los 10 días de imbibición a 25 °C, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,01$ (**) y $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	Raíz	Hipocótilo
Envejecimiento (t)	5	647,079*	162,713***
Tamaño (T)	1	0,908NS	102,551***
Interacción (txT)	5	891,924**	70,093NS
Error	288	12427,632	1965,950

TABLA 21. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la longitud (cm) de la raíz e hipocótilo de las plántulas normales procedentes de las semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a los 10 días de imbibición a 25 °C, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP		SG	
		Raíz	Hipocótilo	Raíz	Hipocótilo
Envejecimiento	5	868,92**	106,47*	670,08**	126,34*
Error	144	6131,15	974,85	6296,48	991,10

TABLA 22. Evaluación del vigor de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), procedentes de semillas (SP y SG) artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR), mediante la aplicación de los índices de uniformidad (SUI) y de vigor (IVI), calculados a partir de las expresiones que se señalan en el apartado de Material y Métodos propuestas por Huang (1989).

TIPO DE SEMILLA	ENVEJECIMIENTO, DÍAS	SUI	IVI, %
SP	0	0,87	67
	1	0,98	86
	3	1,75	147
	5	0,54	42
	7	1,23	88
	11	0,48	23
	SG	0	1,95
1		1,20	90
3		0,48	34
5		0,67	34
7		0,34	12
11		0,55	15

4.2. Contenido de humedad de las semillas de girasol

El contenido de humedad alcanzado por las semillas (SP y SG) durante el período de envejecimiento artificial se muestra en la Figura 21. Se puede observar que la humedad inicial de las semillas es de 0,05 g H₂O/g semilla (p.s.), independientemente del tamaño de las mismas. El análisis estadístico (Tabla 23) no reveló diferencias significativas en relación al tamaño de la semilla, pero sí respecto a su comportamiento en respuesta a las condiciones de envejecimiento. El tratamiento produce un incremento significativo del contenido de humedad (Tabla 24), detectable (Fig. 21) desde el primer día de envejecimiento (18 y 23 %, para SP y SG, respectivamente) y que se hace más evidente a medida que se prolonga tratamiento, incrementándose hasta el 31 y 42 % en semillas envejecidas durante 7 y 11 días, respectivamente. El contenido de humedad detectado fue de 0,06 g H₂O/g semilla a los 7 días y 0,07 g H₂O/g semilla a los 11 días, obteniéndose idénticos valores en SP y SG.

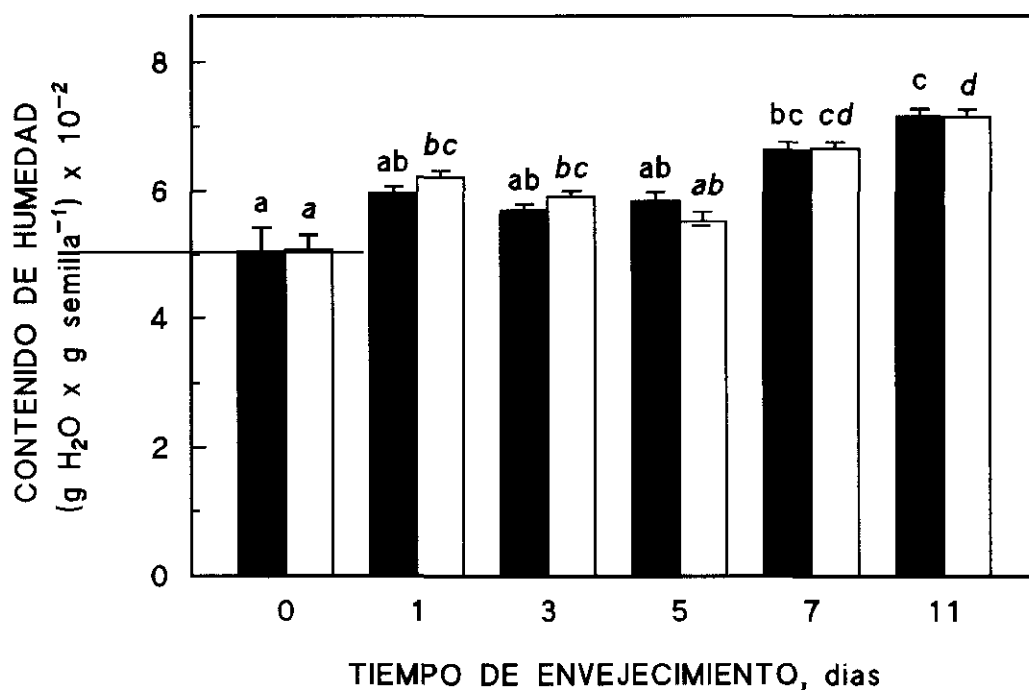


Figura 21. Contenido de humedad de las semillas de girasol cv. Peredovik, SP (barras negras) y SG (barras blancas) durante el período de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Para cada tipo de semillas, las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 24).

TABLA 23. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del contenido de humedad (g H₂O/g semilla) de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	HUMEDAD
Envejecimiento (t)	5	21,941*
Tamaño (T)	1	0,004NS
Interacción (txT)	5	0,420NS
Error	36	107,886

TABLA 24. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del contenido de humedad (g H₂O/g semilla) de las semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) .

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	10,946*	11,415*
Error	18	2,240	1,425

4.3. Ensayos de liberación: análisis de los exudados de las semillas de girasol

4.3.1. pH de los exudados

Los resultados obtenidos en la determinación del pH de los exudados de las semillas sometidas a distintos períodos de envejecimiento se muestran en la Figura 22. Los valores de pH a los 30 minutos de imbibición presentaron diferencias significativas (Tabla 25) entre las SP y las SG, tanto por efecto del tamaño de la semilla como por el tiempo de envejecimiento. La determinación del pH a los 30 minutos de la imbibición ha sido propuesta recientemente (Tyagi, 1993) como un método capaz de predecir la capacidad germinativa de semillas de distintas especies. Sin embargo, en nuestro material biológico, no hemos encontrado diferencias significativas entre los valores de pH a los 30 minutos de los exudados de las SP (Tabla 26) sometidas al proceso de envejecimiento artificial, aunque las SG mostraron valores de pH significativamente (Tabla 26, Fig. 22) incrementados en las semillas envejecidas durante 1 y 3 días.

Los valores de pH a las 24 horas de imbibición no mostraron diferencias significativas en función del tiempo de envejecimiento ni del tamaño de la semilla (Tabla 25). Tanto para las SP como para las SG, los valores de pH estuvieron en todos los casos comprendidos entre 5,4 y 5,9. Sin embargo, es interesante señalar que los valores de pH medidos a los 30 minutos difieren significativamente de los obtenidos a las 24 horas de imbibición (Tabla 27) tanto en SP como en SG.



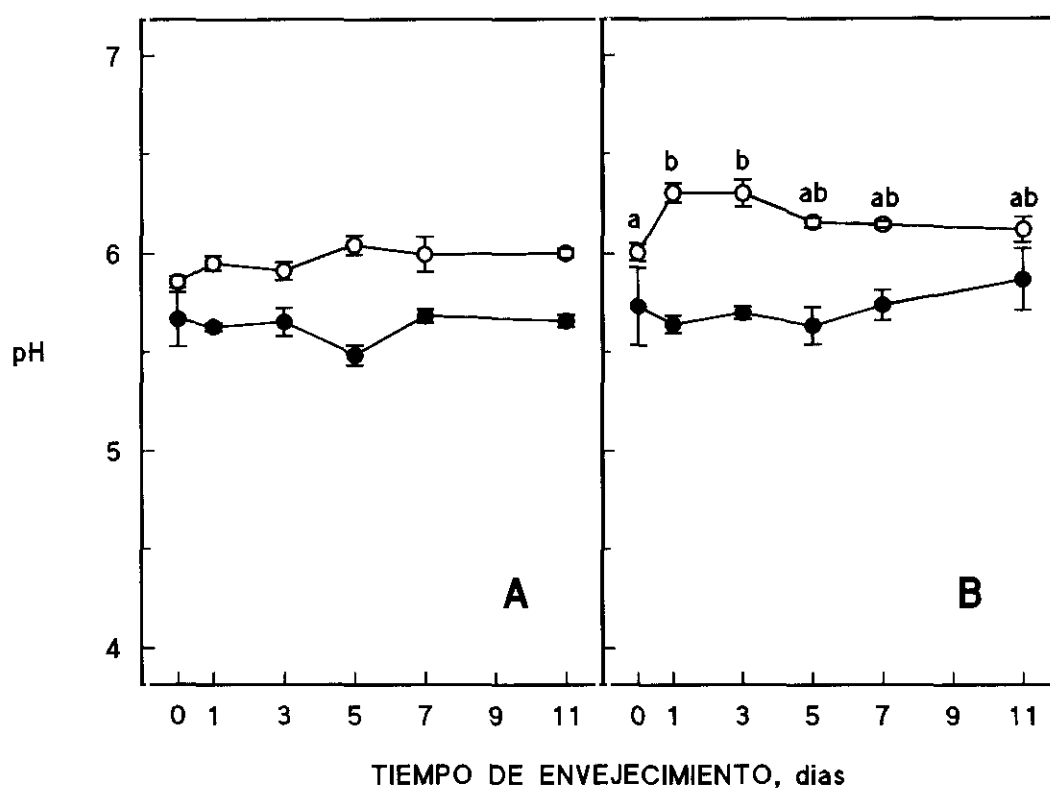


Figura 22. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el pH de los exudados de semillas de girasol (SP y SG) cv. Peredovik (A y B, respectivamente). Círculos blancos y negros, pH de los exudados a los 30 minutos y 24 horas de imbibición, respectivamente. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. En cada caso, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 26).

TABLA 25. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los valores de pH detectados en los exudados de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a los 30 minutos y a las 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	pH 30 min	pH 24 h
Envejecimiento (t)	5	0,198**	0,381NS
Tamaño (T)	1	0,537***	0,027NS
Interacción (txT)	5	0,157*	0,236NS
Error	36	0,342	2,018

TABLA 26. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los valores de pH de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, a los 30 minutos y a las 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP		SG	
		pH 30 min	pH 24 h	pH 30 min	pH 24 h
Envejecimiento	5	0,093NS	0,106NS	0,262*	0,511NS
Error	18	0,185	0,347	0,157	1,671

TABLA 27. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los valores de pH de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de imbibición. Diferencias significativas (*) a $P \leq 0,001$.

Fuente de variación	gl	SP	SG
Imbibición	1	1,294*	2,484*
Error	46	0,828	1,547

4.3.2. Contenido de fósforo de los exudados

La Figura 23 muestra la evolución de los niveles de fósforo detectados en los exudados de las semillas a las 24 horas de imbibición. Se puede observar que el tamaño de la semilla no influye significativamente en los niveles de fósforo detectados, mientras que el tiempo de envejecimiento afecta significativamente a la liberación de fósforo (Tabla 28). El análisis estadístico de esta variable en función del tiempo de envejecimiento para cada tipo de semillas muestra asimismo diferencias significativas (Tabla 29). Tanto en las SP como en las SG, envejecidas de 1 a 7 días, los valores de fósforo no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan (Fig. 23), produciéndose el mayor incremento a los 11 días de envejecimiento.

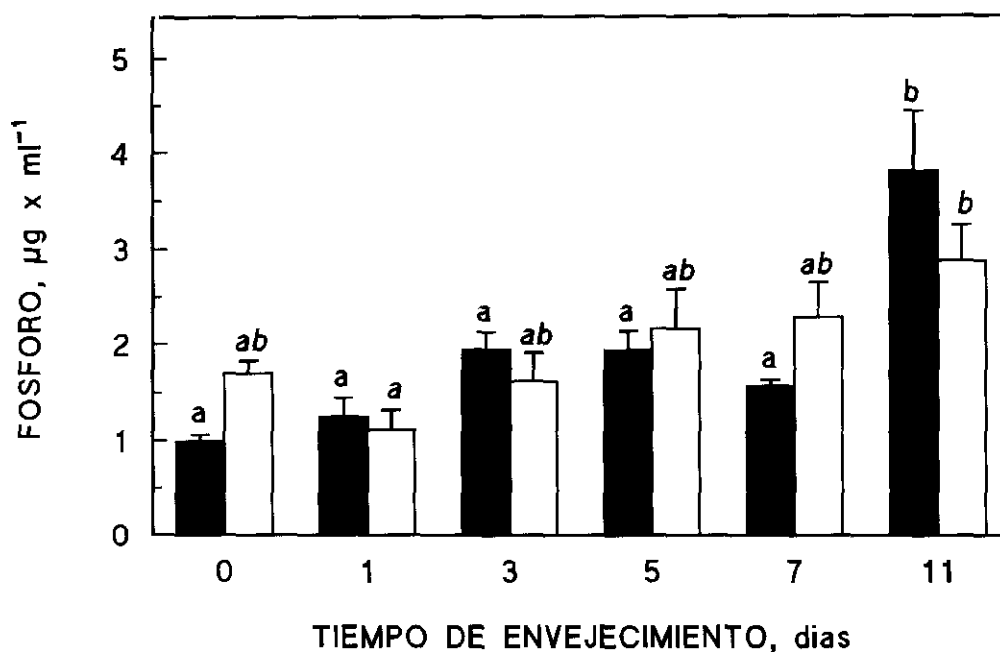


Figura 23. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la cantidad de fósforo de los exudados de semillas de girasol cv. Peredovik, a las 24 horas de imbibición. SP, barras negras; SG, barras blancas. Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Para cada tipo de semilla, las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 29).

TABLA 28. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de fósforo presente en los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a las 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	FÓSFORO
Envejecimiento (t)	5	23,385*
Tamaño (T)	1	0,016NS
Interacción (txT)	5	4,035NS
Error	36	13,073

TABLA 29. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de fósforo presente en los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**) y a $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	19,863**	7,558*
Error	18	5,998	7,081

4.3.3. Absorbancia de los exudados

Los exudados de los distintos lotes de semillas sometidas a envejecimiento acelerado presentaron un máximo de absorción entre 260 y 280 nm (Figs. 24 y 25) que se incrementa drásticamente en los exudados de las SP envejecidas durante 11 días y de la SG envejecidas durante 7 y 11 días, que pone de manifiesto la salida masiva de solutos intracelulares. Los valores de absorbancia de los exudados a las 24 horas de imbibición medidos a esta longitud de onda se muestran en la Figura 26, donde se puede observar que la evolución de la absorbancia a 280 nm sigue un curso lineal definido por las ecuaciones: $y = 0,056 x + 0,4365$ ($r = 0,6912^{***}$), $y = 0,085 x + 0,6307$ ($r = 0,6337^{**}$) para las SP y las SG, respectivamente. Asimismo se puede observar que existen diferencias importantes entre ambos tipos de semillas, que además mostraron significación estadística (Tabla 31) por efecto del tiempo de tratamiento y del tamaño de la semilla. Por otra parte, los valores de absorbancia a 280 nm detectados en los exudados procedentes de las SP (Fig. 26) presentaron diferencias significativas en función del tiempo de envejecimiento (Tabla 30), a partir de los 3 días de tratamiento de acuerdo con el test de separación de medias aplicado, mientras que en el caso de las SG, tales diferencias sólo se detectan en las semillas envejecidas durante 11 días.

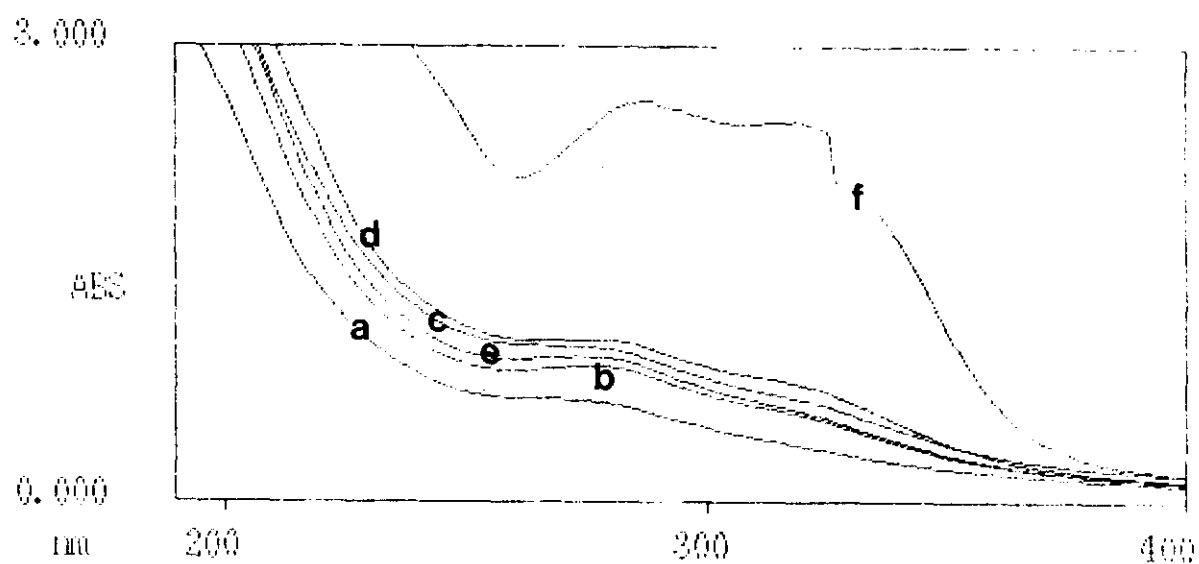


Figura 24. Espectro de absorción de los exudados de las semillas (SP) de girasol cv. Peredovik no tratadas (a) y envejecidas artificialmente durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (b, c, d, e y f, respectivamente).

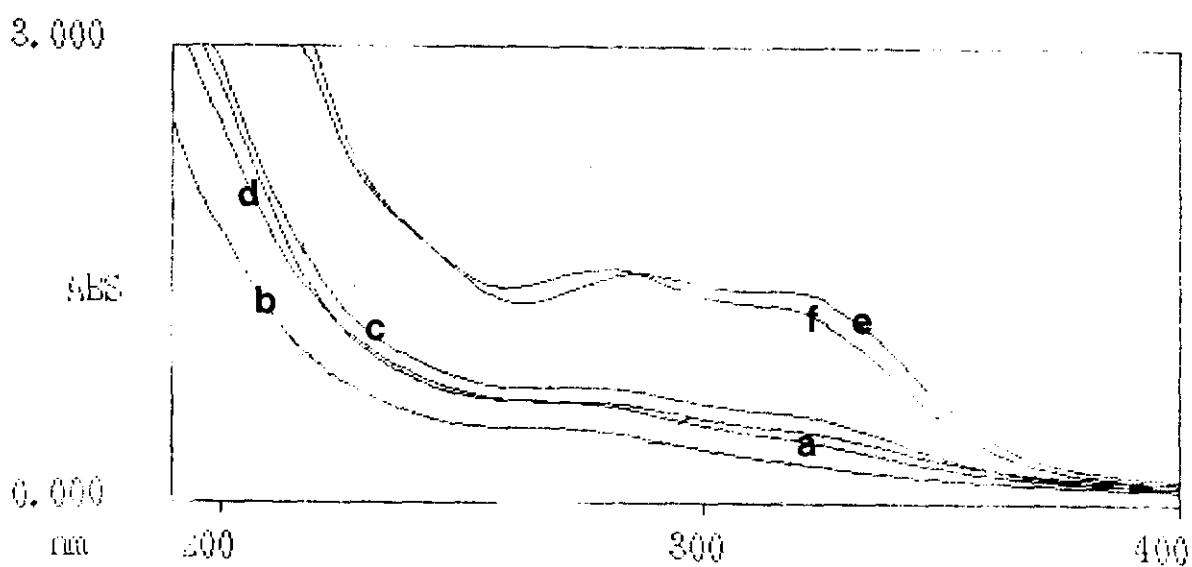


Figura 25. Espectro de absorción de los exudados de las semillas (SG) de girasol cv. Peredovik no tratadas (a) y envejecidas artificialmente durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (b, c, d, e y f, respectivamente).

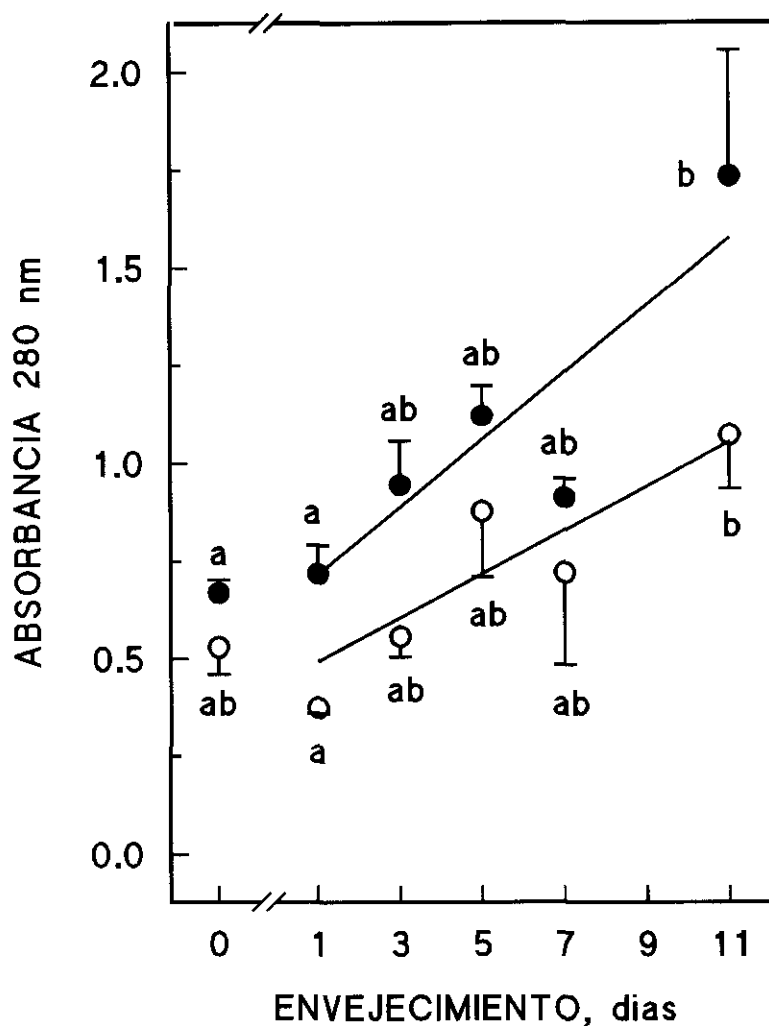


Figura 26. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la absorbancia a 280 nm de los exudados procedentes de semillas de girasol cv. Peredovik. Círculos negros y blancos, SP y SG, respectivamente. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes. Para cada tipo de semilla, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 31).

TABLA 30. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los valores de absorbancia a 280 nm (A_{280}) de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) a las 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	A_{280}
Envejecimiento (t)	5	3,947*
Tamaño (T)	1	1,294*
Interacción (txT)	5	0,354NS
Error	36	2,882

TABLA 31. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los valores de A_{280} de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**) y a $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	3,002**	1,299*
Error	18	1,549	1,333

4.3.4. Intensidad de corriente eléctrica: análisis individualizado de los exudados

La determinación individualizada de la intensidad de corriente eléctrica se ha llevado a cabo en: 1) aquenios, 2) semillas y 3) pericarpios. No obstante, y a los efectos de la descripción de los resultados, en este epígrafe resulta conveniente matizar la terminología empleada, con objeto de precisar los ensayos realizados. Teniendo en cuenta la nota aclaratoria, señalada en el apartado 3.1., sobre las denominaciones usualmente referidas y empleadas por investigadores, tecnólogos y analistas de semillas (Gay y col., 1991) y únicamente desde este punto de vista, se consideran los términos **aquenio** y **pericarpio**, equivalentes a semilla completa y cubierta, respectivamente. Por tanto, en este caso, la expresión **semilla**, hace referencia a la semilla sin cubierta.

La liberación de iones, medida en función de la ICE (μA), procedentes de semillas completas de girasol (SP y SG) se muestra en la Figura 27. En todos los casos, tanto en semillas no envejecidas (Fig. 27A), como en las sometidas a envejecimiento artificial (Fig. 27B-F), se observa una evolución semejante de la ICE. Existe una rápida salida de iones durante las primeras horas de imbibición, que posteriormente tiende a estabilizarse, observándose un cambio en la cinética de liberación de iones a tiempos prolongados de imbibición. Este último efecto se hace más patente a medida que aumenta el envejecimiento. Por otra parte, al final del período de imbibición, las SP presentaron una menor liberación de iones frente a los detectados en los exudados provenientes de las SG. El análisis estadístico (Tabla 32) de los resultados obtenidos a las 24 horas refleja la influencia del tamaño de la semilla, que resulta ser muy significativa ($P \leq 0,001$). Respecto a esta variable cabe señalar además que las SP y las SG evolucionan de forma significativamente ($P \leq 0,01$) diferente en función del tiempo de envejecimiento.

Por otra parte, el estudio estadístico de los valores finales de ICE para cada tipo de semillas (Figs. 28A y B), revela que el tiempo de envejecimiento no afecta significativamente (Tabla 33) a la cantidad de electrolitos liberados, aunque los valores

tienden a incrementarse a medida que se prolonga el tiempo de envejecimiento. Este tipo de ensayos se utiliza habitualmente como sistema indirecto para determinar la viabilidad de las semillas. Sin embargo, los resultados señalados no reflejan una buena correlación entre los valores medios de ICE a las 24 horas de imbibición y la viabilidad medida en los ensayos de germinación ($r=-0,4437$ y $r=-0,0567$ en SP y SG, respectivamente).

En la Figura 29 se presenta la evolución de la ICE de los exudados procedentes de los pericarpios de las SP y SG. En ambos casos, se puede observar que existe una rápida liberación de iones durante las primeras horas de imbibición, que posteriormente se estabiliza hasta las 24 horas. Sin embargo, si se observan diferencias en la cantidad de iones liberados desde los pericarpios de las SP y las SG. Por otra parte, no se observan diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre la ICE determinada en los exudados procedentes de los pericarpios de las semillas sometidas a 11 días de envejecimiento y las semillas no tratadas.

La liberación de iones procedentes de las semillas (libres de pericarpio) se presenta en la Figura 30. Los resultados muestran una liberación lenta, creciente y continua de iones desde el comienzo del período de imbibición. Los valores de ICE medidos en estos exudados fueron siempre inferiores a los observados en los procedentes de semillas completas (Fig. 27) durante todo el período de imbibición.

Los valores de ICE a las 24 horas de imbibición detectados en los exudados de las semillas sin pericarpio (Figs. 28A y B) presentaron diferencias muy significativas por efecto del tamaño y además mostraron una evolución significativamente diferente respecto al tiempo de envejecimiento (Tabla 34).

Esta variable analizada en función del tiempo de envejecimiento en cada tipo de semillas, mostró diferencias muy significativas ($P \leq 0,001$) tanto en las SP como en las SG (Tabla 35). La separación de valores medios por el test múltiple de Duncan (Figs. 28A y B), revela que, para las SP, las diferencias se ponen de manifiesto a los 11 días de

tratamiento. En cambio, para las SG aparecen diferencias significativas a partir de los 5 días de envejecimiento. La observación de los valores finales de ICE (y) revela que esta variable se incrementa linealmente en función del tiempo de envejecimiento (x), tanto para SP como SG (Fig. 28). Las rectas de regresión vienen definidas por las expresiones: $y=2,4086 x + 53,9279$; $r=0,8845^{***}$ para SP; $y=4,8583 x + 54,026$; $r=0,7542^{***}$ para SG.

Por otra parte, los valores finales de ICE de los exudados de las semillas (sin pericarpio) mostraron una buena correlación con la presencia de semillas muertas ($r=0,8971^{***}$) en el caso de las SP y con la aparición de plántulas anormales en el caso de las SG ($r=0,8680^{***}$), de los ensayos estándar de germinación (Fig. 16). Sin embargo, para comprobar el efecto de la eliminación del pericarpio en la capacidad germinativa se realizó un ensayo de germinación con las semillas libres de pericarpio (Tabla 36) en el que se observa un incremento muy importante del número de anomalías en ambos tipos de semillas.

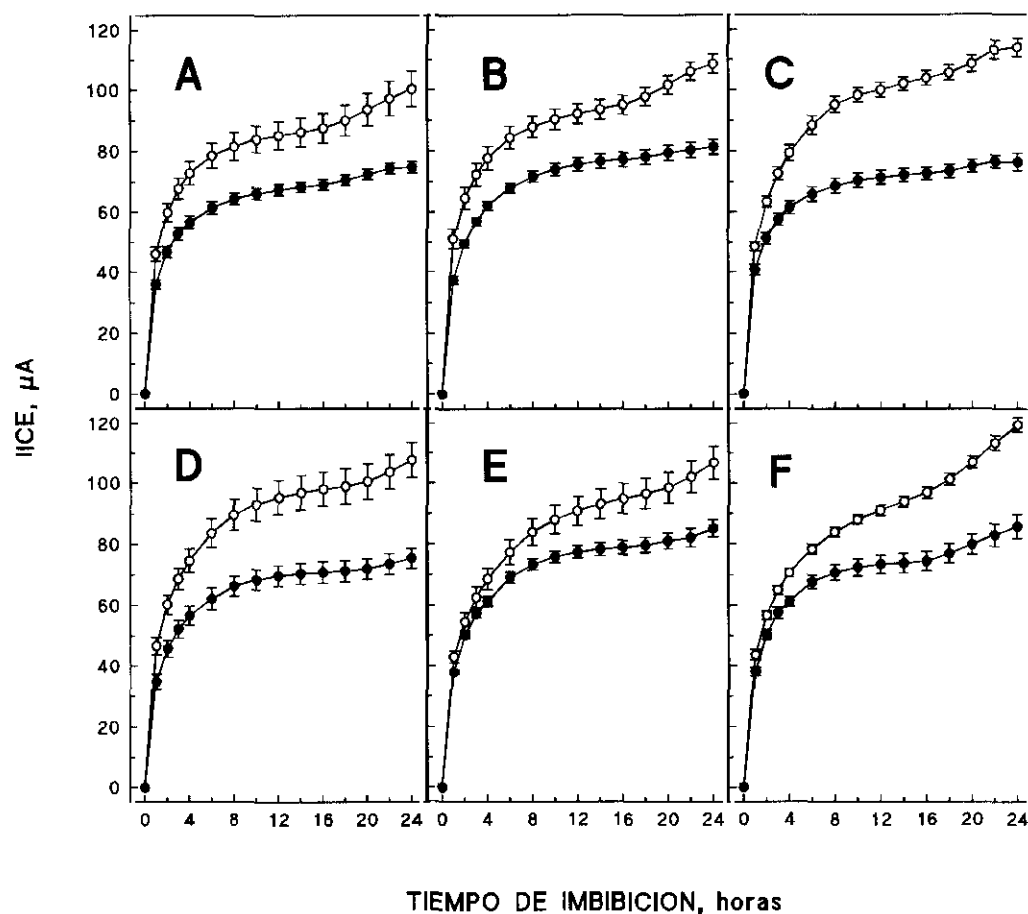


Figura 27. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (μA) de los exudados de semillas completas de girasol cv. Perdovik en función del tiempo de imbibición. SP (círculos negros) y SG (círculos blancos). Semillas no tratadas (A), y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (B, C, D, E y F, respectivamente). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones cada una con 25 determinaciones independientes.

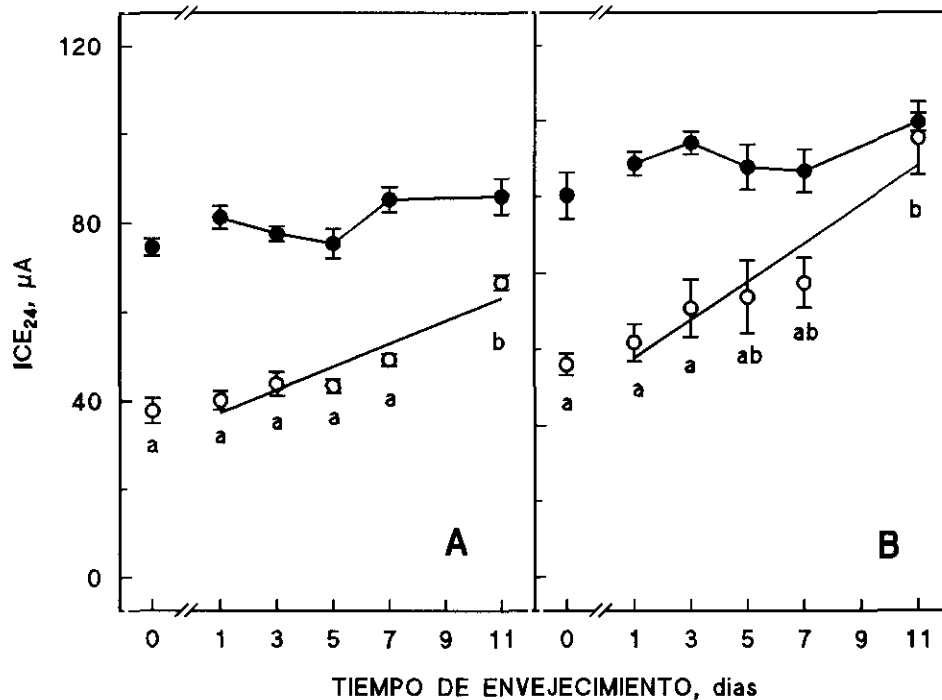


Figura 28. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica determinada a las 24 horas de imbibición en los exudados de semillas de girasol completas (círculos negros) y libres de pericarpio (círculos blancos) correspondientes a SP (A) y SG (B), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones, cada una con 25 determinaciones independientes. En cada caso, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 35).

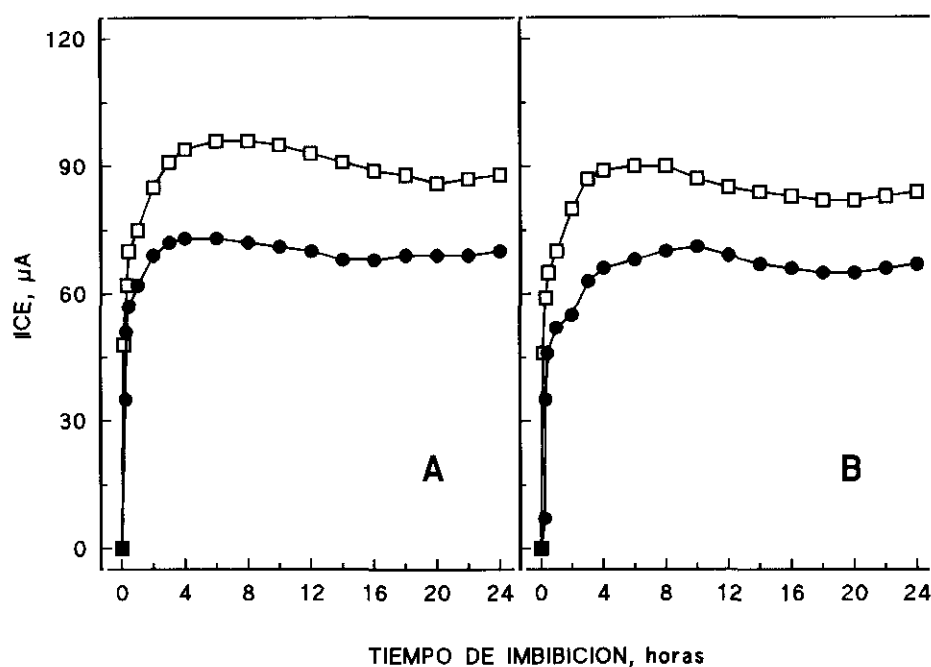


Figura 29. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (μA) de los exudados procedentes de los pericarpios de las semillas de girasol SP (círculos) y SG (cuadrados), correspondientes a semillas no tratadas (**A**) y envejecidas artificialmente ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 75 \% HR) durante 11 días (**B**). Cada punto representa el valor medio de cuatro repeticiones cada una con 25 determinaciones independientes. El SE no excede el tamaño del símbolo.

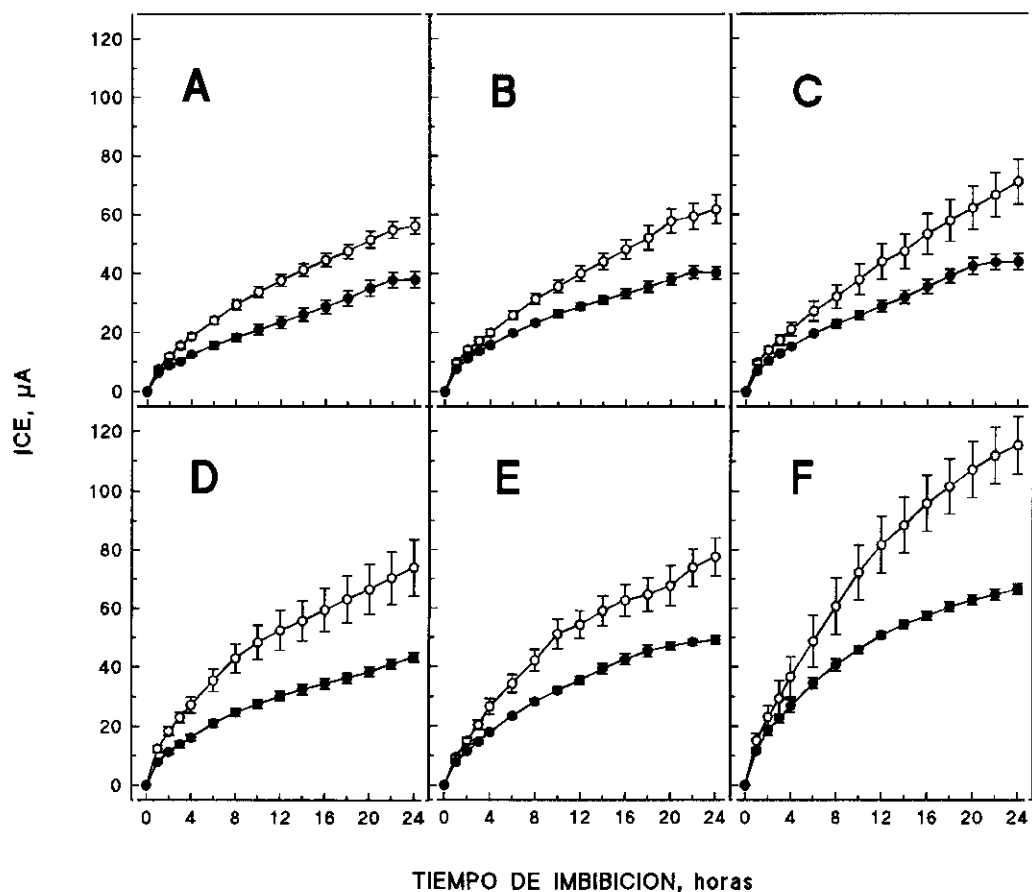


Figura 30. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (μA) de los exudados de las semillas de girasol cv. Peredovik (libres de pericarpio), en función del tiempo de imbibición. SP (círculos negros) y SG (círculos blancos). Semillas no tratadas (A) y envejecidas artificialmente ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 75 % HR) durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (B, C, D, E y F, respectivamente). Cada punto corresponde al valor medio \pm SE de cuatro repeticiones, cada una con 25 determinaciones independientes.

TABLA 32. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la ICE de los exudados procedentes de semillas completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) sometidas a 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	ICE
Envejecimiento (t)	5	1030,048*
Tamaño (T)	1	10424,129**
Interacción (txT)	5	312,672NS
Error	36	2089,976

TABLA 33. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la ICE de los exudados procedentes de semillas completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, imbibidas durante 24 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	465,667NS	859,794NS
Error	18	762,556	1613,698

TABLA 34. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la ICE de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) libres de pericarpio imbibidas durante 24 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	ICE
Envejecimiento (t)	5	9758,830*
Tamaño (T)	1	10176,858*
Interacción (txT)	5	1132,125NS
Error	36	4168,915

TABLA 35. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la ICE de los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) libres de pericarpio, SP y SG, imbibidas durante 24 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	2127,884*	8718,070*
Error	18	321,383	3847,532

TABLA 36. Capacidad germinativa de las semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv Peredovik) no tratadas y libres de pericarpio. N, plántulas normales, A, plántulas anormales y M, semillas muertas.

TAMAÑO	N	A	M
SP	67	26	7
SG	49	36	16

4.3.4.1. Cinética de liberación de iones

La cinética de liberación de iones presentada en la Figura 30 es de primer orden y viene definida por una función monomolecular que asume que la cantidad de iones liberada depende de la cantidad de iones que queda por liberar:

$$L = C (1 - e^{-K \cdot t}),$$

donde,

L = cantidad de iones liberada, en μA

t = período de imbibición, en horas

C y K , son parámetros estimados por la función cuyo significado es el siguiente:

C = asíntota cuando $t \rightarrow \infty$, biológicamente representa la cantidad final de iones liberada

K = constante cinética, relacionada con la velocidad inicial $(dL/dt)_{t=0} = K \cdot C$

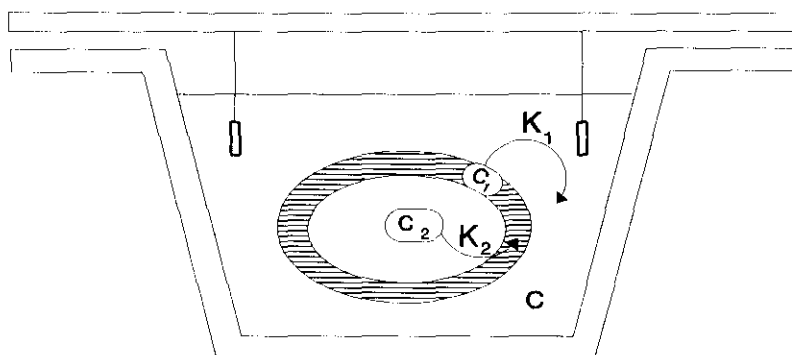
En la Tabla 37 se presentan los valores de los parámetros estimados para esta función. En todos los casos, el coeficiente de regresión (R^2) fue superior a 0,9607. Teniendo en cuenta la bondad del ajuste, el análisis estadístico de los parámetros estimados por la función (Tabla 38) revela las diferencias existentes en función del tiempo de envejecimiento, para ambos tipos de semillas.

Desde un punto de vista teórico, los iones detectados en los exudados de las semillas completas (aquenio) corresponderían a los liberados por cada uno de sus componentes (pericarpio y semilla). Sin embargo, los datos experimentales no son equivalentes a los que se obtendrían mediante su suma algebraica, ya que la cesión de iones de la semilla completa muestra una evolución diferente (Fig. 27) a la observada cuando se analiza esta cesión en sus distintos componentes (Figs. 29 y 30). Teniendo en cuenta la representación gráfica de los datos experimentales (Fig. 27), la evolución de la ICE de la semilla completa fue analizada por métodos de regresión no lineal a modelos matemáticos. No obstante, los ajustes realizados a funciones de tipo sigmoide

RESULTADOS

(monomolecular y logístico) no alcanzaron la convergencia cuando se considera el período completo de imbibición ni cuando se tienen en cuenta períodos inferiores dado el cambio de tendencia en la cesión de iones, que se presenta en todos los casos aproximadamente entre 14-18 horas de imbibición.

Los resultados anteriores podrían apoyar la hipótesis de que la ICE de los exudados procedentes de las semillas no tratadas o envejecidas podría ser la resultante de una cesión rápida de iones desde el pericarpio y otra cesión lenta y progresiva de iones desde la semilla. Esta hipótesis se formaliza en el modelo que a continuación se representa de forma esquemática:



Modelo que se propone para la liberación de iones procedentes de semillas completas de girasol cv. Peredovik. La cantidad de iones en el medio de imbibición (C) depende de la cantidad de iones cedidos desde el pericarpio (C_1) con una constante de velocidad de primer orden (K_1) y de la cantidad de iones cedidos desde la semilla (C_2) con una constante de velocidad de primer orden (K_2). El planteamiento del modelo y su desarrollo se definen en el texto.

El planteamiento de este modelo implica las siguientes consideraciones:

- 1) La velocidad de aparición de iones en el medio (dC/dt) depende de la cantidad de iones presentes en el pericarpio (C_1), que se ceden desde el mismo con una constante cinética de velocidad de primer orden (k_1):

$$\frac{dC}{dt} = k_1 \cdot C_1 \quad [1]$$

- 2) La velocidad de liberación de iones desde la semilla (dC_2/dt) depende de la cantidad de iones presentes en la misma (C_2), que se ceden con una constante cinética de velocidad de primer orden (k_2):

$$\frac{dC_2}{dt} = -k_2 \cdot C_2 \quad [2]$$

- 3) En consecuencia, la liberación de iones desde el pericarpio dependerá de la velocidad de cesión de iones desde la semilla ($-k_2 \cdot C_2$) y de la velocidad de aparición de iones en el medio de imbibición ($k_1 \cdot C_1$):

$$\frac{dC_1}{dt} = k_2 \cdot C_2 - k_1 \cdot C_1 \quad [3]$$

El desarrollo matemático del modelo comienza con la integración de la ecuación [2], obteniéndose,

$$C_2 = C_2^0 \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad [4]$$

donde C_2^0 corresponde a la cantidad inicial (para $t=0$) de iones presentes en la semilla.

Sustituyendo C_2 en [3],

$$\frac{dC_1}{dt} = k_2 \cdot C_2^o \cdot e^{-k_2 \cdot t} - k_1 \cdot C_1 \quad [5]$$

reagrupando términos,

$$\left(\frac{dC_1}{dt} + k_1 \cdot C_1 \right) \cdot e^{-k_1 \cdot t} = k_2 \cdot C_2^o \cdot e^{-k_2 \cdot t} \cdot e^{k_1 \cdot t} \quad [6]$$

integrando la ecuación [6],

$$C_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} = k_2 \cdot \frac{C_2^o}{k_1 - k_2} \cdot e^{k_1 \cdot t - k_2 \cdot t} + cte \quad [7]$$

el valor de la constante se obtiene para $t=0$, donde $C_1 = C_1^o$,

$$cte = C_1^o - \frac{k_2 \cdot C_2^o}{k_1 - k_2} \quad [8]$$

la ecuación [8] se sustituye en [7] y reagrupando términos se obtiene,

$$C_1 = C_1^o \cdot e^{-k_1 \cdot t} - \frac{k_2 \cdot C_2^o}{k_1 - k_2} \cdot (e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t}) \quad [9]$$

Una vez obtenido el valor de C_1 se sustituye en la ecuación [1],

$$\frac{dC}{dt} = k_1 \cdot [C_1^o \cdot e^{-k_1 \cdot t} - k_2 \cdot \frac{C_2^o}{k_1 - k_2} \cdot (e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t})] \quad [10]$$

y por integración se obtiene el valor de C ,

$$C = C_1^o (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + \frac{k_1 \cdot C_2^o}{k_1 - k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) - \frac{k_2 \cdot C_2^o}{k_1 - k_2} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad [11]$$

Los valores experimentales de ICE se ajustaron a la ecuación anterior. Sin embargo, el ajuste no puede considerarse satisfactorio desde el punto de vista estadístico, por los valores de la desviación estándar de los parámetros estimados y de los residuales, debido probablemente al cambio de tendencia en la liberación de iones observado a períodos prolongados de imbibición (Fig. 27). Esta variación en la liberación de iones se produce en todos los casos analizados aproximadamente a partir de las 16 horas de imbibición, momento que puede considerarse como tiempo crítico. Conviene señalar, no obstante, que este cambio de tendencia no se detecta en los exudados procedentes de los pericarpios (Fig. 29) y de las semillas (Fig. 30). Si este cambio de tendencia es el responsable de la falta de ajuste señalada anteriormente, la posibilidad inmediata sería verificar la hipótesis planteada en el modelo mediante el ajuste de los valores experimentales obtenidos desde el comienzo de la imbibición hasta el tiempo crítico. Cuando se considera este período de imbibición (0-16 h), el ajuste a la función matemática que desarrolla el modelo de cesión propuesto fue satisfactorio desde el punto de vista estadístico, ya que en todos los casos se alcanzó la convergencia entre los valores experimentales y los estimados por la función (Tabla 39), obteniéndose coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,9993. Los parámetros estimados para la liberación de iones procedentes de las SP no presentan diferencias significativas (Tabla 40), mientras que

en el caso de las SG existen diferencias que afectan a la cantidad inicial de iones liberados desde el pericarpio (C_1^0) y desde la semilla (C_2^0).

Con objeto de completar el estudio sobre la evolución de la liberación de iones durante todo el proceso de imbibición, se procedió a analizar dicha evolución teniendo en cuenta el período comprendido entre 16 y 24 horas. Los valores experimentales de ICE durante este período (Fig. 31), mostraron una tendencia similar a la observada para las semillas sin pericarpio (Fig. 30), por lo que se ajustaron a funciones matemáticas de tipo sigmoide. Para todos los casos analizados, los valores experimentales se ajustaron a una función monomolecular. Si bien se alcanzó la convergencia, como revelan los parámetros estimados (Tabla 42), los coeficientes de determinación (R^2) no pueden considerarse en todos los casos satisfactorios, ya que los mismos estuvieron comprendidos en los rangos 0,7846-0,9915, para las SP y 0,6629-0,9494, para las SG. No obstante, el análisis estadístico de estos parámetros revela que, para ambos tipos de semillas, existen diferencias significativas por efecto del tiempo de envejecimiento (Tabla 43), que se reflejan, según el test múltiple de Duncan (Tabla 42), en las semillas más envejecidas.

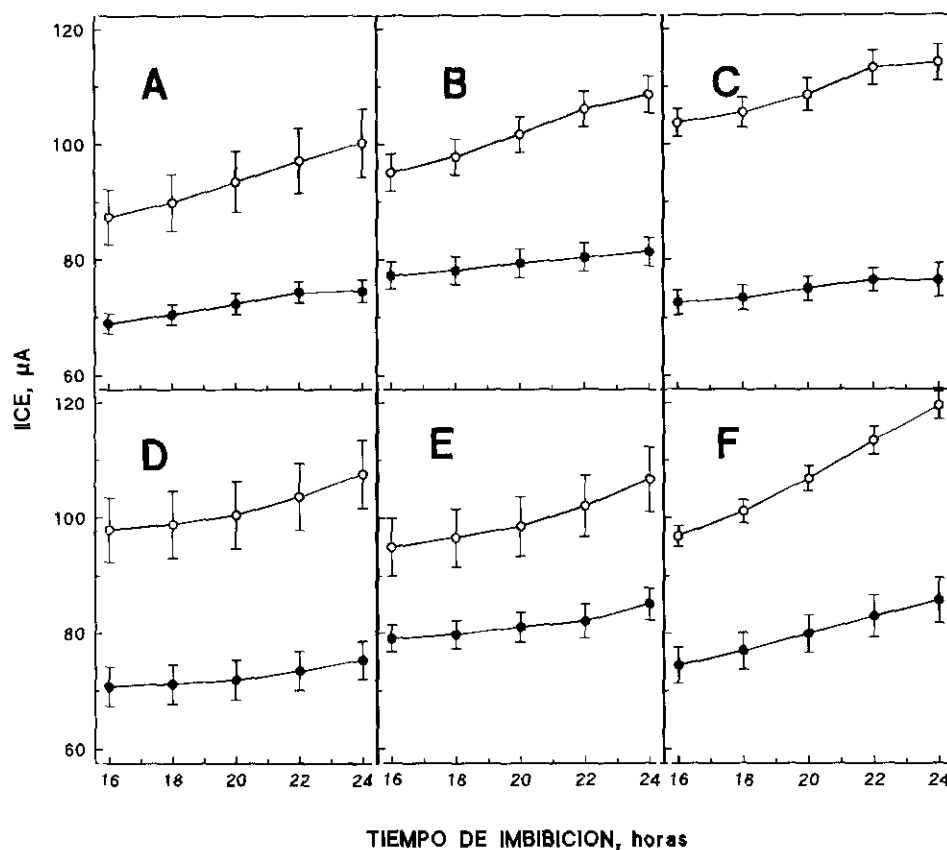


Figura 31. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (μA) de los exudados de semillas completas de girasol cv. Perdovik entre las 16 y 24 horas de imbibición. SP (círculos negros) y SG (círculos blancos). Semillas no tratadas (A), y envejecidas artificialmente durante 1, 3, 5, 7 y 11 días (B, C, D, E y F, respectivamente). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones cada una con 25 determinaciones independientes.

TABLA 37. Parámetros estimados para el ajuste a la función monomolecular: $L=C(1 - e^{-k.t})$ para la liberación de iones determinada en los exudados procedentes de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, libres de pericarpio y artificialmente envejecidas. C y K, parámetros estimados por la función, cuyo significado biológico queda reflejados en el texto. Cada dato representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones, cada una con 25 semillas. Para cada columna, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test múltiple de Duncan, para el nivel de significación señalado en la Tabla 38.

TIEMPO DE ENVEJECIMIENTO, días	PARÁMETROS	
	C	K ($\times 10^2$)
Semillas pequeñas:		
0	50,72 \pm 7,62 ab	6,18 \pm 0,90 a
1	43,03 \pm 3,51 a	10,73 \pm 1,21 ab
3	52,67 \pm 4,59 ab	7,55 \pm 0,53 ab
5	44,21 \pm 2,38 a	10,73 \pm 0,93 ab
7	55,03 \pm 1,67 ab	9,38 \pm 0,43 ab
11	69,00 \pm 2,52 b	12,03 \pm 1,17 b
Semillas grandes:		
0	65,90 \pm 7,45 a	7,53 \pm 0,53 ab
1	74,92 \pm 17,78 a	7,20 \pm 0,69 a
3	95,11 \pm 16,41 ab	5,33 \pm 0,49 a
5	76,45 \pm 23,16 a	10,78 \pm 0,88 b
7	86,57 \pm 21,43 ab	8,85 \pm 0,99 ab
11	142,74 \pm 7,08 b	7,37 \pm 1,42 ab

TABLA 38. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los parámetros de liberación estimados por la función monomolecular para las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) SP y SG, sometidas a 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,01$ (**) y $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	SP		SG	
		C	K	C	K
Envejecimiento	5	1761,446**	0,0097**	15242,47***	0,0067*
Error	18	1274,322	0,0060	5059,18	0,0058

TABLA 39. Parámetros estimados para la función (ecuación [11]) que define el modelo propuesto para la de liberación de iones de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), hasta las 16 horas de imbibición. Función y significación biológica de los parámetros, señaladas en el texto. Cada dato representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones. Los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el nivel de significación señalado en la Tabla 41.

TIEMPO DE ENVEJECIMIENTO, días	PARÁMETROS			
	C_1°	k_1	C_2°	$k_2(x10^{-1})$
semillas pequeñas:				
0	41,06 \pm 1,98	1,61 \pm 0,09	28,53 \pm 0,66	2,4 \pm 0,1
1	40,14 \pm 1,90	1,71 \pm 0,11	37,80 \pm 1,27	2,6 \pm 0,2
3	42,02 \pm 0,85	2,02 \pm 0,23	30,90 \pm 2,02	2,8 \pm 0,3
5	35,54 \pm 2,80	1,90 \pm 0,18	36,21 \pm 1,76	2,6 \pm 0,2
7	38,59 \pm 1,34	1,95 \pm 0,15	41,54 \pm 3,44	2,5 \pm 0,2
11	8,53 \pm 3,20	1,93 \pm 0,16	36,16 \pm 2,53	3,1 \pm 0,3
semillas grandes:				
0	50,26 \pm 2,95 ab	1,75 \pm 0,17	36,67 \pm 2,67 a	2,8 \pm 0,3
1	53,00 \pm 2,86 b	2,00 \pm 0,11	41,45 \pm 1,14 ab	2,6 \pm 0,2
3	44,87 \pm 3,21 ab	2,44 \pm 0,30	60,17 \pm 2,49 c	2,5 \pm 0,4
5	45,59 \pm 1,50 ab	2,16 \pm 0,18	55,41 \pm 4,69 bc	2,2 \pm 0,1
7	40,62 \pm 2,92 a	2,61 \pm 0,47	56,59 \pm 2,92 bc	1,9 \pm 0,1
11	48,12 \pm 1,41 ab	1,73 \pm 0,17	51,94 \pm 2,89 bc	1,8 \pm 0,3

TABLA 40. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los parámetros estimados (Tabla 39) por la función que define el modelo propuesto para la liberación de iones procedentes de semillas (SP) completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), imbibidas durante 16 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS) a $P \geq 0,05$.

Fuente de variación	gl	C_1°	k_1	C_2°	k_2
Envejecimiento	5	105,929NS	0,499NS	447,547NS	0,014NS
Error	18	337,856	0,102	328,953	0,038

TABLA 41. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los parámetros estimados (Tabla 39) por la función que define el modelo propuesto para la liberación de iones procedentes de semillas (SG) completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), imbibidas durante 16 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	C_1°	k_1	C_2°	k_2
Envejecimiento	5	380,278*	2,613NS	1720,199**	0,034NS
Error	18	479,488	5,061	641,935	0,0608

TABLA 42. Parámetros estimados para la función monomolecular: $L = C(1 - e^{-k.t})$ para la liberación de iones (16-24 horas de imbibición) determinada en los exudados procedentes de semillas completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, artificialmente envejecidas. C y K, parámetros estimados por la función cuyo significado biológico, queda reflejado en el texto. Cada dato representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones, cada una con 25 semillas. Para cada columna, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test múltiple de Duncan, para el nivel de significación señalado en la Tabla 43.

TIEMPO DE ENVEJECIMIENTO, días	PARÁMETROS	
	C	K ($\times 10^{-2}$)
Semillas pequeñas:		
0	78,03 \pm 2,01 a	13,35 \pm 0,33 a
1	82,41 \pm 2,49 a	16,97 \pm 0,17 b
3	79,63 \pm 1,52 a	14,85 \pm 0,92 c
5	76,25 \pm 3,14 a	15,78 \pm 0,81 c
7	86,98 \pm 3,15 a	26,27 \pm 0,65 c
11	96,25 \pm 5,37 b	9,15 \pm 0,41 c
Semillas grandes:		
0	106,78 \pm 6,25 a	11,40 \pm 0,50 a
1	115,05 \pm 3,19 a	13,38 \pm 0,64 b
3	117,92 \pm 4,22 a	13,78 \pm 0,90 b
5	107,77 \pm 5,81 a	15,32 \pm 0,80 bc
7	108,89 \pm 5,83 a	13,05 \pm 0,56 bc
11	139,99 \pm 3,55 b	7,28 \pm 0,25 c

TABLA 43. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los parámetros estimados por la función monomolecular para las semillas completas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, desde las 16 a las 24 horas de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (***) y $P \leq 0,01$ (**).

Fuente de variación	gl	SP		SG	
		C	K	C	K
Envejecimiento	5	1092,373**	0,0151***	3133,925**	0,0151***
Error	18	735,223	0,0024	1771,019	0,0029

4.4. Cinética de captación de agua de las semillas de girasol

El peso de las semillas (SP y SG) durante la imbibición se muestra en la Figura 32. Se puede observar que, en todos los casos, el peso de las semillas se incrementa de forma acusada durante las primeras horas de imbibición y tiende a estabilizarse durante el proceso de rehidratación. En las SP esta tendencia se detecta a partir de las 4 horas de imbibición (Fig. 32A), mientras que las SG necesitan permanecer al menos durante 10 horas en estas condiciones para que su peso se estabilice (Fig. 32B). Por otra parte, para determinar si el envejecimiento afectaba de alguna manera a este proceso, se realizó el mismo estudio en las semillas envejecidas durante 11 días. Los resultados muestran que las semillas envejecidas (SP y SG) se comportan durante la imbibición de forma semejante a las semillas no tratadas, durante la imbibición (Fig. 32).

La cinética de captación de agua, expresada como contenido de agua por gramo de semilla, se muestra en la Figura 33. Esta forma de expresar los resultados permite comparar ambos tipos de semillas y demuestra que la hidratación de las SP (Fig. 33A) es mucho más rápida que la de las SG (Fig. 33B), tanto para las semillas no tratadas como para las envejecidas durante 11 días, lo cual se puede atribuir a la distinta superficie de contacto con el agua. Sin embargo, si comparamos la cantidad de agua absorbida por las semillas en cada hora (Fig. 34) se observa que las mayores diferencias entre ambos tipos de semillas tienen lugar durante la primera hora de imbibición, en la que las SP no tratadas captan aproximadamente un 22 % más de agua que las SG. Por otra parte, la cantidad de agua absorbida (SP y SG) en las horas posteriores es siempre muy inferior a la detectada durante la primera hora de imbibición. Las semillas envejecidas presentaron una cinética semejante y sin diferencias significativas (Tabla 44) respecto a las semillas no tratadas, aunque el perfil que muestra la Figura 34 indica que la entrada de agua durante la primera hora de imbibición es inferior a la que se observa en las semillas no envejecidas mientras que durante la segunda hora, la cantidad de agua absorbida es todavía importante. La captación de agua en los períodos más prolongados de imbibición no presenta diferencias relevantes entre los distintos tipos de semillas.

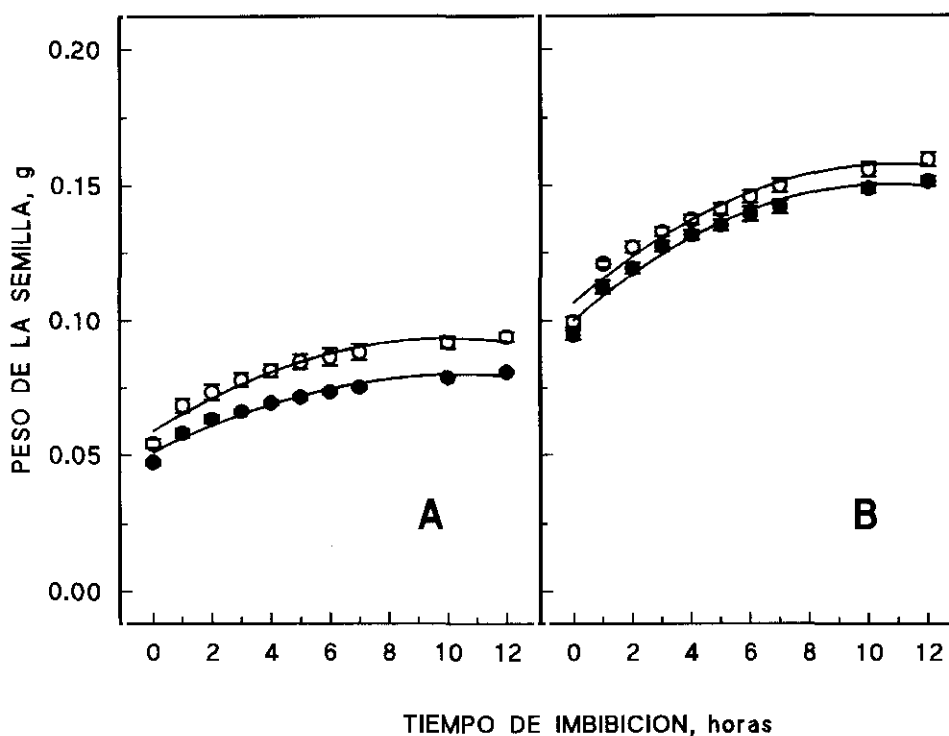


Figura 32. Cinética de captación de agua expresada en función del peso (g) de las semillas de girasol cv. Peredovik durante las primeras 12 horas de imbibición. Círculos blancos y negros, semillas no tratadas y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días, respectivamente. **A**, SP; **B**, SG. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro ensayos independientes.

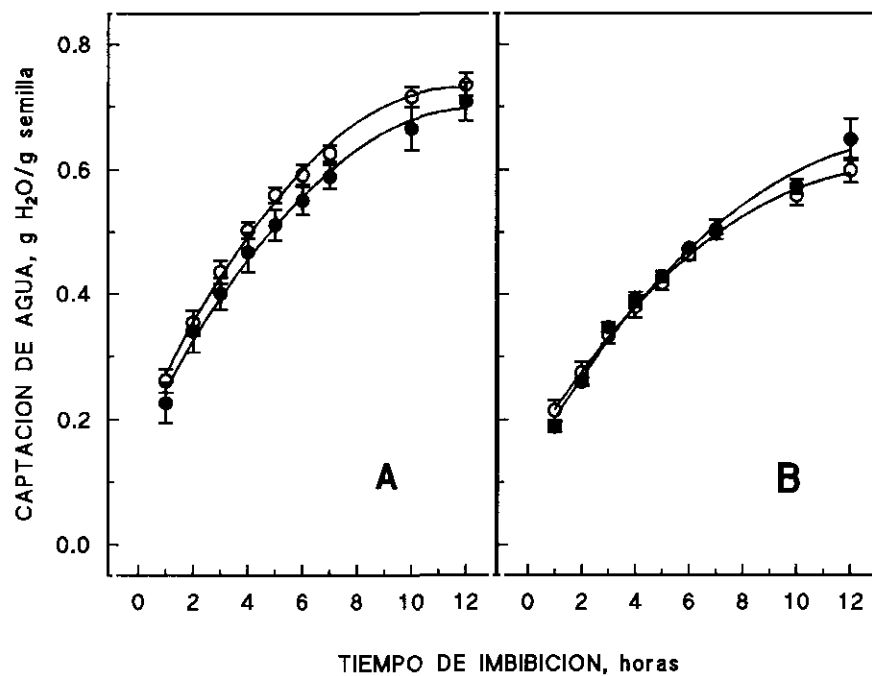


Figura 33. Evolución de la cinética de captación de agua de las semillas (SP y SG) de girasol cv. Peredovik (A y B, respectivamente). Semillas no tratadas (círculos blancos) y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días (círculos negros). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes.

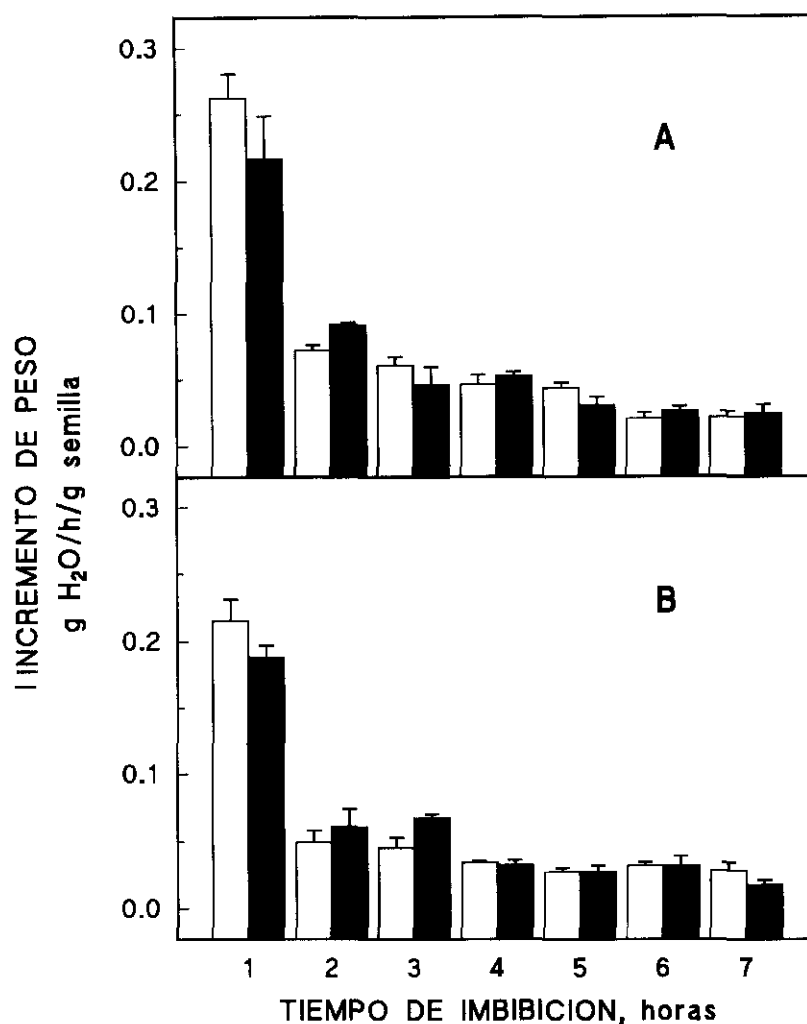


Figura 34. Incremento de peso de las semillas de girasol (SP y SG) cv. Peredovik (A y B, respectivamente) durante las 7 primeras horas de imbibición a 25 °C. Barras blancas, semillas no tratadas y barras negras, semillas envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días. Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes.

TABLA 44. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de agua captada por cada gramo de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, durante el proceso de imbibición, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	1	0,039NS	0,00069NS
Error	70	1,764	1,241

4.5. Contenido de malondialdehído en semillas de girasol

La evolución de la cantidad de MDA presente en las SP y SG sometidas a envejecimiento artificial se muestran en las Figuras 35 y 36, respectivamente. Se puede observar que la cantidad de MDA detectada en SP (expresada por gramo de tejido) es superior a la detectada en SG. El análisis estadístico (Tabla 45) revela que las diferencias entre ambos tipos de semillas son estadísticamente significativas por efecto del tamaño y del tiempo de envejecimiento. Sin embargo, esta fuente de variación analizada individualmente en cada tipo de semilla (Tabla 46) no presenta alteraciones significativas respecto al contenido de MDA detectado en las semillas en estado seco.

Las SP sometidas a 4 horas de imbibición en condiciones de germinación muestran un descenso muy significativo (Tabla 47) de la cantidad de MDA, respecto a la cantidad detectada en las semillas en estado seco (Fig. 35). Este descenso es más patente en las semillas no tratadas (Fig. 37) donde alcanza un 55 % del valor obtenido en semilla seca. En las semillas envejecidas se observa que el descenso es más importante a medida que avanza el tiempo de tratamiento, obteniéndose valores próximos al control a los 11 días de envejecimiento.

Los resultados obtenidos a las 4 horas de imbibición muestran diferencias muy significativas entre los distintos tiempos de envejecimiento (Tabla 48), que según el test múltiple de Duncan (Fig. 35) se manifiestan en todas las semillas envejecidas respecto a las semillas no tratadas y entre las semillas envejecidas se pueden distinguir las sometidas a 1, 3 y 5 días de tratamiento respecto a las envejecidas durante 7 y 11 días. Por otra parte, se observa la tendencia al descenso de la cantidad de MDA detectada a las 4 horas a medida que avanza el envejecimiento ($r=0,8597^{***}$).

En las SG, a las 4 y 12 horas de imbibición se observa un descenso importante y significativo (Tabla 49) en la cantidad de MDA, que también es más acentuado en las semillas sometidas a períodos prolongados de envejecimiento (Fig. 36), aunque el análisis

estadístico no revela diferencias significativas entre los valores de MDA detectados a las 4 horas ni entre los detectados a las 12 horas (Tabla 50). Cuando la determinación de MDA se realiza a las 12 horas de imbibición, se observa un descenso muy acusado (Fig. 36) de la cantidad de MDA presente en los tejidos, alcanzándose valores inferiores al 33% del contenido de MDA presente en semilla seca.

La Figura 38 presenta los resultados obtenidos en las semillas envejecidas, como porcentaje relativo a las semillas no tratadas. Se pone de manifiesto, como se ha comentado anteriormente, que el tratamiento no altera los niveles de MDA detectados en las semillas (tanto SP como SG) en estado seco y es la hidratación la que produce mayores diferencias entre los distintos períodos de envejecimiento.

Por otra parte, la correlación existente entre la cantidad de MDA detectado en las semillas en estado seco y los niveles observados en las semillas hidratadas durante 4 horas, SP ($r=0,7377^{***}$) y SG ($r=0,8524^{***}$), parece indicar que la cantidad de MDA en estas condiciones proviene fundamentalmente de la cantidad de MDA presente en las semillas en estado seco.

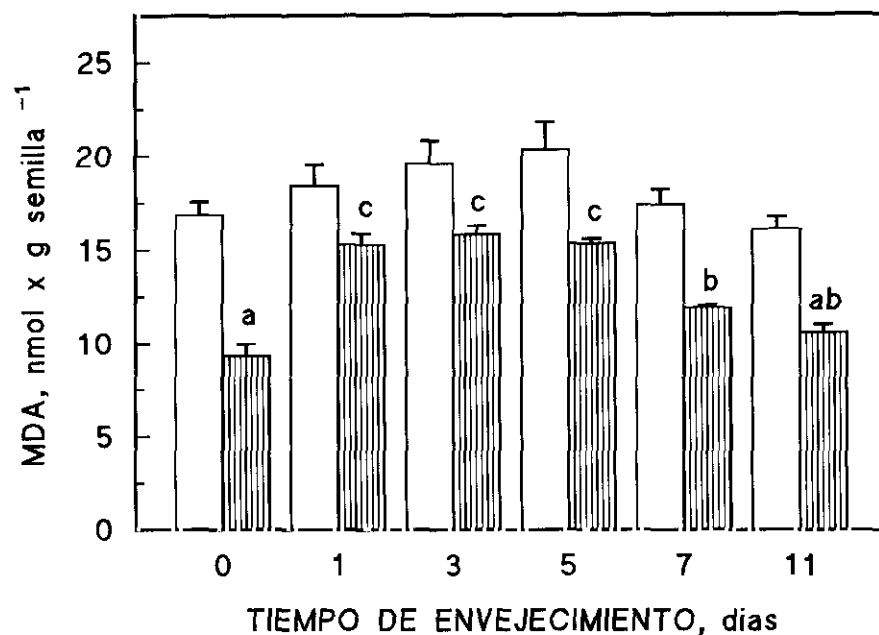


Figura 35. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el contenido de malondialdehído de las semillas de girasol (SP) cv. Peredovik, en estado seco (barras blancas) y sometidas a 4 horas de imbibición (barras rayadas). Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 48).

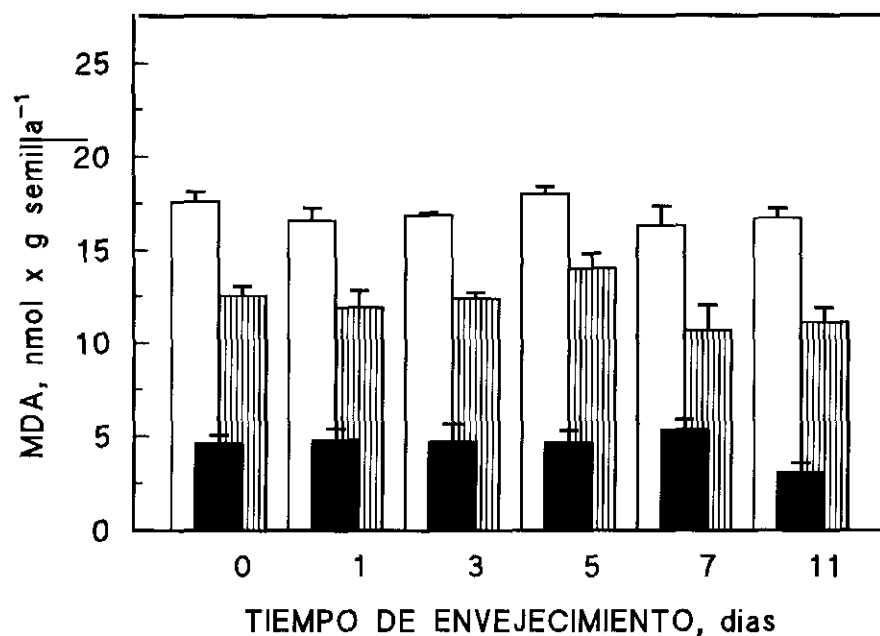


Figura 36. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en el contenido de malondialdehído de las semillas de girasol (SG) cv. Peredovik, en estado seco (barras blancas) y sometidas a 4 y 12 horas de imbibición (barras rayadas y negras, respectivamente). Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes.

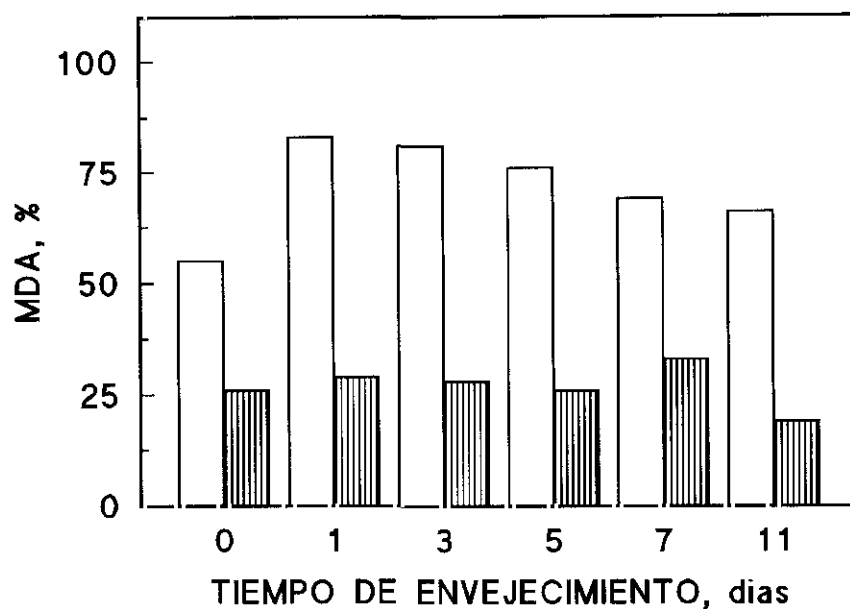


Figura 37. Contenido de malondialdehído de las semillas de girasol cv. Peredovik artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR) y sometidas a 4 (SP) y 12 (SG) horas de imbibición (barras blancas y rayadas, respectivamente). Contenido de MDA expresado como porcentaje respecto a la cantidad de MDA detectada en las semillas en estado seco.

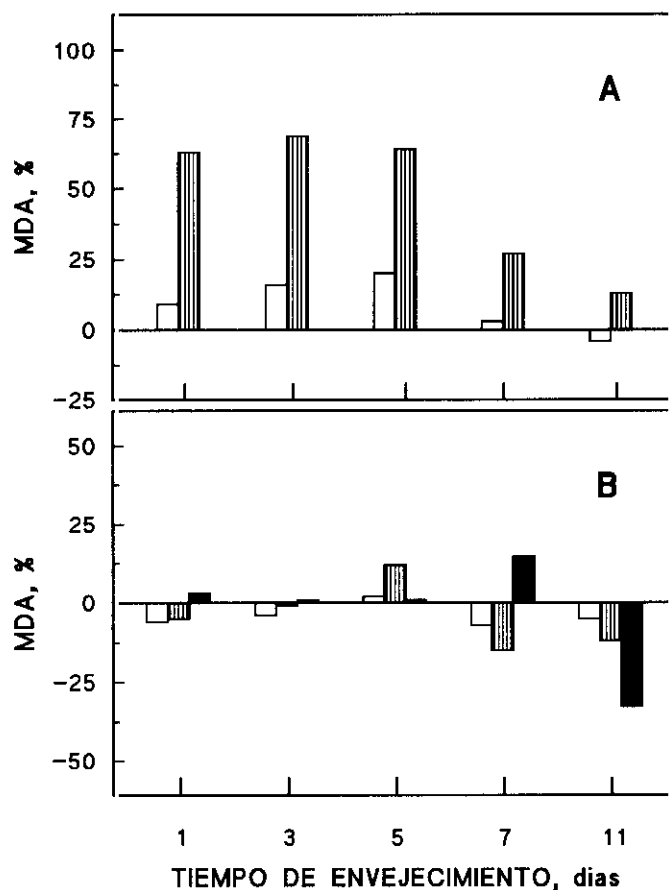


Figura 38. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43°C, 75 % HR) en el contenido de malondialdehido de las semillas de girasol cv. Peredovik, SP (A) y SG (B), expresado como porcentaje de MDA respecto a la cantidad presente en semillas no tratadas. Barras blancas, semillas en estado seco y barras rayadas y negras, semillas imbibidas durante 4 y 12 horas, respectivamente.

TABLA 45. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de MDA detectado en las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,05$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	MDA
Envejecimiento (t)	5	39,637*
Tamaño (T)	1	14,741*
Interacción (txT)	5	21,773NS
Error	36	107,886

TABLA 46. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de MDA detectado en las semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	53,281NS	8,123NS
Error	18	79,948	27,938

TABLA 47. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) del contenido de MDA en las semillas (SP) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	MDA
Estado de hidratación	1	290,133*
Error	46	326,406

TABLA 48. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de MDA detectado en las semillas (SP) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) sometidas a imbibición durante 4 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SP
Envejecimiento	5	155,573*
Error	18	14,543

TABLA 49. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de MDA detectado en las semillas (SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	MDA
Estado de hidratación	2	1871,367*
Error	69	153,109

TABLA 50. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la cantidad de MDA detectado en las semillas (SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) sometidas a imbibición durante 4 y 12 horas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	4 horas	12 horas
Envejecimiento	5	28,514NS	12,008NS
Error	18	52,135	24,383

4.6. Cambios asociados con la capacidad antioxidante de las semillas de girasol

La presentación de los resultados obtenidos en el estudio de los principales antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se puede realizar según diferentes criterios. La forma de exposición de los resultados que, desde nuestro punto de vista, resulta más adecuada implica la discusión conjunta de cada una de las sustancias antioxidantes estudiadas con las enzimas relacionadas con su metabolismo, comentando, en los primeros apartados, las restantes enzimas con carácter antioxidante (SOD, CAT).

4.6.1. Actividad superóxido dismutasa

La evolución de los valores de la actividad SOD (U/g semilla) durante el envejecimiento se muestra en la Figura 39. La actividad enzimática detectada en las semillas en estado seco no difiere significativamente en función del tamaño de las mismas, aunque presentan una respuesta distinta frente al envejecimiento (Tabla 51).

La actividad de la enzima en SP en estado seco (Fig. 39A) se mantiene estable durante cortos períodos de envejecimiento (1-5 días), mientras que desciende durante los días 7 y 11, aunque de forma no significativa (Tabla 52). Por el contrario, en las SG (Fig. 39B) se detecta un descenso muy significativo de la actividad enzimática, negativamente correlacionado con el tiempo de envejecimiento ($r = -0,9368^{***}$). La separación de medias según el test múltiple de Duncan pone de manifiesto la existencia de diferencias desde el primer día de tratamiento.

La actividad SOD en las semillas hidratadas (Figs. 39A y B), presenta valores significativamente inferiores a los detectados en semilla seca (Tabla 53). Asimismo, el análisis estadístico (Tabla 54) reveló diferencias significativas de la actividad SOD entre

ambos tipos de semillas en estado hidratado (4 ó 12 horas) debidas al tamaño de las mismas, aunque las SP y las SG mostraron una respuesta similar frente al tiempo de envejecimiento. Por otra parte, la evolución de la actividad SOD de las SP envejecidas y posteriormente rehidratadas, muestra valores que tienden a estabilizarse (Fig. 39A), ya que no existen diferencias significativas entre los distintos períodos de envejecimiento (Tabla 55). Una tendencia similar se observa en SG (Fig. 39B), aunque en este caso se detectaron diferencias (Tabla 55) en la actividad SOD que, según el test de Duncan, son significativas desde el primer día de envejecimiento.

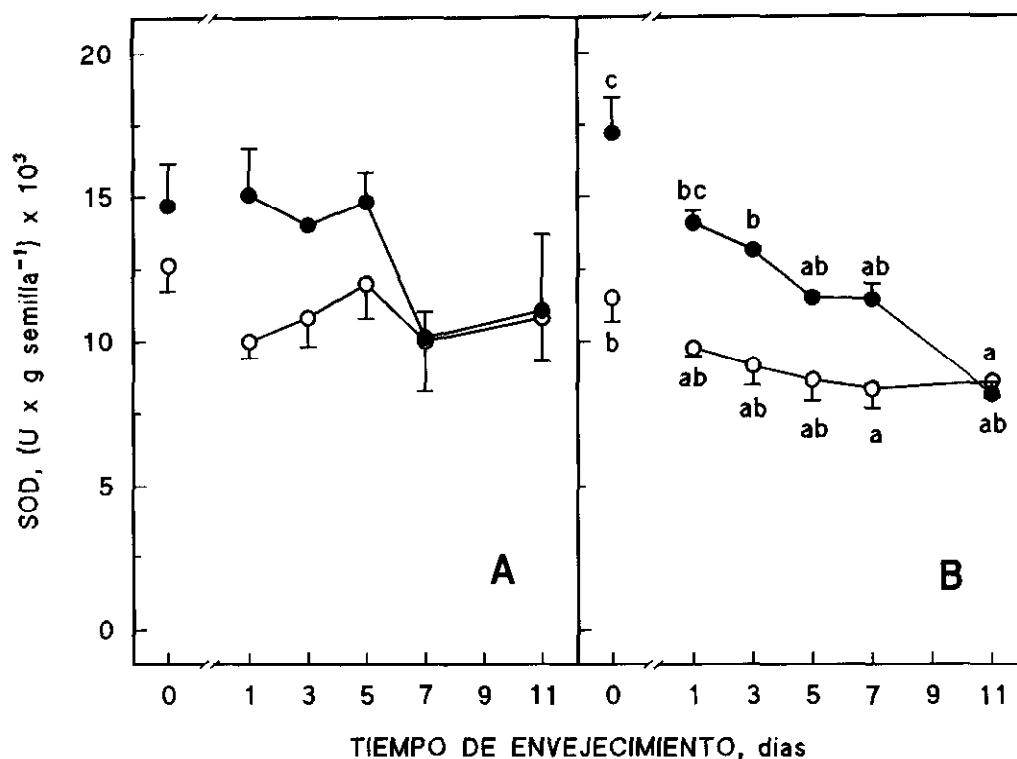


Figura 39. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43°C, 75 % HR) en la actividad superóxido dismutasa de las semillas de girasol (SP y SG) cv. Peredovik (**A** y **B**, respectivamente), en estado seco (círculos negros) e hidratadas durante 4 (SP) ó 12 (SG) horas (círculos blancos). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes. La unidad de enzima se define en el apartado de Material y Métodos. Para cada caso, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tablas 52 y 55).

TABLA 51. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad SOD de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SOD
Envejecimiento (t)	5	222.971.875*
Tamaño (T)	1	6.163.333NS
Interacción (txT)	5	52.641.666NS
Error	36	187.486.250

TABLA 52. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad SOD de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), SP y SG, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SOD	
		SP	SG
Envejecimiento	5	91.444.272NS	184.169.264*
Error	18	161.095.625	26.390.625

TABLA 53. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad SOD de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SOD	
		SP	SG
Estado de hidratación	1	60.637.552*	127.563.802*
Error	46	382.998.229	268.466.145

TABLA 54. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad SOD de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SOD
Envejecimiento (t)	5	39.916.666NS
Tamaño (T)	1	35.880.208*
Interacción (txT)	5	11.072.916NS
Error	36	137.375.000

TABLA 55. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad SOD de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	SOD	
		SP	SG
Envejecimiento	5	22.802.082NS	28.187.496*
Error	18	107.656.250	29.718.750

4.6.2. Actividad catalasa

La evolución de la actividad CAT (U/g de semilla) en función del tiempo de envejecimiento se muestra en la Figura 40. La actividad CAT detectada en SG fue superior en todos los casos a la observada en SP, presentando diferencias muy significativas (Tabla 56) en función del tamaño de las semillas, aunque la evolución de la actividad enzimática durante el envejecimiento fue similar en ambos tipos de semillas. Sin embargo, la actividad CAT en las semillas rehidratadas no presenta diferencias significativas, además de mostrar una evolución semejante durante el envejecimiento (Tabla 56). Asimismo, el análisis estadístico de cada una de estas variables en función del tiempo de envejecimiento no reveló alteraciones significativas por efecto del tratamiento (Tabla 57).

La actividad CAT en las SP y SG no envejecidas no se altera durante el proceso de rehidratación (Fig. 40). Asimismo, la actividad CAT en las SP envejecidas y posteriormente rehidratadas durante 4 horas tampoco difiere significativamente de la detectada en semilla seca (Tabla 58); sin embargo, la actividad CAT detectada en las SG envejecidas y rehidratadas fue significativamente diferente de la determinada en estas semillas en estado seco (Tabla 58)

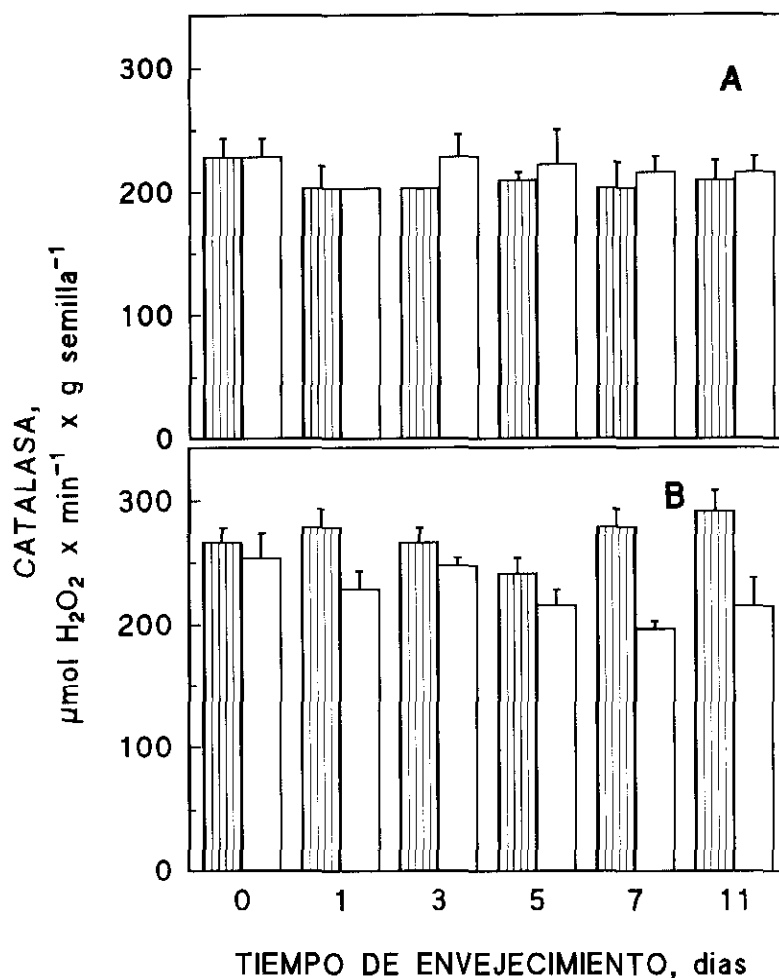


Figura 40. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la actividad catalasa de las semillas de girasol cv. Peredovik, SP (**A**) y SG (**B**), en estado seco (barras rayadas) e hidratadas durante 4 (SP) ó 12 (SG) horas (barras blancas). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes.

TABLA 56. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad CAT de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco (CAT_s) e hidratadas (CAT_H), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	CAT _s	CAT _H
Envejecimiento (t)	5	3319,679NS	7633,633NS
Tamaño (T)	1	45098,410*	649,005NS
Interacción (txT)	5	4623,544NS	3450,669NS
Error	36	29350,384	36144,678

TABLA 57. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad CAT de semillas (SP y SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco (CAT_s) e hidratadas (CAT_H), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	CAT _s		CAT _H	
		SP	SG	SP	SG
Envejecimiento	5	1921,7NS	6021,5NS	1847,9NS	9236,5NS
Error	18	15156,9	141963,5	19786,6	16358,1

TABLA 58. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad CAT de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	CAT	
		SP	SG
Estado de hidratación	1	1086,803NS	23691,853*
Error	46	38713,089	45809,493

4.6.3. Funcionalidad del ciclo ascorbato-glutation

4.6.3.1. Niveles de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, y actividades enzimáticas relacionadas

La determinación de ácido ascórbico y su forma oxidada (DHA) según la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos, reveló la ausencia de estos compuestos tanto en las semillas secas como en las sometidas a las condiciones óptimas de germinación durante 4 horas (SP) o 12 horas (SG). Asimismo, en este material biológico tampoco se detectaron las actividades de las enzimas Apox, MDred y DHred.

4.6.3.2. Niveles de glutatión y glutatión reductasa

El contenido de glutatión (total, GSH, GSSG) detectados en SP y SG en estado seco e hidratadas durante 4 y 12 horas, se presentan en las Figuras 41 y 42, respectivamente. Respecto a los niveles observados en las semillas en estado seco, la variación de los mismos durante el envejecimiento muestra una evolución muy distinta (Figs. 41A y 42A). El análisis estadístico de los resultados relativos a estos niveles (expresados por gramo de semilla) pone de manifiesto diferencias muy significativas (Tabla 59) entre las SP y las SG, tanto por efecto del tamaño de las semillas como por la diferente respuesta de las mismas al tratamiento de envejecimiento acelerado, observándose valores superiores de glutatión total e inferiores de GSSG en las SP. Consecuentemente, la incidencia de estas fuentes de variación se manifiesta en la relación GSSG/GSH (tasa de oxidación), que resultó significativa (Tabla 60).

En su estado seco, las SEMILLAS PEQUEÑAS sometidas a envejecimiento artificial durante 1, 3 y 5 días presentan un descenso muy acusado (Fig. 41A) y significativo (Tabla 61) de los niveles de glutatión total mientras que los períodos prolongados de envejecimiento, 7 y 11 días, no producen variaciones significativas de estos niveles,

estabilizándose y alcanzando valores del 55 % respecto de los detectados en semillas no envejecidas. Sin embargo, se observó un incremento progresivo de los valores de GSSG, que se hace más evidente a medida que se prolonga el tratamiento, incrementándose un 37 % en las semillas más envejecidas. El análisis estadístico de estos resultados revela que tanto el descenso de GSH como el aumento de GSSG, observados durante el envejecimiento (Fig. 41A), son estadísticamente significativos (Tabla 61). Asimismo, el test múltiple de Duncan (Fig. 41A) pone de manifiesto que: a) los niveles de GSH se alteran desde el primer día de tratamiento, b) el mantenimiento de las condiciones de envejecimiento durante 1 y 3 días produce efectos semejantes respecto a la cantidad de GSH, c) los períodos prolongados de envejecimiento producen un descenso similar en la cantidad de GSH, sin que se observen diferencias significativas entre los niveles de GSH detectados en las semillas tratadas durante 5, 7 y 11 días y d) el incremento progresivo en GSSG por efecto del tratamiento, sólo es significativo cuando el envejecimiento es muy prolongado.

La distribución porcentual del glutatión total en las fracciones de GSH y GSSG se modifica sustancialmente en función del envejecimiento (Fig. 43A). En semillas no envejecidas, el GSH corresponde aproximadamente al 80 % del total, mientras que, a medida que se prolonga el tiempo de envejecimiento, los valores de GSH varían desde un 75 % en semillas envejecidas durante 1 día hasta un 47 % en semillas envejecidas durante 7 y 11 días. Consecuentemente, la proporción de GSSG varía de forma inversa.

Por otra parte, la disminución de glutatión total se produce fundamentalmente por un descenso en el GSH, lo cual supone un incremento muy acusado (Fig. 44A) de la tasa de oxidación medida como GSSG/GSH, que aumenta de forma lineal con el tiempo de envejecimiento ($y = 0,1126 x + 0,2060$ $r = 0,7694^{***}$). Dicho incremento resultó ser significativo (Tabla 62), especialmente a partir del tercer día de tratamiento como revela la separación de medias realizada por el test múltiple de Duncan.

En relación con las **SEMILLAS DE MAYOR TAMAÑO**, conviene reiterar que presentan un comportamiento diferente frente al envejecimiento. Los valores de glutatión total (Fig. 42A) se mantienen prácticamente constantes, y no se detectaron diferencias significativas en función del tiempo de envejecimiento (Tabla 63). Consecuentemente, la evolución de GSH y GSSG fue asimismo no significativa (Tabla 63). Sin embargo, la distribución del glutatión total en las formas GSH:GSSG (Fig. 45A), se desplaza hacia la formación de GSSG, que pasa del 51 % del total en semillas no envejecidas, al 62 % en las semillas sometidas a 11 días de tratamiento. Por otra parte, la tasa de oxidación (Fig. 46A) no se incrementa de forma lineal, siendo este aumento no significativo (Tabla 62) en función del tiempo de envejecimiento.

Resulta conveniente considerar la forma de expresar los resultados, ya que puede dar lugar a diferentes interpretaciones y/o conclusiones. Cuando los niveles de glutatión se expresan por gramo de semilla se puede observar que los niveles de glutatión son superiores en SP. Por el contrario, cuando los resultados se expresan por semilla, se obtienen valores superiores en SG, que en el caso de las semillas no envejecidas corresponden a 0,043 y 0,038 μmol .

Con objeto de analizar esta aparente contradicción se determinó la diferente aportación del eje embrionario y de los cotiledones al contenido total de glutatión, en semillas envejecidas durante 11 días en comparación con las no tratadas.

La Tabla 64 muestra la localización del contenido de GSH y GSSG en las distintas partes de la semilla. Se puede observar que la concentración de GSH en el eje embrionario es muy superior a la detectada en los cotiledones, independientemente del tratamiento y del tamaño de la semilla. Sin embargo, la cantidad de GSH y GSSG, en semilla completa, varía dependiendo del tamaño de las mismas. En el caso de las SP, tanto envejecidas como no envejecidas, presentan un mayor contenido de GSH, en comparación con los valores determinados en SG, mientras que la cantidad de GSSG es inferior en las SP. Estas diferencias podrían explicarse por la distinta aportación del eje embrionario y cotiledones

al peso total de la semilla. De acuerdo con nuestras determinaciones, el embrión representa un 8 y 10 % del peso total en las SP y SG, respectivamente.

Asimismo, la Tabla 64 muestra que el descenso de GSH, en las SP envejecidas durante 11 días, se produce a expensas del glutatión presente en los cotiledones, que alcanza un 25 % del valor inicial, mientras que el eje embrionario mantiene un 46 % del glutatión presente inicialmente. Por el contrario, en las SG envejecidas durante 11 días, los cotiledones mantienen el 63 % del total de glutatión inicial, mientras que el nivel en el eje embrionario desciende hasta un 45 % del valor de partida.

La formación de GSSG durante el envejecimiento (Tabla 64) de las SP tiene lugar en igual medida en eje embrionario y cotiledones, mientras que en las SG no se produce un incremento detectable de GSSG en los cotiledones, siendo el eje embrionario la parte de la semilla donde se produce una mayor transformación de GSH en GSSG por efecto del envejecimiento acelerado.

Por otra parte, la evolución de los niveles de estos compuestos en **SP** y **SG HIDRATADAS**, se presenta en las Figuras 41B y 42B, respectivamente. Los valores de glutatión total, GSH y GSSG detectados en las SP y las SG sometidas al proceso de hidratación (4 y 12 horas, respectivamente) presentan diferencias significativas (Tabla 65), además de una evolución diferente en respuesta al envejecimiento. Asimismo, las correspondientes tasas de oxidación (Figs. 44B y 46B), se diferencian significativamente (Tabla 66) por efecto del envejecimiento, independientemente del tamaño de la semilla.

El estado de hidratación tiene una profunda influencia en los niveles de glutatión presentes en las SP (Tabla 67). Estas semillas, a las 4 horas de hidratación, muestran un incremento evidente (Fig. 41B) de los niveles de glutatión total (de 0,85 a 0,95 $\mu\text{mol/g}$ semilla, en semillas no envejecidas). Este incremento tiene lugar fundamentalmente por formación de GSH. En comparación con la semilla seca, los niveles de GSSG descienden drásticamente, hasta alcanzar valores que corresponden a un 5 % del glutatión total frente

al 20 % de GSSG detectado en la semilla en estado seco. Las semillas envejecidas responden de igual forma, es decir, incrementan la cantidad de glutatión total y disminuyen los niveles de GSSG en comparación con los valores observados en semilla seca. El incremento en la cantidad de glutatión total varía desde 10 % en semillas no envejecidas hasta un máximo del 67 % en semillas envejecidas 7 días (Tabla 68).

Respecto a la evolución de los niveles de glutatión de las **SP ENVEJECIDAS Y REHIDRATADAS**, se observa una disminución muy significativa a medida que se prolonga el tiempo de exposición a las condiciones de envejecimiento (Tabla 69), que viene acompañado por un aumento de GSSG. Tanto esta disminución como este incremento son lineales frente al tiempo de envejecimiento y vienen definidos por las siguientes ecuaciones:

Glutacion total	$y = -0,02313 x + 0,9482;$	$r = -0,7806^{***}$
GSH	$y = -0,02594 x + 0,8944;$	$r = 0,7959^{***}$
GSSG	$y = 0,00279 x + 0,0535;$	$r = 0,6787^{**}$

El test múltiple de Duncan, reflejado en la Figura 41B, muestra que tanto el glutatión total como el GSH de las semillas no tratadas son superiores a los de las semillas envejecidas durante 1 y 3 días, aunque las diferencias significativas se detectan en los períodos superiores a 3 días de tratamiento. Por el contrario, los niveles de GSSG, aunque aumentan de forma progresiva, sólo presentan diferencias significativas en los períodos más avanzados de envejecimiento.

La distribución de glutatión total en sus formas GSH y GSSG (Fig. 43B) en las semillas hidratadas está en todos los casos desplazada hacia la forma reducida. Sin embargo, la tasa de oxidación (Fig. 44B) aumenta lineal ($y = 0,0077 x + 0,05346;$ $r = 0,7694^{***}$) y significativamente (Tabla 70) en función del tiempo de envejecimiento.

Las SEMILLAS DE MAYOR TAMAÑO (SG) se comportan de forma similar a las SP (Fig. 42B) durante la HIDRATACIÓN (12 horas), en el sentido de que se puede observar un incremento significativo (Tabla 71) de la cantidad de glutatión total y un descenso de GSSG muy acusado en comparación con los valores detectados en semilla seca. Sin embargo, el incremento de glutatión total (Tabla 68) se produce de forma más acusada en las semillas no envejecidas (96 %) que en las semillas sometidas a tratamiento (76-18%), lo que refleja un comportamiento diferente respecto a las SP, donde los mayores incrementos en los valores de glutatión total se producían en las semillas envejecidas 7 días.

Los niveles de glutatión total y GSH disminuyen de forma significativa (Tabla 72) por efecto del envejecimiento. Esta disminución viene acompañada por un incremento menos acusado de GSSG. En estas semillas también existe una relación lineal entre los niveles detectados de estos compuestos y el tiempo que han estado sometidas a las condiciones de envejecimiento, que viene definida por las siguientes ecuaciones:

Glutatión total	$y = -0,03468 x + 0,8942;$	$r = 0,7937^{***}$
GSH	$y = -0,03721 x + 0,8487;$	$r = -0,8165^{***}$
GSSG	$y = 0,00256 x + 0,0453;$	$r = 0,7158^{***}$

La distribución del glutatión en sus formas oxidada y reducida (Fig. 45B) se desplaza hacia la formación de GSH en todos los casos, aunque la tasa de oxidación (Fig. 46B) también aumenta de forma lineal ($y = 0,0105 x + 0,04301;$ $r = 0,9097^{***}$) y significativamente (Tabla 70) en función del tiempo de envejecimiento.

Los niveles de glutatión reducido de las semillas (SP y SG) envejecidas y posteriormente rehidratadas muestran muy buena correlación con los valores normalizados de viabilidad ($r = 0,9106^{***}$ y $r = 0,8994^{***}$, respectivamente). Por otra parte, se observaron también buenas correlaciones entre la aparición de plántulas anormales y

semillas muertas y los valores de GSSG detectados en las SP ($r=0,7150^{***}$ y $r=0,8316^{***}$) y las SG ($r=0,7887^{***}$ y $r=0,8677^{***}$) rehidratadas.

Respecto a la GSSGred, las semillas (SP y SG) en estado seco presentaron una importante actividad (Fig. 47). Ambos tipos de semillas se diferencian significativamente (Tabla 73) en relación con esta actividad enzimática, presentando además una diferente evolución debida al tratamiento de envejecimiento acelerado.

La actividad GSSGred de las SP se mantiene durante el envejecimiento, aunque presentan diferencias significativas por efecto del tratamiento (Tabla 74). El test múltiple de Duncan, recogido en la Figura 47A, permite señalar que la actividad sólo se modifica de forma importante en semillas sometidas a períodos prolongados de envejecimiento, observándose un descenso acusado en las semillas almacenadas durante 11 días. Las SG (Fig. 47B) responden de manera diferente al tratamiento ya que la actividad GSSGred, respecto a la detectada en las semillas no tratadas, se incrementa en las semillas envejecidas durante 1 a 5 días y desciende posteriormente, alcanzando su valor mínimo el día 11 de envejecimiento. Esta respuesta se refleja en la separación de medias según el test múltiple de Duncan.

Por otra parte, la actividad GSSGred en las semillas rehidratadas (4 y 12 horas, respectivamente) presenta un incremento significativo (Tabla 75) respecto a la detectada en semilla seca. Las SP sometidas a 4 horas de imbibición muestran una evolución similar a las SP en estado seco (Fig. 47A), presentándose diferencias significativas por efecto del tiempo de envejecimiento (Tabla 74). En este caso es también el día 11 de tratamiento el que induce la disminución más importante de esta actividad enzimática. Del mismo modo, las SG rehidratadas también evolucionan de forma muy similar y no significativa (Tabla 75) respecto a la que presentaron en estado seco. En este caso la actividad GSSGred está afectada por el tiempo de de envejecimiento (Tabla 74), observándose un incremento significativo, según el test de Duncan, con valores superiores a los detectados en las semillas no tratadas, durante los días 1 a 7, que descienden en el día 11 de envejecimiento.

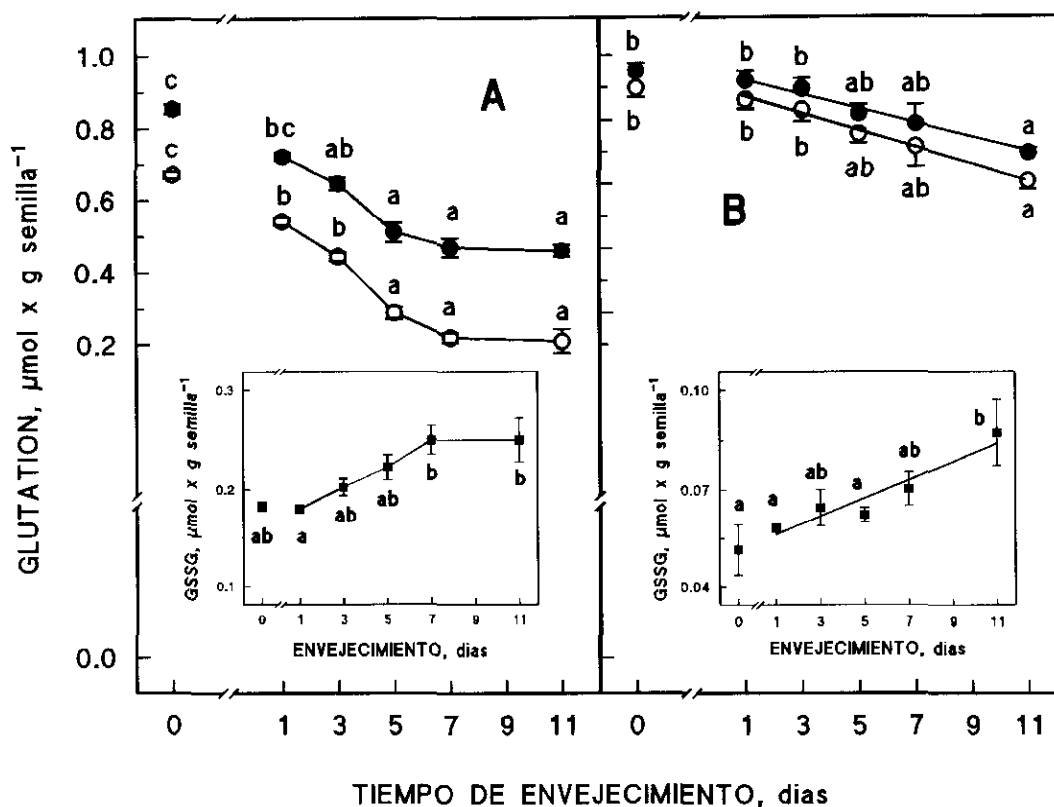


Figura 41. Evolución de los niveles de glutatión de las semillas de girasol (SP) en estado seco (A) y sometidas a 4 horas de imbibición (B), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Círculos negros, glutatión total y círculos blancos, GSH. Figura interior, niveles de GSSG. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Para cada variable, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan para el correspondiente análisis de varianza (Tablas 61 y 69).

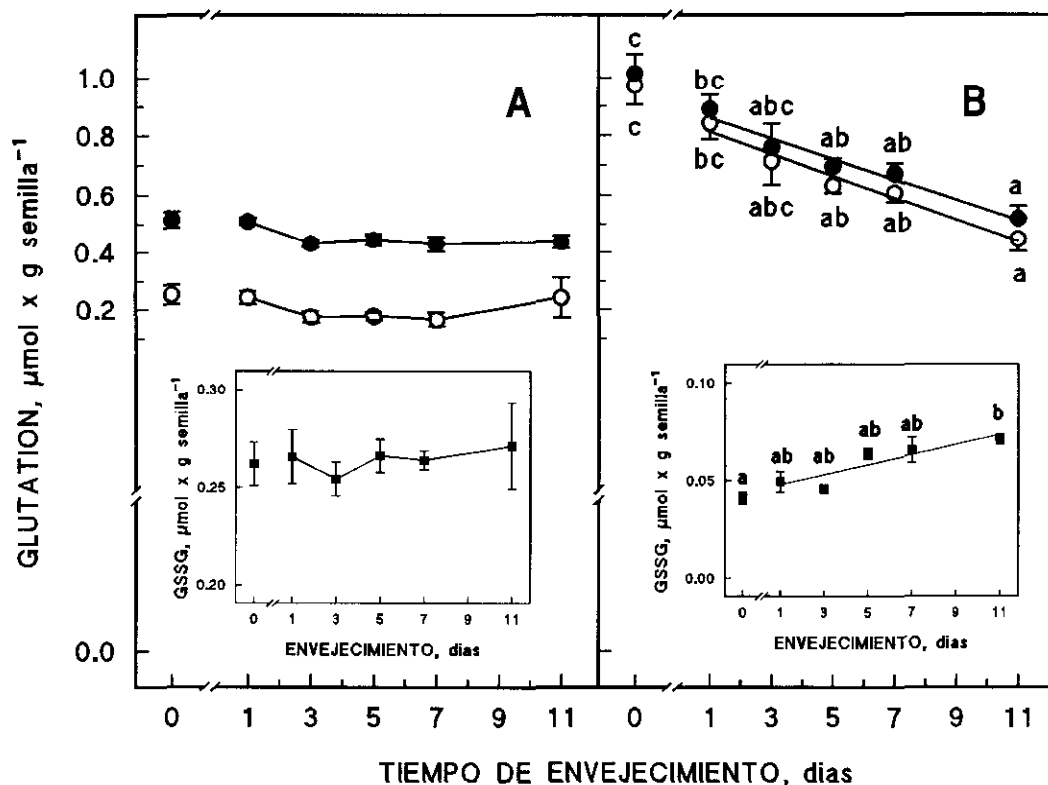


Figura 42. Evolución de los niveles de glutation de las semillas de girasol (SG) en estado seco (A) y sometidas a 12 horas de imbibición (B), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Círculos negros, glutation total y círculos blancos, GSH. Figura interior, niveles de GSSG. Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes. Para cada variable, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 72).

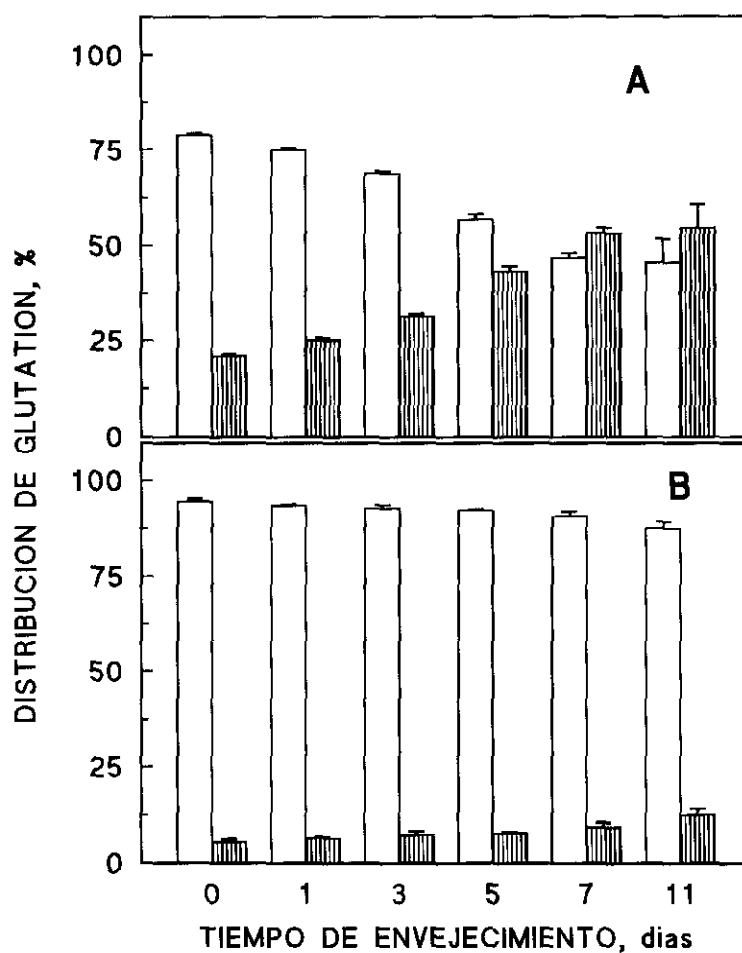


Figura 43. Contenido de GSH (barras blancas) y GSSG (barras rayadas) relativo al contenido total de glutation, en semillas de girasol (SP) cv. Peredovik artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR), en estado seco (A) e hidratadas durante 4 horas (B). Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes.

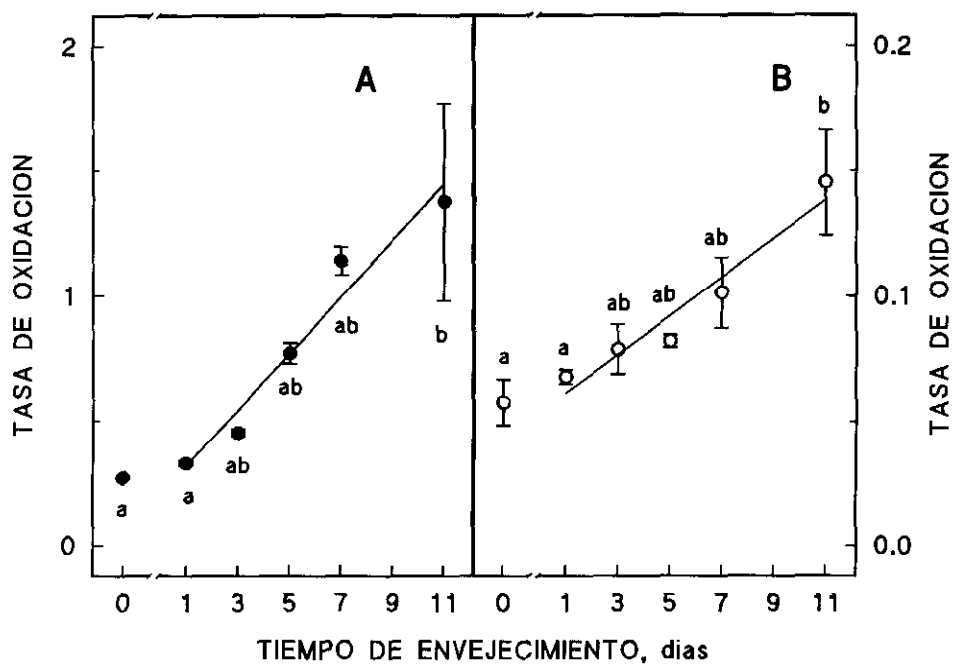


Figura 44. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la tasa de oxidación de las semillas de girasol (SP) cv. Peredovik en estado seco (A) e hidratadas durante 4 horas (B). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro ensayos independientes. En cada caso, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tablas 62 y 70).

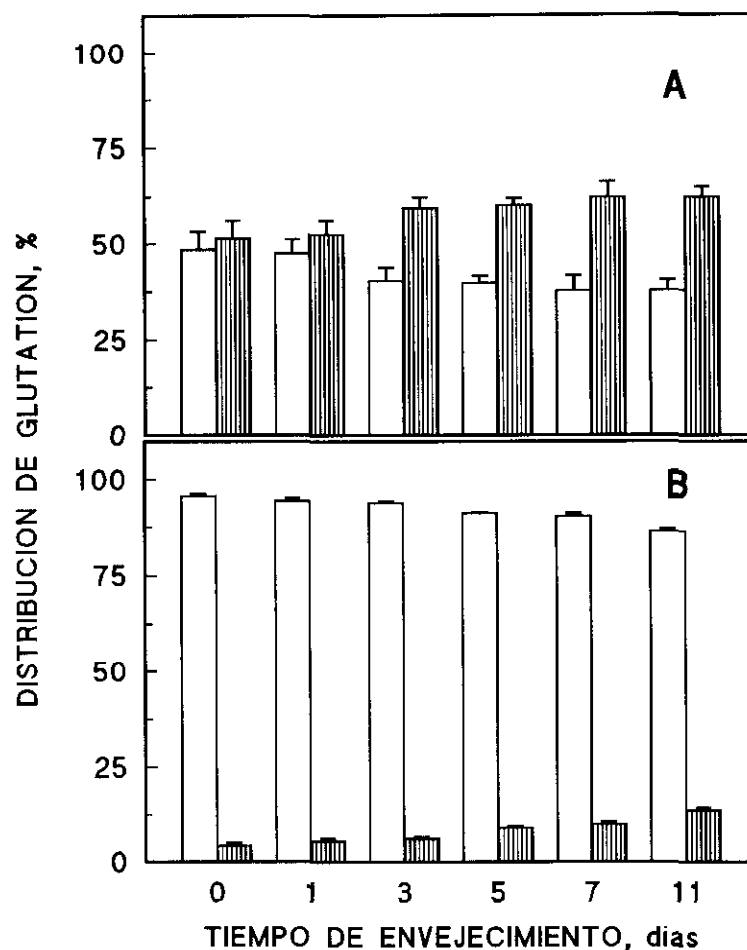


Figura 45. Contenido de GSH (barras blancas) y GSSG (barras rayadas) relativo al contenido total de glutation, en semillas de girasol (SG) artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR) en estado seco (**A**) e hidratadas durante 12 horas (**B**). Cada barra representa el valor medio \pm SE de cuatro determinaciones independientes.

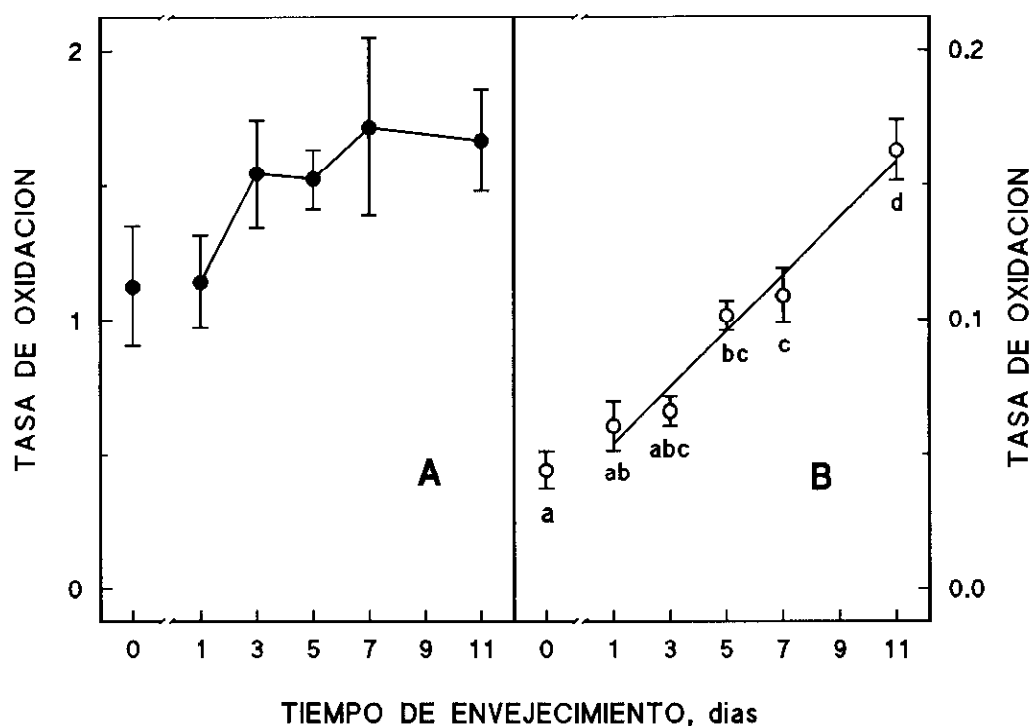


Figura 46. Efecto del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la tasa de oxidación de las semillas de girasol (SG) cv. Peredovik en estado seco (A) e hidratadas durante 12 horas (B). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro ensayos independientes. Los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tablas 70).

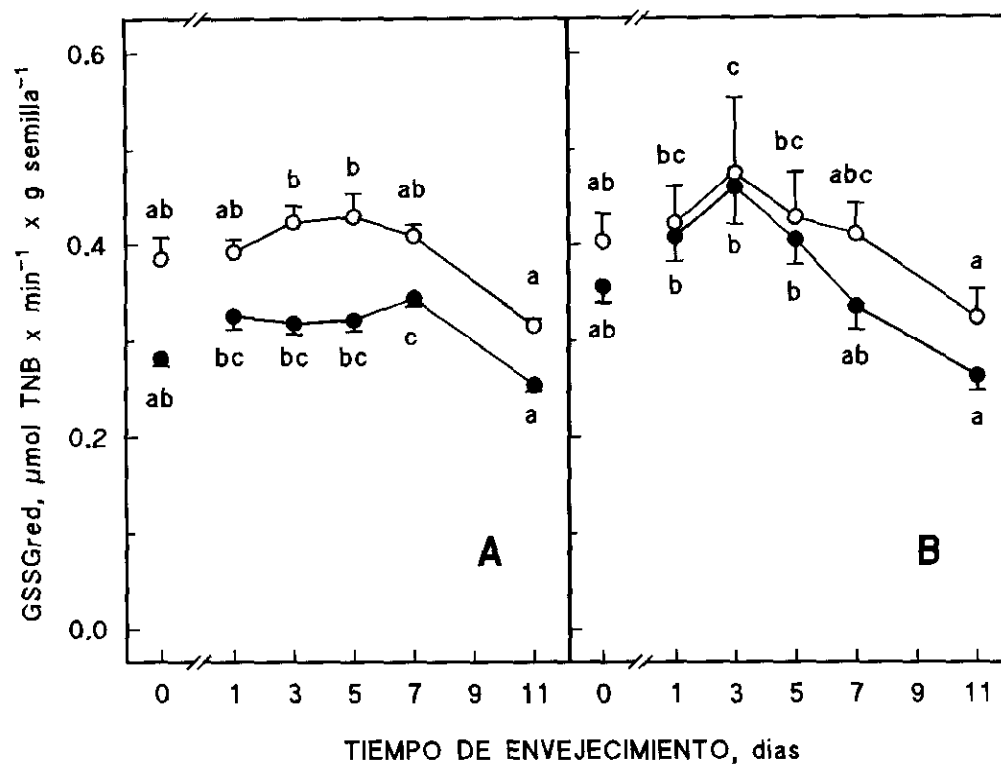


Figura 47. Efecto del envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) en la actividad glutatión reductasa de las semillas de girasol (SP y SG) cv. Peredovik (A y B, respectivamente), en estado seco (círculos negros) e hidratadas durante 4 (SP) ó 12 (SG) horas (círculos blancos). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro ensayos independientes. Para cada caso, los puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test múltiple de Duncan, para el correspondiente análisis de varianza (Tabla 74).

TABLA 59. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de glutation total (G_{TOTAL}), GSH y GSSG de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**) y a $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento (t)	5	0,3788**	0,5056**	0,0121*
Tamaño (T)	1	0,2655**	0,4760**	0,0300**
Interacción (txT)	5	0,1565**	0,2338**	0,0086*
Error	36	0,0584	0,0604	0,0235

TABLA 60. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la tasa de oxidación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS)

Fuente de variación	gl	TASA DE OXIDACION
Envejecimiento (t)	5	5,0229*
Tamaño (T)	1	6,2460*
Interacción (txT)	5	0,6880NS
Error	36	5,5832

TABLA 61. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SP) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), a $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento	5	0,5027**	0,7085**	0,0198*
Error	18	0,0283	0,0235	0,0116

TABLA 62. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la tasa de oxidación de semillas, SP y SG, de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	4,1243*	1,5866NS
Error	18	1,9325	3,6507

TABLA 63. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	SG		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento	5	0,0318NS	0,0324NS	0,0006NS
Error	18	0,0604	0,0568	0,0116

TABLA 64. Localización de GSH y GSSG en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) artificialmente envejecidas (43 °C, 75 % HR): niveles detectados en cotiledones, eje embrionario y semilla completa, expresados en $\mu\text{mol/g}$ de tejido. Los valores entre paréntesis se expresan en $\mu\text{mol/unidad}$ (cotiledones, eje embrionario o semilla completa). Los valores entre corchetes expresan los porcentajes respecto a las semillas no envejecidas.

SP		COTILEDÓN	EMBRIÓN	SEMILLA
NO ENVEJECIDAS	GSH	0,5100±0,0210 (0,02125)	1,2230±0,0810 (0,0051)	0,6725±0,0095 (0,031)
	GSSG	0,1700±0,0041 (0,0071)	0,3230±0,0063 (0,0013)	0,1830±0,0048 (0,0083)
ENVEJECIDAS	GSH	0,1275±0,0260 (0,0053) [25]	0,5575±0,0280 (0,0023) [46]	0,2200±0,1400 (0,01) [33]
	GSSG	0,2580±0,0075 (0,0108) [152]	0,5300±0,0390 (0,0022) [164]	0,2500±0,0150 (0,0110) [137]
SG		COTILEDÓN	EMBRIÓN	SEMILLA
NO ENVEJECIDAS	GSH	0,2725±0,0295 (0,0230)	0,9500±0,0261 (0,0040)	0,2530±0,035 (0,0210)
	GSSG	0,2400±0,0085 (0,0200)	0,5200±0,0390 (0,0021)	0,2620 (0,0220)
ENVEJECIDAS	GSH	0,1725±0,0096 (0,0140) [63]	0,4225±0,0260 (0,0018) [45]	0,1665±0,0250 (0,0075) [66]
	GSSG	0,2400±0,0153 (0,0200) [100]	0,6100±0,0122 (0,0025) [120]	0,2640±0,0110 (0,0220) [110]

TABLA 65. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento (t)	5	0,7162**	0,8453**	0,0055**
Tamaño (T)	1	0,0884*	0,0700*	0,0010*
Interacción (txT)	5	0,0779*	0,0767NS	0,0005NS
Error	36	0,2946	0,3100	0,0038

TABLA 66. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la tasa de oxidación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	TASA DE OXIDACION
Envejecimiento (t)	5	0,0550*
Tamaño (T)	1	0,0001NS
Interacción (txT)	5	0,0023NS
Error	36	0,0153

TABLA 67. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SP) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SP		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Estado de hidratación	1	0,650*	1,748*	0,266*
Error	46	0,802	1,063	0,037

TABLA 71. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SG		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Estado de hidratación	1	1,061*	3,066*	0,648*
Error	46	0,880	0,971	0,381

TABLA 72. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SG) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SG		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento	5	0,6109*	0,6921*	0,0030*
Error	18	0,2069	0,2093	0,0012

TABLA 73. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad GSSGred de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) en estado seco ($GSSGred_s$) e hidratadas ($GSSGred_H$), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR) y del tamaño de la semilla. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**), $P \leq 0,01$ (*) y diferencias no significativas (NS)

Fuente de variación	gl	$GSSGred_s$	$GSSGred_H$
Envejecimiento (t)	5	0,086**	0,079**
Tamaño (T)	1	0,048**	0,004NS
Interacción (txT)	5	0,030*	0,004NS
Error	36	0,055	0,059

TABLA 68. Efecto de la hidratación en los niveles de G_{TOTAL} en SP y SP: incremento de G_{TOTAL} expresado en porcentaje relativo al contenido en la semilla en estado seco.

ENVEJECIMIENTO, días	SP	SG
0	10	96
1	28	75
3	38	76
5	60	57
7	67	56
11	51	18

TABLA 69. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de los niveles de G_{TOTAL} , GSH y GSSG de semillas (SP) de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (**) y $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de variación	gl	SP		
		G_{TOTAL}	GSH	GSSG
Envejecimiento	5	0,1831**	0,2299**	0,0030*
Error	18	0,0877	0,1008	0,0027

TABLA 70. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la tasa de oxidación de semillas, SP y SG, de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) hidratadas, en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*).

Fuente de variación	gl	SP	SG
Envejecimiento	5	0,0197*	0,0376*
Error	18	0,0101	0,0051

TABLA 74. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad GSSGred de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) cv. Peredovik (SP y SG), en estado seco (GSSGred_s) e hidratadas (GSSGred_H), en función del tiempo de envejecimiento artificial (43 °C, 75 % HR). Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,01$ (**) y $P \leq 0,05$ (*).

Fuente de Variación	gl	GSSGred _s		GSSGred _H	
		SP	SG	SP	SG
Envejecimiento	5	0,022***	0,095***	0,034**	0,049*
Error	18	0,008	0,047	0,021	0,038

TABLA 75. Análisis de la varianza (suma de cuadrados) de la actividad GSSGred de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik), en función del estado de hidratación. Diferencias significativas a $P \leq 0,001$ (*) y diferencias no significativas (NS).

Fuente de variación	gl	GSSGred	
		SP	SG
Estado de hidratación	1	0,087*	0,019NS
Error	46	0,087	0,229

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto del envejecimiento artificial en la viabilidad y vigor de las semillas de girasol

5.1.1. Evaluación de la germinación

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede indicar que: a) las semillas de girasol cv. Peredovik de menor tamaño presentan una mayor capacidad germinativa que las semillas de mayor tamaño del mismo cultivar (Figs. 11 y 12); b) las condiciones de envejecimiento acelerado disminuyen la viabilidad de estas semillas, de forma más evidente en las SG; c) el efecto de las condiciones de envejecimiento se manifiesta también en un retraso de la germinación (Figs. 13 y 14), representado por el aumento del TMG (Fig. 15), principalmente en las SG; d) los períodos cortos de envejecimiento estimulan la germinación y contribuyen a disminuir la mortalidad de las semillas al ser germinadas en condiciones óptimas (Figs. 16 y 17); e) el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente no altera de forma significativa la viabilidad de las semillas de girasol durante el período de experimentación considerado (Fig. 18).

Esta pérdida de la capacidad germinativa también se ha observado en semillas de girasol natural y artificialmente envejecidas (Cardoso, 1990; Halder y Gupta, 1980, 1982; Torres y Martínez-Honduvilla, 1990), mecánicamente dañadas (Cardoso, 1990; Torres y Martínez-Honduvilla, 1988, 1990) o sometidas a diferentes condiciones adversas (Gay y col., 1991; Torres y col., 1991).

La menor capacidad germinativa de las SG respecto a las SP (Figs. 11 y 12) está en concordancia con los resultados obtenidos por Torres y Martínez-Honduvilla (1990) en semillas de girasol de diferentes tamaños. Estos autores observaron un mejor

comportamiento de las semillas de menor peso en todos los test de vigor realizados. La relación aquí indicada entre el tamaño de las semillas y su vigor se ha detectado también en soja (Edwards y Hartwing, 1971; Hoy y Gamble, 1985), aunque en otras especies de interés comercial (algodón, cacahuete, medicinales, hortícolas) las semillas de mayor tamaño presentaron mejores características de vigor que las de menor tamaño (Amico Roxas y col., 1994; Gelmond, 1972; Powell y Matthews, 1994; Sivasubramanian y Ramakrishnan, 1974) .

De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, las SP presentan una mayor resistencia a las condiciones adversas, que se manifiesta en el mantenimiento de una capacidad germinativa adecuada incluso cuando el tiempo de envejecimiento es superior a 3 días (Figs. 12 y 16). Por otra parte, la estimulación de la germinación que se observa a períodos cortos de envejecimiento en las SP y las SG, está en concordancia con los resultados presentados por de Paula y col. (1991b) en semillas de girasol del mismo cultivar deterioradas por almacenamiento a altas temperaturas (65 °C). Este efecto se ha observado también en semillas de distintas especies sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Sin embargo, no hay una explicación concluyente sobre el mismo, ya que las interpretaciones señaladas en la literatura hacen referencia a procesos de distinta naturaleza. Recientemente, Crowe y col. (1989), Hoekstra y col. (1989) y van Bilsen y col. (1994), han señalado que este efecto estimulador obedece a un mecanismo puramente físico relacionado con la transición de las membranas (fase de gel a líquido cristalino), favorecida por altas temperaturas. Otros autores (Helm y col., 1989) han indicado que los embriones de trigo sometidos a distintos tratamientos térmicos, son capaces de sintetizar proteínas específicas como mecanismo de resistencia al estrés, mientras que Likhatchev y col. (1984) asocian tales efectos a cambios en la composición química de las semillas, especialmente relacionados con un aumento de la actividad de algunas enzimas hidrolíticas.

Asimismo, estos cambios en la viabilidad de las semillas están linealmente relacionados con el tiempo de tratamiento (Fig. 18). En este sentido, el estudio comparativo de las pendientes (Tabla 16) resulta más ilustrativo que la simple

determinación del número de plántulas normales (Fig. 16) que aparecen en cada tratamiento, puesto que es independiente de la viabilidad inicial de las semillas, cuyos valores fueron ligeramente superiores en las SP que las SG. Por otra parte, la pendiente que presentan las semillas muertas es mayor en las SP. Estos datos corroboran el análisis inicial de los resultados, en el que se apuntaba que el tiempo de envejecimiento produce un descenso de la viabilidad de las SP que se refleja en un aumento de la letalidad, mientras que en las SG, el descenso de la viabilidad se traduce en un aumento conjunto del número de plántulas anormales y semillas muertas.

Por otra parte, las SP y las SG se diferencian en el tiempo que tardan en completar el proceso de germinación (Figs. 13-15). Para las SP no envejecidas, el TMG corresponde a $2,00 \pm 0,031$ días, mientras que, para las SG, este tiempo se prolonga a $2,32 \pm 0,067$ días. Esta diferencia en el tiempo medio de germinación podría atribuirse al hecho de que las SG tardan más tiempo en completar la fase de hidratación. Este hecho afecta negativamente al proceso germinativo al incidir de manera directa en el inicio de los mecanismos bioquímicos como la movilización de las sustancias de reserva, necesarios para el desarrollo y culminación de la germinación. Sin embargo, las SP envejecidas mantienen, en todos los casos, valores próximos a los observados en las semillas no tratadas, mientras que, en las SG el TMG se prolonga de forma muy significativa en función del período de envejecimiento. Dell'Aquila (1987) sugiere que la determinación del TMG es un índice muy sensible del estado de deterioro de las semillas, ya que presenta, al menos en semilla de trigo, una alta correlación con los parámetros fisiológicos y bioquímicos alterados durante el envejecimiento. En nuestro caso, la modificación del TMG durante el envejecimiento (Fig. 15) es debida probablemente a la presencia de plántulas anormales (Fig.16), lo cual indica el daño producido por el envejecimiento artificial que se refleja en una germinación más lenta. En este sentido, las SG presentan mayores variaciones en el TMG, que podrían poner de manifiesto las alteraciones fisiológicas o bioquímicas que se producen por efecto del envejecimiento artificial. Si esta determinación pudiera realizarse, sin margen de error, sólo en las plántulas normales, se podría estimar si las alteraciones en los procesos metabólicos durante el envejecimiento son

responsables de las modificaciones en la velocidad de germinación de las semillas viables, capaces de producir plántulas normales. Sin embargo, esto es difícilmente posible desde el momento en que la diferenciación entre plántulas normales y anormales, sólo es evidente y precisa a partir del cuarto día de germinación. Por esta razón, la disminución de la capacidad germinativa de las semillas de girasol por efecto del envejecimiento artificial se ha relacionado con la alteración de distintos parámetros bioquímicos (de Paula y col., 1991a, 1993; Halder y Gupta, 1980, 1982; Halder y col., 1983) que se manifiesta en la degradación de las membranas (Gidrol y col., 1989), y en la liberación de electrolitos (de Paula y col., 1994). El estudio de estos y otros parámetros relacionados con el envejecimiento se abordará más extensamente en posteriores apartados.

5.1.2. Evaluación del vigor

Los resultados obtenidos (Fig. 20) ponen de manifiesto la estrategia de crecimiento adoptada por el girasol, especie con un gran desarrollo radicular, independientemente del tamaño de la semilla y concordante con los resultados descritos por de Paula y col. (1991b) y Torres y Martínez-Honduvilla (1990). La alteración del vigor a consecuencia del envejecimiento, se manifiesta tanto en la longitud de la raíz como en la longitud del hipocótilo, lo que evidentemente se refleja en la disminución de la plántula completa.

Al evaluar el vigor mediante la relación R/H (longitud de la raíz/longitud del hipocótilo) (Fig. 20) se pone de manifiesto que a tiempos cortos, ambos órganos parecen presentar una tolerancia similar al tratamiento tanto en las SP como en las SG, mientras que los períodos prolongados (11 días) de envejecimiento alteran en mayor medida la longitud de la raíz en las SP, dando valores de R/H inferiores ($1,6731 \pm 0,2069$) a las semillas no tratadas ($1,9708 \pm 0,1480$). Por otro lado, el envejecimiento prolongado afecta a la longitud del hipocótilo de las SG, obteniéndose valores superiores ($2,2198 \pm 0,2014$) a los que presentan las semillas no envejecidas ($1,9972 \pm 0,1308$).

Por otra parte, el índice de uniformidad (Tabla 22) mide las desviaciones que presenta la longitud de los hipocótilos respecto a la longitud media, por lo tanto, cuanto mayor sea el valor de este índice, mayor uniformidad presentarán las plántulas respecto a la longitud de sus hipocótilos. Según los resultados obtenidos, las SP presentan menor uniformidad cuando el tiempo de envejecimiento es más prolongado, sobre todo los días 5 y 11. En las SG se observa también menor uniformidad de crecimiento en las plántulas procedentes de semillas envejecidas, desde el primer día de envejecimiento, que en las procedentes de semillas no tratadas. Asimismo, los resultados muestran que el deterioro de las semillas por almacenamiento en las condiciones de envejecimiento artificial, da lugar a plántulas que presentan características diferenciales respecto a su vigor (Tabla 22). Los índices SUI e IVI reflejan que las SP sometidas a envejecimiento durante 1 y 3 días, mantienen no sólo una alta capacidad germinativa, sino que dan lugar a plántulas normales de características semejantes. Las SG, sólo mantienen las propiedades de uniformidad y vigor en las semillas no envejecidas, ya que el tratamiento produce alteraciones, que si bien no afectan a la capacidad germinativa, sí alteran las características de las plántulas procedentes de semillas envejecidas 1 y 3 días. Por tanto, el uso de estos índices permite encontrar diferencias de vigor en plántulas procedentes de semillas con semejante capacidad germinativa.

5.2. Evolución del contenido de humedad de las semillas de girasol artificialmente envejecidas

Las condiciones de elevada temperatura y humedad, responsables directas del proceso de envejecimiento acelerado, producen una alteración del contenido de humedad de la semillas (Fig. 21). Este incremento, aunque es significativo, no es suficientemente decisivo como para permitir el restablecimiento de un metabolismo activo, que según Vertucci y Roos (1990) corresponde para las semillas de girasol a 0,17 g H₂O/g semilla, momento en que se detecta un incremento del consumo de oxígeno que se puede atribuir a la actividad respiratoria. Por otra parte, estos autores señalan que las reacciones

degenerativas se atenúan por un incremento importante de la viscosidad, que tiene lugar cuando el contenido de humedad se encuentra por debajo de ciertos límites. En el caso de la semilla de girasol el contenido de humedad óptimo para el almacenamiento prolongado se ha fijado mediante cálculos teóricos en 0,031 g H₂O/g semilla (Vertucci y Roos, 1990). Sin embargo, algunos autores (Crowe y col., 1989; Hoekstra y col., 1989; van Bilsen y col., 1994) consideran que someter a las semillas a condiciones elevadas de humedad y/o temperatura puede tener un efecto beneficioso. Este efecto consiste en permitir que las membranas de las semillas sufran el proceso de transición (fase de gel a líquido cristalino) antes de ser sometidas a rehidratación y se pone de manifiesto por una disminución en la liberación de electrolitos.

Las condiciones de envejecimiento artificial a que son sometidas las semillas alteran en cierta medida el nivel de hidratación en el que se encuentran las mismas. Para evitar que este hecho afectara a las determinaciones bioquímicas que se realizaron posteriormente, las semillas envejecidas se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente hasta que alcanzaron el nivel de humedad inicial.

5.3. Análisis de los exudados de las semillas de girasol: efecto del envejecimiento artificial en la funcionalidad de las membranas

5.3.1. Cambios de pH de los exudados

Los resultados relativos a los cambios de pH de los exudados en las semillas sometidas a las condiciones de envejecimiento artificial (Fig. 22), muestran diferencias significativas ($P \leq 0,001$) entre los valores de pH detectados a los 30 minutos y los medidos a las 24 horas, lo que sugiere que durante el período de rehidratación existe cierto flujo de iones H⁺ al medio de imbibición. Mukhtar y Laidman (1982), obtuvieron resultados semejantes en embriones de trigo de diferente vigor, sugiriendo que en ambos

tipos de embriones se mantiene en funcionamiento la bomba de intercambio H^+/K^+ . La liberación de iones que tiene lugar durante la imbibición afecta fundamentalmente al K^+ , que es el ion que se detecta mayoritariamente en los exudados de las semillas en germinación (Abdel Samad y Pearce, 1978; Givelberg y col., 1984; Mullet y Considine, 1980; Queiroga, 1989; Simon y Raja Harun, 1972; Torres y col., 1988). Este ion sufre posteriormente una captación activa que permite la excreción de H^+ , que son los responsables de la pérdida de rigidez de las paredes celulares necesaria para permitir la elongación celular (Bewley y Black, 1978). El descenso de pH que se observa en los exudados de las semillas de girasol no tratadas y artificialmente envejecidas permite suponer que el mecanismo de acidificación de las paredes celulares no está alterado por el envejecimiento.

5.3.2. Evaluación del contenido de fósforo de los exudados

Los compuestos celulares que presentan fósforo en su constitución son, fundamentalmente, la fitina que actúa como reserva de fósforo y de distintos tipos de cationes, los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y ciertas proteínas (Dalling y Bhalla, 1984). Durante la germinación se produce la movilización y transporte al embrión de las reservas de fósforo necesario para la biosíntesis de estas moléculas. La presencia de fosfatos en el exudado de las semillas a las 24 horas de imbibición (Fig. 23) podría ser por tanto indicativa de la salida de fósforo proveniente de la hidrólisis de la fitina, pero también debido a una mayor liberación de nucleótidos y proteínas, que podría estar facilitada por la degradación de los fosfolípidos de membrana que puede tener lugar durante el envejecimiento.

Si los fosfatos detectados provienen fundamentalmente de nucleótidos y proteínas, debería observarse cierto paralelismo entre los niveles de fósforo detectados en el exudado y la presencia de sustancias que absorben a 260-280 nm. Sin embargo, esto sólo ocurre en las SP, donde existe una buena correlación ($r=0,8908^{***}$) entre estos dos parámetros.

Las SG, por otra parte, presentan una correlación más baja ($r=0,6625^{**}$), lo que podría indicar que otras sustancias contribuyen a la presencia de fósforo en los exudados. Esta liberación de fósforo también ha sido detectada por otros autores (Givelberg y col., 1984; McKersie y Stinson, 1980; Parameswaran y col., 1990; Saxena y col., 1985) y revela el daño producido por el tratamiento, como se pone de manifiesto por la relación existente entre este parámetro y el número de semillas muertas ($r=0,8077^{***}$ y $r=0,8153^{***}$, en SP y SG, respectivamente).

5.3.3. Cambios de absorbancia de los exudados

La absorbancia a 260-280 nm refleja la liberación de macromoléculas, proteínas y ácidos nucleicos, procedentes de células dañadas, así como de sustancias de bajo peso molecular (aminoácidos y compuestos de naturaleza fenólica) que pueden difundir a través de las membranas (Deswal y Sheoran, 1993; Duke y col., 1986; Givelberg y col., 1984). Estos autores consideran que esta medida es un índice muy fiable de la alteración de las membranas; sin embargo, en nuestro material biológico, la absorbancia a 280 nm (Fig. 26) sólo está incrementada significativamente en las semillas más envejecidas. Este incremento de absorbancia a 280 nm, junto con el mayor contenido de fósforo detectado en los exudados de las semillas más envejecidas (Fig. 23) sugiere que el envejecimiento artificial afecta a la integridad de las membranas que son incapaces de reorganizarse durante la rehidratación, lo que facilita la salida de compuestos de origen intracelular.

5.3.4. Evaluación de la intensidad de corriente eléctrica

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede indicar que: a) las semillas de mayor tamaño presentan valores de ICE superiores a las de menor tamaño durante todo el período de imbibición (Figs. 27 y 28); b) la ICE de las semillas completas a las 24

horas de imbibición no se altera significativamente por efecto del tiempo de envejecimiento (Fig. 28); c) la ICE detectada en los exudados provenientes de los pericarpios aislados de las SG es superior a la detectada en los pericarpios de las SP (Fig. 29), siendo su evolución semejante en ambos casos y no encontrándose diferencias debidas al efecto del envejecimiento acelerado; d) los valores de ICE de las semillas (sin pericarpio) son siempre inferiores a los presentados por las semillas completas, mostrando, en todos los casos analizados, una cinética de liberación de primer orden definida por la función $L = C (1 - e^{-kt})$ (Fig. 30 y Tabla 37); e) la ICE a las 24 horas de imbibición (Fig. 29) de las semillas (sin pericarpio) aumenta significativamente por efecto del envejecimiento; f) la evolución de la liberación de iones de las semillas completas (SP y SG) sigue una cinética de primer orden, y para cuya explicación, se propone un modelo definido por la ecuación [11], basado en una cesión rápida de iones desde el pericarpio y otra lenta desde la semilla.

La ICE de las SP y las SG se determinó utilizando las mismas condiciones experimentales (1 V, 3,5 ml de agua desionizada y a 25 °C). Sin embargo, las SG liberaron mayor cantidad de iones, por lo que se observa que el tamaño de la semilla tiene un efecto importante en las determinaciones de ICE, en concordancia con resultados presentados por distintos autores (Hoy y Gamble, 1985; Queiroga, 1989; Torres y Martínez-Honduvilla, 1988, 1990; Retamal y col., 1990). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de mantener un tamaño uniforme entre las semillas de cada lote, para evitar que las diferencias en la ICE debidas a este factor puedan ser consideradas como diferencias en el vigor de las semillas estudiadas.

Las diferencias en la liberación de electrolitos parecen estar relacionadas con la viabilidad y las características de vigor de las semillas de diversas especies (Powell, 1986) y habitualmente se asocian a alteraciones de membrana. Sin embargo, en la literatura se describen resultados contradictorios. Algunos autores (Anfinrud y Schneiter, 1984; de Paula y col., 1994; Sivasubramanian y Ramakrishnan, 1974; Torres y Martínez-Honduvilla, 1990) han indicado que las semillas de girasol con baja capacidad germinativa

presentan una alta liberación de electrolitos y solutos. Por el contrario, otros autores han señalado la ausencia de correlación entre la germinación de semillas de girasol artificialmente envejecidas y la liberación de iones (Halder y Gupta, 1982; Halder y col, 1983; Gidrol y col., 1989). A pesar de estas divergencias, la medida individualizada de la ICE ha sido utilizada para predecir la capacidad germinativa de las semillas de girasol (Anfinrud y Schneiter, 1984; Cardoso, 1990; Queiroga, 1989). En nuestro material biológico, sometido a envejecimiento artificial, no se observan alteraciones significativas de este parámetro en los exudados procedentes de las SP ni de las SG, mientras que la viabilidad de las mismas se modifica sustancialmente (Fig. 16) Estos resultados están en concordancia con los presentados por Halder y Gupta (1982), Halder y col. (1983) y Gidrol y col. (1989) en semillas envejecidas de girasol, si bien hay que tener en cuenta que estos autores estudiaron la conductividad eléctrica de los exudados por medio de un conductímetro. En estos casos la ausencia de alteraciones en la liberación de electrolitos podría atribuirse a la falta de sensibilidad del método empleado más que al mantenimiento de la integridad de las membranas durante el proceso de envejecimiento, ya que cuando las condiciones de envejecimiento artificial son severas sí detectaron diferencias en la liberación de iones, que ponen de manifiesto la alteración de las membranas. Sin embargo, en nuestro material biológico, el hecho de no encontrar una adecuada relación entre los valores medios de ICE a las 24 horas de imbibición y la viabilidad (Fig. 16) no puede deberse a la instrumentación utilizada debido a la alta sensibilidad del autoanalizador empleado (de Paula y col., 1992, 1994). Las escasas o nulas diferencias observadas en la ICE tampoco pueden atribuirse a la integridad de las membranas de las semillas envejecidas, puesto que a través de otros ensayos (Figs. 23 y 26) se detecta un importante incremento en la liberación de solutos, lo que refleja la incapacidad de reorganización de las membranas durante el período de imbibición, especialmente en las semillas más envejecidas. A la luz de los resultados obtenidos cabría pensar, por tanto, que la cubierta (pericarpio) de la semilla de girasol tuviera una doble acción. Por una parte, podría actuar como barrera física capaz de disminuir la velocidad de liberación de iones de la semilla y, por otra parte, contribuir a la liberación de electrolitos durante el período de imbibición.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la ICE de los exudados provenientes de los pericarpios (Fig. 29) revelan que existe una liberación rápida de iones durante las primeras horas de imbibición, con valores que se mantienen prácticamente constantes a partir de este momento, en concordancia con los resultados obtenidos por Bruggink y col., (1991) en maíz y Queiroga (1989) en girasol. Asimismo, la ICE detectada en los exudados procedentes de las cubiertas de las semillas envejecidas no se diferencia de la detectada en las semillas no tratadas, lo que sugiere que la liberación de iones por el pericarpio no está afectada por el envejecimiento, debido a la ausencia de actividad metabólica del pericarpio, cuya función es esencialmente protectora.

En el estudio de la ICE de las semillas (libres de pericarpio) (Fig. 30), se obtuvieron valores siempre inferiores a los detectados en las semillas completas, lo cual está en concordancia con los resultados presentados por Queiroga (1989). Sin embargo, los estudios realizados en otras especies (soja, guisante, cacahuete) mostraron una mayor liberación de iones cuando la imbibición se realizó con semillas desprovistas de testa (Abdel-Samad y Pearce, 1978; Duke y Kakefuda, 1981; Duke y col., 1983, 1986). Estos resultados pueden ser indicativos de las diferentes funciones que las cubiertas seminales ejercen en las distintas especies, donde pueden ser responsables de procesos de dormición o de la disminución del aporte de oxígeno al embrión (Kelly y col., 1992; Lagôa y Pereira, 1987). La salida de electrolitos que tiene lugar durante el período de imbibición de las semillas ha sido atribuida por algunos autores (Duke y col., 1983) a procesos de difusión pasiva. Estos autores consideran que un alto nivel de electrolitos en los exudados no indica necesariamente un importante daño celular, por lo que sugieren que la determinación de compuestos de alto peso molecular, de origen intracelular, es un índice más fiable de la ruptura de las células durante la imbibición. Sin embargo, en el caso de las semillas envejecidas, el estudio no sólo del valor final de ICE, sino su monitorización durante el período completo de imbibición, muestra una diferente cesión de iones según el grado de envejecimiento, que sigue en todos los casos una cinética de liberación de primer orden definida por una función monomolecular (Tabla 37). Un incremento en la velocidad de difusión a través de las membranas ha sido atribuida por numerosos autores

a la degradación de las mismas, que se detecta en las semillas deterioradas (Anderson y Baker, 1983; Basavarajappa y col., 1991; de Paula y col., 1994; Fernández García de Castro y Martínez-Honduvilla, 1984; Halmer y Bewley, 1984; Powell y Mathews, 1981). La mayor ICE que se observa en las semillas envejecidas (Fig. 27), puede ser indicativa de las alteraciones en la funcionalidad de las membranas que contribuyen a la pérdida de viabilidad. Por otra parte, Powell (1986) considera que las membranas debilitadas y alteradas durante el envejecimiento son más susceptibles al daño producido por la imbibición, que se observa en algunas especies.

La evolución de la ICE observada en la Figura 27 sugiere que los pericarpios (Fig. 29) son los responsables de la rápida liberación de iones que se detecta durante las primeras horas de imbibición en las semillas completas. La subsiguiente estabilización de la ICE puede ser debida a que la liberación de iones desde la semilla "*sensu stricto*" es mucho más lenta (Fig. 30) y se pone de manifiesto en períodos más prolongados de imbibición. Esta interpretación se concreta en el modelo de liberación que se representa a continuación en la Figura 48, el cual se define por la ecuación [11] (véase apartado 4.3.4.1.), y que permite la explicación objetiva de las curvas de liberación de iones hasta las 16 horas después del comienzo del período de imbibición, momento considerado como tiempo crítico, debido al cambio de tendencia en la liberación de iones (Fig. 27). Este cambio de tendencia, que se produce a tiempos prolongados de imbibición, puede observarse también en otros estudios de conductividad eléctrica realizados con distintas semillas provistas de cubiertas (Abdel-Samad y Pearce, 1978; de Paula y col., 1994; Givelberg y col., 1984; Mullet y Considine, 1980; Parrish y Leopold, 1977; Retamal y col., 1990). Este cambio, sin embargo, no se observa en la evolución de la ICE determinada en los exudados procedentes de los pericarpios y de las semillas (Figs. 29 y 30). El hecho de que el cambio de tendencia se produzca aproximadamente en el mismo tiempo tanto en las semillas no tratadas como en las envejecidas durante 11 días, como claramente queda reflejado a continuación en la Figura 49, se explica por un proceso puramente físico que implica la fractura del pericarpio debida al aumento de volumen que experimentan las semillas imbibidas o hidratadas. Esta fractura permite un mayor contacto

de la semilla propiamente dicha con el medio de imbibición, facilitando la salida de los iones. Dado que este proceso se produce en todas las semillas, independientemente de su viabilidad, es decir, tanto en las semillas envejecidas o deterioradas como en las semillas viables, la mayor ICE detectada en los exudados de las semillas envejecidas, SP y SG, a partir del tiempo crítico (Fig. 49C y D), en comparación con las no envejecidas (Fig. 49A y B), pone de manifiesto la pérdida de integridad de las membranas por efecto del envejecimiento. Esta explicación verifica, por una parte, la hipótesis planteada, que se formaliza en el modelo de liberación propuesto, y por otra, justifica la falta de convergencia durante todo el período de imbibición. La cesión de iones a partir del tiempo crítico sigue una cinética de primer orden, determinada también por una función monomolecular. El análisis estadístico de los parámetros estimados por esta función pone de manifiesto las diferencias producidas por el envejecimiento, que afectan tanto a la cantidad final de iones (C) como a la constante cinética de velocidad (K) (Tablas 42 y 43).

Por otra parte, la determinación de la ICE mediante el equipo ASAC-1000B requiere mantener las semillas sumergidas en agua desionizada durante un período variable dependiendo de la especie, que para el caso del girasol se prolonga hasta 24 horas. Las semillas durante este período pueden sufrir daños por imbibición debido a la rápida entrada de agua, que puede llegar a causar la muerte de las células de las capas más externas y afectar a la viabilidad de las semillas (Powell y Matthews, 1978; Powell, 1986; Powell y col., 1986; Woodstok y Taylorson, 1981). Sin embargo, este efecto no se observó en nuestro material biológico ya que la capacidad germinativa de las semillas utilizadas en la determinación de la ICE no difiere significativamente de la obtenida con semillas germinadas en condiciones normalizadas que permiten una captación lenta de agua (de Paula, 1991). Sin embargo, la germinación de las semillas sin pericarpio (Tabla 36) disminuye significativamente, tanto en SG como en SP, lo que pone de manifiesto que la eliminación de las cubiertas (pericarpios), afecta negativamente a la capacidad germinativa, por un aumento importante del número de plántulas anormales, probablemente debido al posible daño mecánico ocasionado durante la manipulación, así como al contacto directo de la semilla con el medio de imbibición.

Los resultados de los ensayos de liberación, considerados globalmente, muestran que el pericarpio no impide la liberación de solutos, puesto que se ha detectado la presencia de fósforo que podría provenir de sustancias orgánicas de origen intracelular, corroborado por las medidas de absorbancia a 280 nm (Fig. 26). Por otra parte, la alteración de las membranas durante el envejecimiento, que se manifiesta por un aumento de la ICE a las 24 h de imbibición de las semillas libres de pericarpio (Fig. 30), está también muy relacionada con la presencia de fósforo en los exudados, tanto en las SP ($r=0,8633^{***}$) como en las SG ($r=0,8964^{***}$). Sin embargo, el pericarpio es necesario para la adecuada germinación de las semillas de girasol, ya que protege a la capa de aleurona, responsable de una intensa actividad metabólica (Metcalf y Chalk, 1965). Por otra parte, la presencia del pericarpio dificulta la interpretación de los resultados de los ensayos de ICE debido a la propia aportación de iones durante las primeras horas de imbibición. Los ensayos realizados con semillas libres de pericarpio muestran diferencias entre los distintos períodos de envejecimiento (Figs. 28 y 30), debido probablemente a que la ausencia de pericarpio permite la rápida entrada de agua, produciéndose un efecto interactivo entre los daños ocasionados por el envejecimiento y los inherentes a la imbibición. Este efecto es más patente en las semillas más envejecidas (Fig. 30C-F) que muestran una liberación continua y creciente de iones, lo cual refleja la alteración ocasionada en las membranas, que pierden su capacidad de reorganización durante el período de imbibición. Sin embargo, los ensayos de germinación realizados con estas semillas no son representativos, ya que su viabilidad está disminuida por la ausencia de pericarpio (Tabla 36).

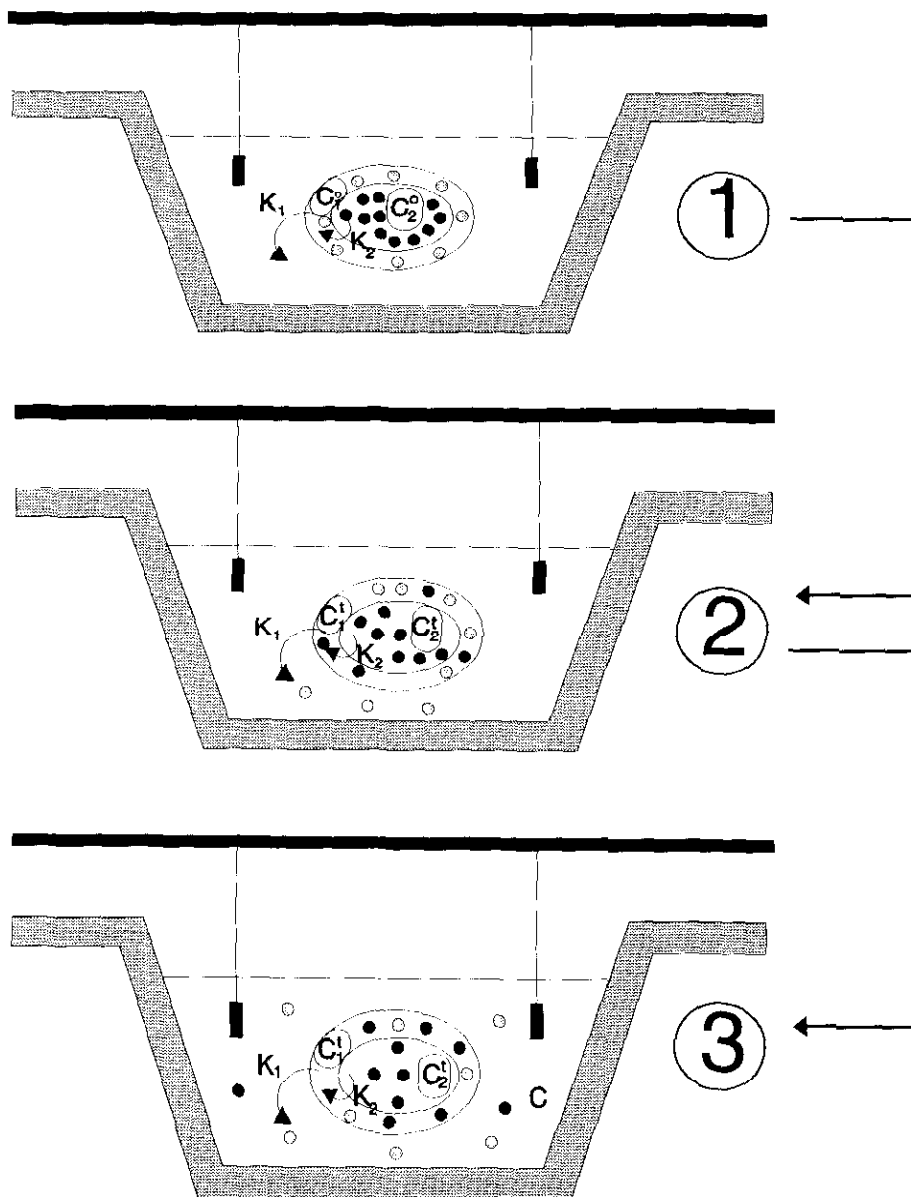


Figura 48. Propuesta de modelo de liberación de iones procedentes de semillas imbibidas, según el planteamiento definido en el texto (véase apartado 4.3.4.1.). 1. Fase inicial, a $t=0$ h; 2. Fase intermedia, a $0 < t < 16$ y 3. Fase final, a $t=16$ h.

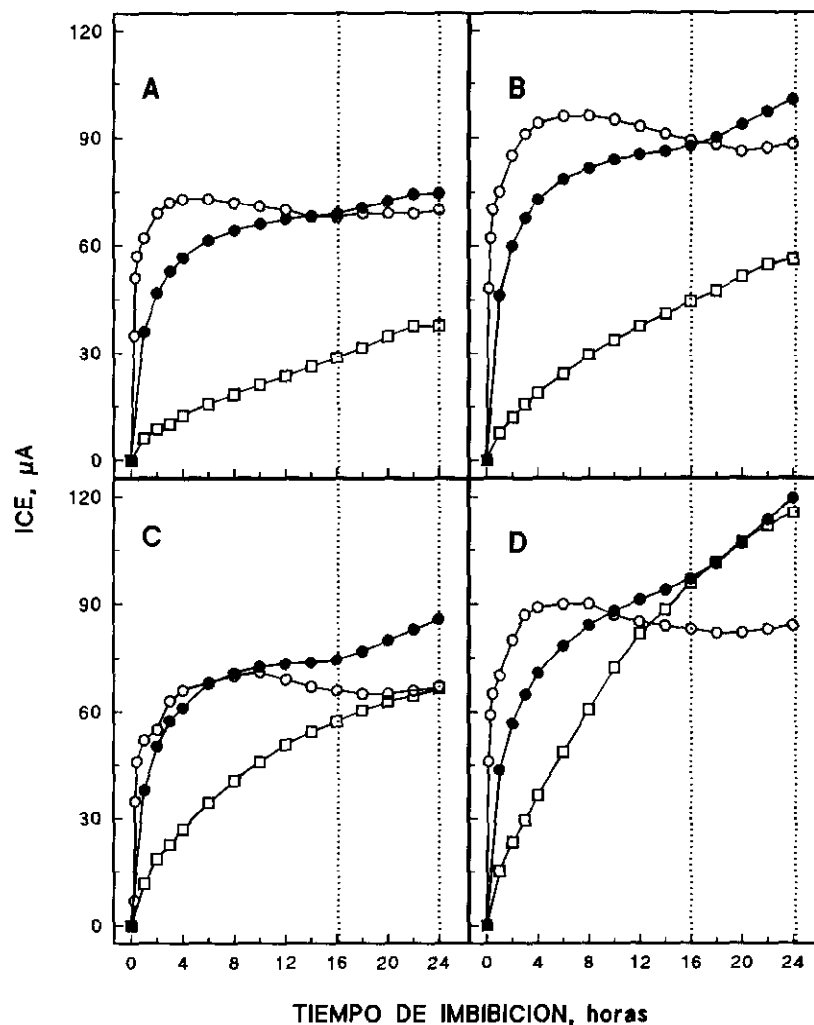


Figura 49. Evolución comparativa de la intensidad de corriente eléctrica medida en los exudados procedentes de semillas completas (círculos negros), pericarpios (círculos blancos) y semillas (cuadrados) de girasol cv. Peredovik no tratadas (**A** y **B**) y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días (**C** y **D**), en función del tiempo de imbibición. **A** y **C**, SP; **B** y **D**, SG. Cada punto representa el valor medio de cuatro repeticiones, cada una con 25 determinaciones independientes. Por claridad no se representa el valor del SE.

5.4. Efecto del envejecimiento artificial en la cinética de captación de agua

Los resultados obtenidos (Fig. 33) sugieren que el envejecimiento artificial no produce un efecto aparente en la capacidad de captación de agua de las semillas, si bien la velocidad de hidratación fue mayor en las SP que en las SG. Conviene señalar, no obstante, que algunos autores (Murphy y Noland, 1982; Powell y Matthews, 1977) han sugerido la relación entre la cinética de captación de agua y la liberación de solutos durante el proceso de rehidratación, pues consideran que la entrada rápida de agua puede afectar a las membranas celulares, favoreciendo la salida masiva de iones y otros componentes celulares. En las semillas de girasol se observa que el proceso de imbibición y la ICE durante las primeras 12 horas de imbibición (Figs. 50 y 51) presentan una evolución similar, en las que la mayor entrada de agua y, en su caso, salida de electrolitos tiene lugar a tiempos cortos de imbibición. Las semillas envejecidas muestran resultados semejantes, aunque las mayores diferencias respecto a las semillas no tratadas se detectan en las SP. Estos parámetros siguen un curso similar, aunque perfectamente diferenciado desde la primera hora de imbibición respecto a las semillas no envejecidas. Sin embargo, la ICE de las SG (no tratadas y envejecidas) empieza a diferenciarse a partir de las 6 horas y la captación de agua no presenta diferencias apreciables entre estas semillas (Fig. 50). Cabría pensar que si el envejecimiento produce un daño importante en las membranas, debería estar facilitada la entrada de agua. Sin embargo, Waggoner y Parlange (1976) y Leopold (1980) tampoco detectaron diferencias importantes entre la capacidad de rehidratación de los cotiledones de semillas de soja viables y no viables, mientras que la conductividad eléctrica fue muy superior en los cotiledones no viables. Todo ello parece indicar que el proceso de rehidratación de las semillas no está limitado de forma apreciable por las membranas. La velocidad de entrada de agua debe ser considerada principalmente como función de la capacidad de difusión de la misma de acuerdo con la naturaleza de los tejidos y de la resistencia que oponen los gases adsorbidos en el interior de la semilla (Parrish y Leopold, 1977).

Por otra parte hay que tener en cuenta que el pericarpio de estas semillas juega un importante papel en la rehidratación, ya que representa la primera barrera que entra en contacto con el agua. Por ello es lógico suponer que gran parte del agua captada por la semilla durante las primeras horas de imbibición y así como los electrolitos liberados durante este período, corresponda a la acción del pericarpio.

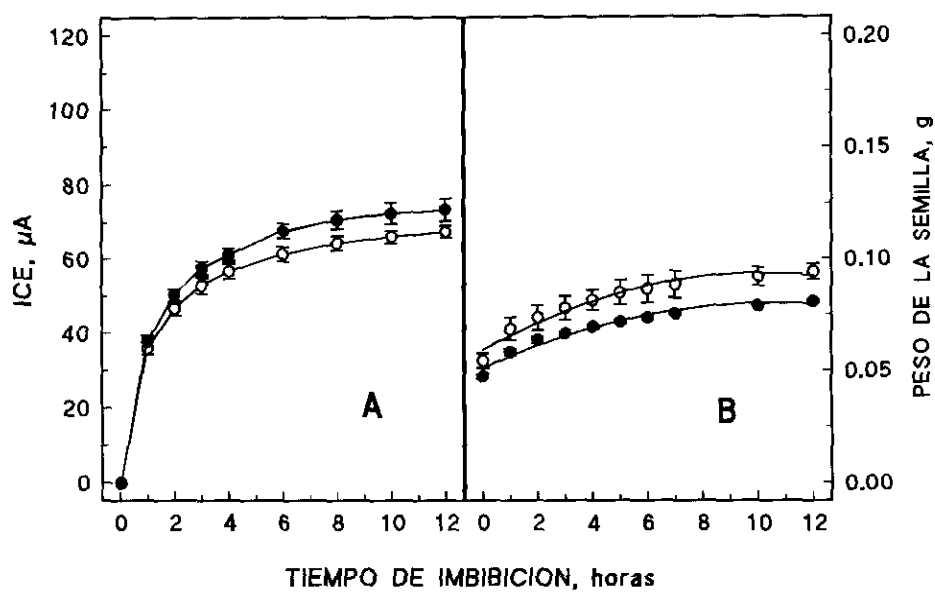


Figura 50. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (A) y del peso (B) de las semillas de girasol (SP) cv. Peredovik en función del tiempo de imbibición. Semillas no tratadas (círculos blancos) y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días (círculos negros). Cada punto representa el valor medio \pm SE cuatro repeticiones independientes.

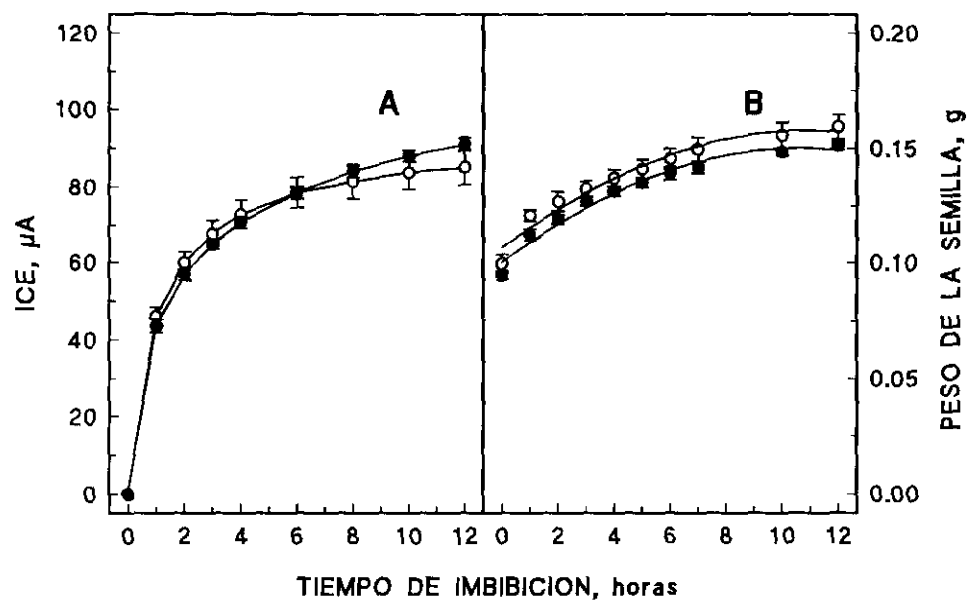


Figura 51. Evolución de la intensidad de corriente eléctrica (A) y del peso (B) de las semillas de girasol (SG) cv. Peredovik en función del tiempo de imbibición. Semillas no tratadas (círculos blancos) y envejecidas artificialmente (43 °C, 75 % HR) durante 11 días (círculos negros). Cada punto representa el valor medio \pm SE de cuatro repeticiones independientes.

5.5. Valoración de la peroxidación lipídica: cambios del contenido de malondialdehído

Los resultados obtenidos sugieren que el envejecimiento artificial no produce un incremento significativo de la peroxidación lipídica, medida por la formación de MDA (Figs. 35-37), en concordancia con Priestley y col. (1980) y Priestley y Leopold (1979) que no observaron procesos de peroxidación en semillas de soja sometidas a envejecimiento artificial. Salama y Pearce (1993) tampoco detectaron un incremento importante en los niveles de MDA en las semillas de cebolla artificialmente envejecidas, que relacionaron con la ausencia de sustratos lipídicos con tres o más insaturaciones. Esta explicación no sería válida en nuestro caso ya que las semillas de girasol se caracterizan por la abundancia de los ácidos oleico (18:1) y linoléico (18:2), y según Ohkawa y col., (1979) los hidroperóxidos derivados de este último compuesto reaccionan con el TBA para dar el mismo compuesto de color rojo que se obtiene por reacción con MDA. Por ello, el método del TBA no pueden relacionarse directamente con la cantidad de MDA proveniente de los ácidos grasos poliinsaturados, sino que otros productos de la peroxidación lipídica intervienen también en esta reacción colorimétrica. Sin embargo, para facilitar la lectura del trabajo expresamos los resultados como nmol de MDA, que indican globalmente la existencia de productos de peroxidación lipídica en los extractos estudiados. Teniendo en cuenta esta consideración, hay que indicar que los niveles de MDA detectados en las semillas no tratadas, tanto SP como SG, son lo suficientemente elevados como para indicar que durante el almacenamiento a temperatura ambiente tienen lugar en alguna medida estos procesos de peroxidación lipídica. Priestley (1986) señala que las reacciones de peroxidación lipídica se favorecen cuando el contenido de humedad de la semilla es muy bajo. La hidratación de las mismas disminuye el acceso del oxígeno a las moléculas susceptibles de peroxidación, facilita la coordinación de los metales con moléculas de agua, lo que disminuye su capacidad catalítica y por otra parte, aumenta la capacidad de difusión de las moléculas antioxidantes. Asimismo, los resultados obtenidos en relación con la presencia de antioxidantes y las actividades enzimáticas de SOD y CAT (véase apartado 4.6), así como el acusado descenso en la cantidad de MDA que se observa en las

semillas imbibidas parecen apoyar esta idea.

Las semillas, independientemente de su tamaño, sometidas a envejecimiento acelerado presentan un contenido de humedad muy bajo (5 % p.s.) que se incrementa ligeramente en función del tiempo de envejecimiento hasta alcanzar un máximo del 7 % p.s. en las semillas sometidas a 11 días de tratamiento (Fig. 21). Este contenido en humedad es lo suficientemente bajo como para permitir que durante el almacenamiento se desencadenen los procesos de peroxidación. Por otra parte, el acusado descenso de los niveles de antioxidantes que se observa durante el envejecimiento podría favorecer el desarrollo de reacciones de peroxidación lipídica. Sin embargo, los niveles de MDA no aparecen significativamente incrementados durante el envejecimiento. Durante los días 1 a 5 de tratamiento, se observa un ligero aumento de la cantidad de MDA respecto a la detectada en semillas no tratadas (Fig. 38), mientras que, a tiempos prolongados de envejecimiento, estos niveles descienden ligeramente en las SP. Estas variaciones podrían explicarse en el sentido de que la acumulación de los productos de peroxidación sólo refleja que la velocidad de formación de estos compuestos es mayor que su degradación. Algunos autores (Kalpana y Madhava Rao, 1994; Stewart y Bewley, 1980) también han detectado un descenso de la cantidad de MDA en semillas de leguminosas sometidas a períodos prolongados de envejecimiento artificial, que atribuyen a oxidaciones posteriores de este compuesto. Por otra parte, el MDA puede reaccionar con aminoácidos libres formando compuestos tipo lipofuscina (Pauls y Thompson, 1984), que podrían ser responsables de la menor cantidad de MDA detectada en las semillas más envejecidas.

De acuerdo con los datos aparecidos en la literatura (Dhindsa y col., 1981; Pauls y Thompson, 1984; Pukacka y Kuiper, 1988; Senaratna y col., 1988), la peroxidación lipídica afecta fundamentalmente a los lípidos de membrana, produciendo alteraciones importantes en la funcionalidad de las mismas, que se pone de manifiesto por la liberación masiva e irreversible de solutos durante el proceso de rehidratación. Sin embargo, en nuestro material biológico no se observa una buena correlación entre la aparición de los productos de peroxidación (Figs. 35 y 36) y los valores de ICE (Fig. 28). Esta falta de

correlación sugiere que los procesos de peroxidación tienen lugar no sólo en las membranas sino que podrían afectar también a los lípidos de reserva, como ha apuntado Gidrol y col. (1989) y Francis y Coolbear (1988) en semillas artificialmente envejecidas de girasol y tomate, respectivamente. Esta última consideración permitiría explicar el mantenimiento de la viabilidad en las semillas donde la peroxidación lipídica se produce en alguna medida. Por otra parte, la mayor cantidad de MDA/g de tejido detectado en las SP (Fig. 35) apoya la hipótesis de que los lípidos de reserva pueden actuar contrarrestando la acción de los radicales libres. Los triglicéridos podrían ejercer su acción protectora frente a los radicales libres modificándose de forma cualitativa y cuantitativa en reacciones que posiblemente implicarían: 1) la hidrólisis de estos compuestos con la consiguiente liberación de ácidos grasos, lo que podría explicar el aumento de estos últimos detectado por algunos autores en semillas envejecidas (para revisión véase Priestley, 1986), y 2) la eliminación de los radicales en reacciones que implicarían a los grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo) de los ácidos grasos. La mayor proporción de lípidos de reserva que presentan las SG explicaría el mantenimiento de los niveles de glutathion total que se observa durante el envejecimiento y la menor cantidad de MDA presente en estas semillas.

5.6. Efecto del envejecimiento artificial en los sistemas antioxidantes analizados

5.6.1. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa

Las semillas, después de la etapa de maduración en la planta madre, sufren un proceso de desecación para permitir su supervivencia en condiciones adversas. Durante este proceso se generan especies activas de oxígeno, como el anión superóxido, que pueden desencadenar reacciones de peroxidación lipídica. Por ello es de vital importancia el mantenimiento de niveles elevados de SOD y de CAT, que permiten que el proceso de desecación de las semillas tenga lugar sin que se produzcan daños en sus estructuras

vitales. Este hecho explicaría la elevada actividad SOD (Fig. 39) detectada en semilla en estado seco. Por otra parte, el envejecimiento acelerado podría producir alteraciones en las enzimas de la fracción soluble, que explicarían el descenso observado de la actividad SOD en semillas sometidas a períodos prolongados de tratamiento.

Los resultados obtenidos (Fig. 39) son semejantes a los descritos por Dhindsa y Matowe (1981) y Seel y col. (1992) en otros organismos tolerantes a la desecación (*Tortula ruralis*), donde se observa un incremento de la actividad SOD durante el proceso de deshidratación, y un posterior descenso de la misma en el momento de la rehidratación, que se puede interpretar como una estabilización de la actividad enzimática tras la eliminación de las especies tóxicas. Estos resultados concuerdan además con los observados por Cakmak y col., (1993) en semilla de trigo. Por otra parte, el efecto del envejecimiento artificial se detecta también por el descenso de la actividad SOD de las semillas hidratadas a medida que se prolonga el tratamiento, en concordancia con los resultados obtenidos por Sung y Jeng (1993) en semillas de cacahuete. Sin embargo, el proceso de germinación conlleva la restauración de la actividad respiratoria mitocondrial, principal mecanismo generador de aniones superóxido (Puntarulo y col., 1991), por lo que es posible suponer que la continuación del proceso de germinación dará lugar a un incremento importante en la actividad SOD, al menos en las semillas no envejecidas.

Si comparamos estos resultados expresados por gramo de semilla no se observan diferencias significativas entre los dos tipos considerados (SP y SG), lo que podría señalar una cierta uniformidad en la distribución de esta enzima entre el eje embrionario y los cotiledones. En cambio, si comparamos los resultados expresados por unidad de semilla, se obtienen valores más elevados en las semillas de mayor tamaño. Sin embargo, la actividad SOD (U/g de semilla) de SP y SG hidratadas presenta diferencias muy significativas ($P \leq 0,01$), ya que se obtuvieron valores de actividad inferiores en las SG. Esta menor actividad podría estar relacionada con la posible actuación paralela de los lípidos de reserva, que podrían atenuar, al menos parcialmente, la acción de las especies activas de oxígeno.

5.6.2. Evaluación de la actividad catalasa

En nuestro material biológico, la actividad CAT no se modifica durante la rehidratación de las semillas no tratadas, SP y SG, ni en las SP sometidas a la técnica de envejecimiento artificial (Fig. 40). Sin embargo, las SG envejecidas presentan un descenso de la actividad CAT, que podría estar relacionado con los mecanismos bioquímicos que se producen durante el proceso germinativo. En este sentido, Puntarulo y col. (1991) han observado, en embriones de soja, que la actividad CAT sólo se modifica durante las fases II y III de la germinación. Precisamente, la movilización de las reservas lipídicas en las semillas oleaginosas se considera como un proceso post-germinativo que se produce en los tejidos de reserva y aporta energía al embrión. Sin embargo, los estudios realizados en las semillas de girasol (Raymond y col., 1992) demuestran que existe β -oxidación en las semillas hidratadas durante 4 horas, que se encuentran en la fase pregerminativa, anterior a la emergencia de la radícula. Durante la primera etapa de la β -oxidación se produce peróxido de hidrógeno, cuyos efectos tóxicos -ya comentados- hacen indispensable su eliminación. El hecho de que la actividad CAT disminuya en las SG envejecidas (7 y 11 días) e hidratadas (Fig. 40), podría estar relacionado con el retraso en la puesta en marcha de los mecanismos bioquímicos responsables del proceso germinativo, como cabe deducir del aumento del tiempo medio de germinación (Fig. 15). El proceso principalmente implicado en esta disminución es la β -oxidación. Si en las semillas envejecidas esta ruta metabólica resulta afectada, cabría esperar una menor producción de peróxido de hidrógeno y, en consecuencia, una menor actividad CAT. Asimismo, en la formación de peróxido de hidrógeno durante la germinación contribuye en gran medida la enzima SOD, que de esta forma permite la eliminación de los aniones superóxido generados durante la respiración. Según los resultados observados en nuestro material biológico, la destoxicación del peróxido de hidrógeno en esta fase pregerminativa recae básicamente en la enzima CAT, ya que la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa se detecta a partir de las 24 horas de imbibición (Pérez Otaola y col., 1994).

5.6.3. Evaluación de la funcionalidad del ciclo ascorbato-glutation

5.6.3.1. Niveles de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, y actividades enzimáticas relacionadas

Los resultados obtenidos revelan la ausencia de cantidades apreciables de estos compuestos en las semillas en estado seco, así como en las sometidas a cortos períodos de imbibición. Estos resultados concuerdan con los presentados por Pukacka (1991) en semillas de *Acer platanoides*, por Fontaine y col. (1994) en semillas de *Hordeum vulgare* y por Arrigoni y col. (1992) en semillas de *Vicia faba*, quienes describen el acusado descenso de los niveles de AA y DHA durante la maduración, que llegan a ser mínimos, e incluso indetectables, en las semillas totalmente desarrolladas.

Por otra parte, el estudio de las enzimas relacionadas con la actividad antioxidante del ácido ascórbico (ApoX, MDred, DHred y GSSGred) sólo dio resultados positivos en el caso de la GSSGred, la cual se comenta adecuadamente en el apartado relativo al glutatión. La ausencia de estas enzimas en la semilla en estado seco concuerda con los resultados presentados por Klapheck y col., (1990) en semillas de *Ricinus communis* y Cakmak y col., (1993) en semillas de trigo, en las cuales sólo se detectaba actividad DHred y GSSGred. En nuestro material se detectó cierta actividad residual de DHred, difícilmente cuantificable. Por otra parte, los estudios realizados por nuestro equipo de investigación (Pérez Otaola y col., 1994) sobre el desarrollo del ciclo del ascorbato-glutatión en las semillas de girasol durante el proceso de germinación, apuntan que la expresión de estas enzimas, salvo el caso de la DHred y GSSGred, tiene lugar entre las 24 y 48 horas del comienzo de la imbibición.

La ausencia de ácido ascórbico en las semillas secas de girasol estaría compensada con los elevados niveles de glutatión (Figs. 41 y 42), que actuarían como principal antioxidante no enzimático de la fracción soluble celular, tanto en la semilla en estado seco

como en la fase pregerminativa. El desarrollo posterior de las enzimas relacionadas con el ácido ascórbico, implicadas fundamentalmente en la destoxicación del H_2O_2 , permite suponer que durante la primera fase de la germinación (4 y 12 horas de imbibición), el mecanismo de eliminación del peróxido de hidrógeno reside fundamentalmente en la actividad de la catalasa.

5.6.3.2. Niveles de glutatión y glutatión reductasa

De acuerdo con los resultados descritos se puede indicar que:

- a) Los niveles de glutatión detectados en las SP difieren significativamente de los detectados en las SG (Tabla 59). El envejecimiento acelerado produce una disminución importante de los niveles de glutatión total de las SP (Fig. 41A), mientras que no afecta significativamente a dicha cantidad en las SG (Fig. 42A). En ambos tipos de semilla, el tratamiento altera la distribución GSH:GSSG, favoreciendo el desplazamiento hacia la forma GSSG, que se manifiesta en un incremento de la tasa de oxidación (Figs. 43A, 44A, 45A y 46A).
- b) En ambos tipos de semillas, el eje embrionario presenta mayor concentración de glutatión que los cotiledones (Tabla 64). La alteración de los niveles de glutatión por efecto del envejecimiento artificial tiene lugar en ambos componentes de la semilla. Los ejes embrionarios de las SP y las SG sometidas al proceso de envejecimiento artificial presentan un descenso similar en la cantidad de glutatión, mientras que la disminución de los niveles de glutatión detectados durante el envejecimiento de las semillas se debe fundamentalmente a la alteración de este compuesto en los cotiledones.

- c) Las semillas hidratadas (4 y 12 horas) incrementan de forma significativa sus niveles de glutatión (Figs. 41B y 42B), desplazándose la distribución de este compuesto hacia la forma reducida (Figs. 43B y 45B), lo cual se manifiesta en un descenso muy acusado de la tasa de oxidación en comparación con la detectada en las semillas en estado seco. Las semillas envejecidas y posteriormente rehidratadas, aunque incrementan su contenido en glutatión, alcanzan concentraciones inferiores de este compuesto, y el desplazamiento hacia la forma GSH es menos acusado, lo que da lugar a un incremento lineal (Figs. 44B y 46B) de la tasa de oxidación en función del tiempo de envejecimiento artificial.
- d) La actividad GSSGred de las semillas en estado seco (Fig. 47) se mantiene, con ligeras variaciones, durante el período de envejecimiento. El proceso de rehidratación afecta de manera muy significativa a la actividad GSSGred detectada en las SP.

El descenso de glutatión total, observado en las SP (Fig. 41A), se debe fundamentalmente a la disminución de la cantidad de GSH presente en los tejidos. Esta disminución supone que durante el envejecimiento tienen lugar una serie de reacciones que implican al GSH, además de los procesos de autooxidación que generan GSSG. Una de estas reacciones podría ser la formación de compuestos del tipo disulfuros mixtos (GS-proteínas), como han postulado diversos autores (Butt y Ohlrogge, 1991; Kranner y Grill, 1993). Los disulfuros mixtos son compuestos estables, es decir, no sufren posteriores oxidaciones y son además fácilmente reversibles cuando las células, una vez hidratadas, son capaces de regenerar el poder reductor. Estos disulfuros mixtos, que en condiciones normales se producen en muy pequeña cantidad, podrían actuar protegiendo los grupos -SH de las proteínas evitando así su oxidación irreversible en condiciones de estrés oxidativo. Por otra parte, la ausencia de alteraciones significativas en los niveles de glutatión total de las SG (Fig. 42A) podría, en principio, indicar que estas semillas presentan mayor resistencia al estrés oxidativo que las SP, lo cual, sin embargo, no se corresponde con los valores de viabilidad obtenidos en los ensayos de germinación

(Fig. 16). No obstante, si observamos la distribución del glutatión total en GSH:GSSG (Figs. 43A y 45A) y, en consecuencia, la tasa de oxidación, de SP (Fig. 44A) y SG (Fig. 46A) no envejecidas, se detecta una diferencia importante, ya que para las primeras los niveles de GSSG son muy inferiores a los de GSH, es decir, las células se encuentran en un ambiente reductor, mientras que las SG presentan inicialmente niveles de GSSG muy altos, superiores a los de GSH, lo que explicaría que la tasa de oxidación no se modifique de forma tan acusada durante el envejecimiento. En cualquier caso, la evolución de los niveles de glutatión en las semillas (SP y SG) en estado seco y su distribución en las fracciones GSH:GSSG pone de manifiesto que el envejecimiento produce una lenta conversión de GSH en GSSG variando las proporciones relativas de estos compuestos.

El análisis de los componentes estructurales de la semilla (Tabla 64), a excepción del pericarpio, revela la importancia del glutatión en el eje embrionario, donde se encuentra a una elevada concentración. Asimismo, se puede resaltar que la diferente evolución de los niveles de glutatión en respuesta al envejecimiento que se observa entre las SP y SG, se debe fundamentalmente a los cotiledones. Los ejes embrionarios de SP y SG sufren una disminución semejante de su contenido en glutatión, hasta alcanzar un 46 y 45 % del nivel inicial, respectivamente, y un incremento importante en GSSG (64 y 20 %, respectivamente). Por el contrario, los cotiledones de las SP sufren una alteración en su contenido en glutatión de forma mucho más acusada que la observada en los cotiledones de las SG. Paralelamente, los cotiledones de SG no presentan un incremento apreciable de GSSG, mientras que el contenido de este compuesto aumenta en un 52 % en los cotiledones de las SP. Las causas de esta diferente respuesta al envejecimiento pueden atribuirse a la acción de los lípidos de reserva, muy abundantes en SG, que podrían actuar como captadores de radicales libres, según han apuntado Gidrol y col. (1989) en semillas de girasol.

Todos estos resultados indicarían que las semillas en estado seco (SP y SG) presentan unos niveles de glutatión que se van consumiendo, a medida que se prolonga el envejecimiento, en las reacciones de protección frente a los distintos agentes que aceleran

el proceso de deterioro (radicales libres, especies activas de oxígeno). La baja actividad metabólica de las semillas en estado seco impide restaurar los niveles de antioxidantes por procesos de nueva síntesis, por lo que durante el envejecimiento prolongado dichos niveles pueden llegar a ser insuficientes para contrarrestar la acción de los radicales libres, lo cual daría lugar a la pérdida de viabilidad de las semillas y a la aparición de plántulas anormales.

La rehidratación de las semillas (Figs. 41B y 42B), se traduce en todos los casos en un incremento muy acusado de los niveles de glutatión total. Sin embargo, la capacidad de las semillas envejecidas para restablecer los elevados niveles de glutatión necesarios para el correcto funcionamiento celular, varía de forma importante en función del tiempo de tratamiento, ya que sólo las semillas sometidas a cortos períodos de envejecimiento son capaces de alcanzar niveles de glutatión próximos a los detectados en semillas no envejecidas. Este restablecimiento de los niveles adecuados de glutatión total podría ser indicativo de la posible reducción de los disulfuros mixtos formados durante el envejecimiento, así como de la correcta activación de los mecanismos biosintéticos que tiene lugar durante la rehidratación de las semillas. En relación con este último aspecto, cabe señalar que las enzimas responsables de la biosíntesis de glutatión (γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa) requieren ATP para su actuación. Sin embargo, la carga energética de las semillas envejecidas está disminuida (Priestley, 1986), lo que podría contribuir a la menor capacidad para la síntesis de glutatión durante la rehidratación de las semillas envejecidas, lo cual no excluye otras alteraciones de estos mecanismos biosintéticos.

No obstante, algunos autores (Fahey y col., 1980) no han observado incrementos en los niveles de glutatión total en las semillas de trigo sometidas a rehidratación, sino, por el contrario, han detectado un descenso importante en GSH en las semillas hidratadas respecto a su contenido en semillas en estado seco, que han atribuido a la utilización del GSH como reservorio de cisteína, necesaria para la síntesis proteica. Sin embargo, la importancia del GSH en el metabolismo celular, como antioxidante en reacciones

enzimáticas y no enzimáticas, destoxicante de herbicidas y xenobióticos y cofactor de numerosas reacciones enzimáticas, permite suponer que la utilización de GSH como reservorio de cisteína sólo tendría lugar cuando se mantuvieran condiciones de estricto déficit de azufre.

La distribución de glutatión total en sus formas GSH y GSSG (Figs. 43B y 45B) en las semillas hidratadas está en todos los casos desplazada hacia la forma reducida, lo cual pone de manifiesto la actividad y funcionalidad de la enzima GSSGred. Resultados similares han sido observados por de Vos y col. (1994) y Kranner y Grill (1993) en semillas de otras especies. El hecho de que la tasa de oxidación (Figs. 44B y 46B) aumente linealmente en función del tiempo de envejecimiento revela el daño producido, que podría afectar tanto a los mecanismos biosintéticos como a la actividad de la enzima GSSGred, más evidente en SG.

La actividad GSSGred se mantiene durante el envejecimiento, aunque presenta diferencias significativas en los períodos más prolongados de tratamiento (Fig. 47). Sin embargo, el incremento progresivo de GSSG (Figs. 43A y 45A) que se observa durante el envejecimiento, parece indicar que la capacidad de actuación de la GSSGred está muy limitada en las condiciones de baja humedad (6 % p.s.) que mantienen las semillas en estado seco. La actividad GSSGred en las semillas rehidratadas (Fig. 47) está incrementada respecto de la actividad detectada en semilla seca, por lo que los niveles de GSSG se reducen drásticamente durante la rehidratación.

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de esta enzima en semilla seca permite su rápida actuación al comienzo de la imbibición. La actividad GSSGred desempeña, por tanto, un papel fundamental en el proceso de germinación, ya que contribuye al aumento del poder reductor por formación de GSH, necesario en numerosos procesos metabólicos (de Paula y col., 1991c; Rauser y col., 1991) y paralelamente disminuye la cantidad de GSSG. La relación GSSG/GSH debe ser necesariamente baja para permitir la síntesis proteica (Fahey y col., 1980; Rennenberg, 1982) ya que el GSSG puede

actuar sobre uno de los factores de iniciación de la traslación inhibiendo la síntesis de proteínas (Kan y col., 1988). Algunos autores (Schmidt y Kurnet, 1986) han observado que el aumento de la relación GSSG/GSH está directamente relacionado con el incremento de la actividad GSSGred, posiblemente por un mecanismo de activación mediado por GSSG. La elevada relación GSSG/GSH observada en las semillas envejecidas de girasol (Figs. 44A y 46A) viene también acompañada por un incremento importante de la actividad GSSGred en el momento de la hidratación.

Por otra parte, los niveles de glutatión reducido de las semillas envejecidas (SP y SG) y posteriormente rehidratadas muestran una alta correlación con la viabilidad (Fig. 52), lo que pone de manifiesto la importancia del mantenimiento de un ambiente reductor intracelular que permita el normal funcionamiento de la semilla y el posterior desarrollo de la plántula. De acuerdo con esta idea, cabría esperar que la toxicidad del GSSG pudiera contribuir, al menos parcialmente, a la aparición de plántulas anormales y semillas muertas, como parece reflejar la correlación existente entre estos parámetros y los niveles de este compuesto en SG, a las 12 horas de imbibición, ($r=0,7887^{***}$ y $r=0,8677^{***}$) y en las SP hidratadas durante 4 horas ($r=0,7150^{***}$ y $r=0,8316^{***}$).

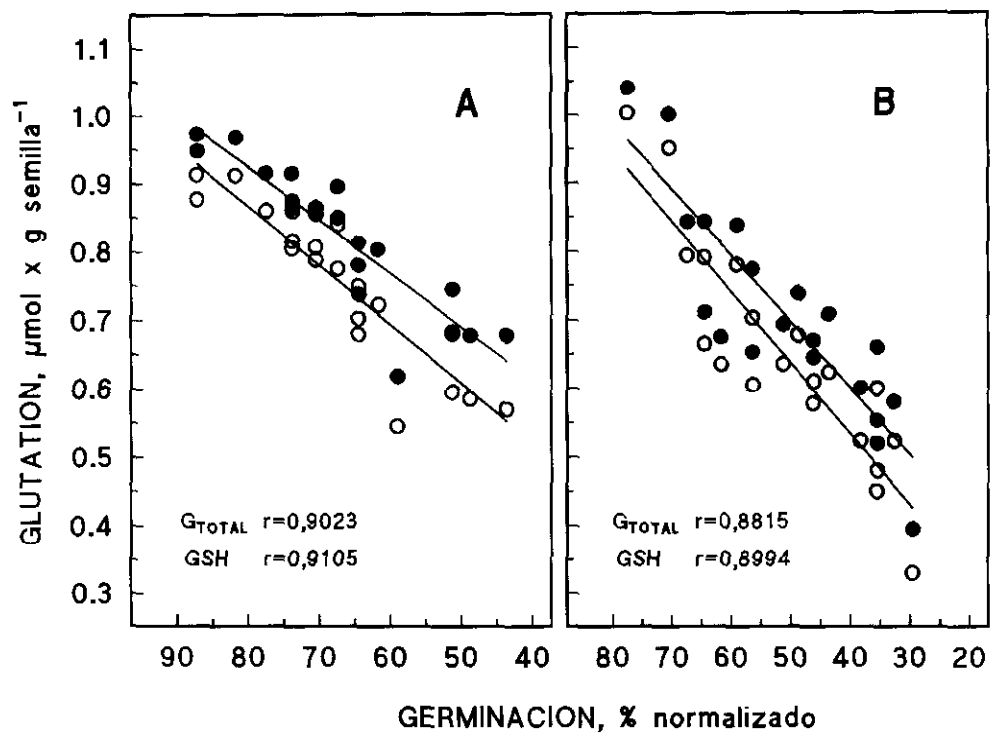


Figura 52. Correlación entre los niveles de glutation total (círculos negros) y GSH (círculos blancos) con la viabilidad expresada como porcentaje de germinación normalizado, para las semillas de girasol cv. Peredovik, SP (A) y SG (B), sometidas a envejecimiento artificial (43°C , 75 % HR) durante 1, 3, 5, 7 y 11 días.

5.7. Relaciones entre parámetros fisiológicos y bioquímicos en las semillas de girasol artificialmente envejecidas

La pérdida de viabilidad es el síntoma más evidente que se observa en semillas envejecidas y/o deterioradas. Este efecto se ha asociado con diversas alteraciones de los componentes celulares, entre las que se incluyen los daños en las membranas, que juegan un importante papel en la compartimentación de las células (de Paula y col., 1993; Fernández García de Castro y Martínez-Honduvilla, 1984; Torres y Martínez-Honduvilla, 1990; Torres y col., 1991), y que pueden deteriorarse por las modificaciones de sus dos principales constituyentes, los fosfolípidos y las proteínas. Una de las ideas más aceptadas para explicar las alteraciones de las membranas producidas por el envejecimiento, concierne a los productos de la reducción del oxígeno y moléculas relacionadas (radicales libres), que afectarían principalmente a los fosfolípidos vía peroxidación (Priestley, 1986), sin excluir otros posibles mecanismos, como se ha descrito en plantas sometidas a diversas condiciones adversas (Levitt, 1980), que conllevan modificaciones de las proteínas estructurales de las membranas. Entre estas modificaciones, la más perjudicial implica la formación de puentes disulfuro entre las proteínas adyacentes. Ante la toxicidad de estos compuestos y dado que su formación es inherente al metabolismo celular, las células disponen de mecanismos eficaces de defensa capaces de prevenir, paliar y/o eliminar su producción masiva, por la acción de diversas enzimas y sustancias de carácter antioxidante. Sin embargo, es el estado fisiológico de la semilla el que determina la diferente actividad de los sistemas antioxidantes presentes en las células. Las semillas en estado seco presentan niveles de humedad muy bajos, que limitan su actividad metabólica y, en consecuencia, los mecanismos de defensa se basan en el mantenimiento de una reserva de antioxidantes no enzimáticos lo suficientemente alta como para poder contrarrestar la acción de los radicales libres, y evitar la oxidación irreversible de los distintos grupos funcionales. Se trata, por tanto, de un mecanismo de protección pasivo, ya que la desaparición de los compuestos antioxidantes no puede ser compensada por la síntesis de otros nuevos y desemboca de forma irremediable en la alteración de las estructuras vitales de la célula. La rehidratación de las semillas permite la restauración de un metabolismo

activo y la actuación de los sistemas enzimáticos encargados de eliminar a los agentes tóxicos. Por lo tanto, los mecanismos de defensa operan en dos sentidos: 1) mediante la eliminación no enzimática de los radicales libres por acción de sustancias antioxidantes que se mantienen en niveles elevados por medio de enzimas específicas o por procesos de nueva síntesis, y 2) por la acción de enzimas capaces de catalizar la eliminación sistemática de los agentes tóxicos.

El estudio de los mecanismos antioxidantes analizados en la semilla de girasol en estado seco revela que el glutathion es probablemente el principal agente antioxidante de la fracción soluble, ya que no se detectaron niveles apreciables de ácido ascórbico ni de su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico. Por otra parte, también se observaron niveles elevados de enzimas como la GSSGred, encargada del mantenimiento del glutathion en estado reducido, y las enzimas relacionadas con la eliminación de las especies tóxicas de oxígeno, SOD y CAT. Como se ha discutido anteriormente, la actividad de estas enzimas está muy limitada en condiciones de bajo contenido de humedad, lo que permite suponer que su presencia en las semillas en estado seco está encaminada a su inmediata actuación cuando los niveles de humedad sean lo suficientemente elevados. En este sentido, la alteración de las actividades GSSGred y SOD durante el envejecimiento podría afectar a la viabilidad de las semillas, como refleja la correlación existente entre estos parámetros (Tablas 76, 77, 78 y 79).

El envejecimiento de las semillas de menor tamaño se detecta por un incremento importante de la tasa de oxidación, medida como la relación GSSG/GSH, y por un descenso de los niveles de glutathion total. Este efecto no es tan evidente en las semillas de mayor tamaño, debido probablemente a la colaboración de los lípidos de reserva como captadores de radicales libres. En este sentido, los lípidos podrían ejercer su acción protectora mediante diversas reacciones que implicarían cambios tanto cualitativos como cuantitativos de estos compuestos, dado que el índice de peroxidación, determinado por la cantidad de MDA, es inferior en las SG. Sin embargo, el descenso de la viabilidad de las SP se hace patente sólo a partir del día 7 de envejecimiento, cuando precisamente los

niveles de antioxidantes se encuentran muy por debajo de los observados en las semillas no envejecidas, mientras que la alta tasa de oxidación inicial de las SG hace que éstas sean menos tolerantes a las condiciones adversas experimentalmente aplicadas, lo cual se manifiesta en la pérdida de viabilidad a partir del tercer día de tratamiento.

La rehidratación de las semillas durante la fase pregerminativa permite la restauración de los niveles de glutatión, no sólo por la reducción de sus productos de oxidación, sino también por la puesta a punto de los procesos biosintéticos. Además, durante esta fase tiene lugar la iniciación del metabolismo respiratorio y la movilización de reservas, que a su vez originan nuevas especies tóxicas, eliminadas por la acción de las enzimas SOD y CAT. La ausencia de Apox durante esta primera fase de la germinación hace que la actividad CAT sea la única responsable de la eliminación enzimática del peróxido de hidrógeno, aunque en etapas posteriores de la germinación de la semilla de girasol podrían ponerse a punto otros sistemas de detoxificación, que implican la completa funcionalidad del ciclo del ascorbato-glutatión (Pérez-Otaola y col., 1994). Este aumento de los niveles de GSH produce una notable disminución de la tasa de oxidación en las semillas rehidratadas. Consecuentemente, la activación de este sistema genera un ambiente reductor que favorece el normal funcionamiento celular. En esta situación, la capacidad de las células para reparar los daños producidos por el envejecimiento estaría incrementada, lo que explica el mantenimiento de la viabilidad de las semillas, como se pone de manifiesto por las relaciones existentes entre este parámetro y los niveles de GSH (Tablas 76- 79, Fig. 52). Cabe señalar además, que las correlaciones existentes entre la tasa de oxidación y las magnitudes que miden las alteraciones de membrana, como son la ICE de los exudados procedentes de las semillas libres de pericarpio y el contenido de fósforo determinado a las 24 horas en el medio de imbibición (Tablas 76-79), contribuyen a reforzar esta hipótesis. Por tanto, la rehidratación de las semillas envejecidas pone de manifiesto que la capacidad para contrarrestar los efectos del envejecimiento sólo es posible cuando las alteraciones metabólicas no son muy drásticas. Es decir, las semillas envejecidas que mantienen niveles adecuados de enzimas y sustancias antioxidantes, son capaces de conservar su viabilidad.

DISCUSIÓN

Por último, la interpretación de los resultados obtenidos que se apoya en las interrelaciones de los distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos (Tablas 76-79), se concreta gráficamente en la Figura 53.

TABLA 76. Matriz de correlación entre los *parámetros fisiológicos y bioquímicos analizados en las semillas (SP) cv. Peredovik sometidas a envejecimiento artificial.

	G	N	A	M	TMG	P ₂₄	A ₂₈₀	ICE _{24cp}	ICE _{24sp}	MDA	MDA 4h	SOD	SOD 4h	CAT	CAT 4h	G _{TOTAL}	GSSG	GSH	T.O.	GSSGred	G _{TOTAL} 4h	GSSG 4h	GSH 4h	T.O. 4h	GSSGred 4h
G	1,0000																								
N	0,5300	1,0000																							
A	-0,6207	-0,1544	1,0000																						
M	-0,9539	-0,5055	0,6791	1,0000																					
TMG	-0,6231	-0,7811	0,3125	0,6546	1,0000																				
P₂₄	-0,7832	-0,5324	0,6211	0,8077	0,5861	1,0000																			
A₂₈₀	-0,6558	-0,6049	0,5291	0,6476	0,5058	0,8908	1,0000																		
ICE_{24cp}	-0,2119	-0,4437	0,0571	0,1991	0,3313	0,0278	-0,0285	1,0000																	
ICE_{24sp}	-0,8652	-0,6497	0,6667	0,8971	0,7530	0,8633	0,7301	0,3432	1,0000																
MDA	0,0005	0,7259	0,2849	0,0222	-0,4443	-0,0641	-0,1355	-0,5170	-0,2462	1,0000															
MDA 4h	0,5517	0,8729	-0,3081	-0,5458	-0,7709	-0,4224	-0,4292	-0,6044	-0,7160	0,7377	1,0000														
SOD	0,1735	0,6009	0,2586	-0,1563	-0,5034	0,1057	0,1063	-0,5352	-0,2421	0,7035	0,7218	1,0000													
SOD 4h	-0,3996	0,2651	0,5651	0,4694	-0,0599	0,3956	0,2844	-0,1445	0,2241	0,6803	0,2896	0,6525	1,0000												
CAT	-0,4358	0,1962	0,5555	0,3973	0,0606	0,3933	0,2745	-0,2758	0,2617	0,4523	0,1462	0,5912	0,6888	1,0000											
CAT 4h	-0,3598	0,2468	0,5153	0,4148	-0,0433	0,3174	0,1886	-0,3220	0,1832	0,5977	0,2097	0,3640	0,6761	0,3856	1,0000										
G_{TOTAL}	0,5605	0,8196	-0,2366	-0,5505	-0,6233	-0,3626	-0,4415	-0,2998	-0,5285	0,4730	0,7491	0,6139	0,1892	0,1754	0,1779	1,0000									
GSSG	-0,8335	-0,3591	0,8100	0,8186	0,3862	0,6566	0,6227	0,1534	0,6980	0,1376	-0,4667	0,0251	0,5591	0,5265	0,4697	-0,5088	1,0000								
GSH	0,6378	0,7982	-0,3027	-0,6282	-0,6730	-0,3781	-0,4350	-0,2994	-0,5812	0,4202	0,7726	0,6348	0,1299	0,1036	0,0748	0,9805	-0,5686	1,0000							
T.O.	-0,7198	-0,5785	0,7068	0,7278	0,5099	0,7737	0,8058	0,1224	0,7353	-0,1813	-0,6014	-0,0440	0,3348	0,4037	0,2809	-0,5999	0,8767	-0,6148	1,0000						
GSSGred	0,3854	0,7659	0,0513	-0,3798	-0,6563	-0,5546	-0,5436	-0,3910	-0,5545	0,5859	0,5552	0,3246	0,1182	0,1072	0,2309	0,3557	-0,0627	0,3493	-0,2705	1,0000					
G_{TOTAL} 4h	0,3623	0,9023	-0,0687	-0,3973	-0,6395	-0,3907	-0,4821	-0,3254	-0,5085	0,7128	0,7826	0,6233	0,3534	0,3903	0,2882	0,8509	-0,2443	0,7920	-0,4838	0,5560	1,0000				
GSSG 4h	-0,8276	-0,3831	0,7150	0,8316	0,4889	0,8502	0,7641	0,1849	0,8344	0,0154	-0,4621	0,0742	0,5061	0,5091	0,4072	-0,3085	0,8441	-0,3550	0,8228	-0,3306	-0,2464	1,0000			
GSH 4h	0,3882	0,9106	-0,0717	-0,4153	-0,6730	-0,3984	-0,4680	-0,3538	-0,5327	0,7145	0,7985	0,6550	0,3690	0,3985	0,2887	0,8496	-0,2361	0,7988	-0,4615	0,5754	0,9956	-0,2492	1,0000		
T.O. 4h	-0,8532	-0,4997	0,7102	0,8648	0,5906	0,8565	0,7528	0,2894	0,8785	-0,0947	-0,5674	-0,0039	0,4843	0,4962	0,3281	-0,4147	0,8539	-0,4587	0,8537	-0,4329	-0,3387	0,9745	-0,3421	1,0000	
GSSGred 4h	0,2283	0,7915	0,0259	-0,2402	-0,6604	-0,4511	-0,4497	-0,5347	-0,5537	0,8201	0,7298	0,4976	0,4195	0,3085	0,5303	0,4236	-0,0005	0,3772	-0,3062	0,8256	0,6858	-0,2593	0,7044	-0,3611	1,0000

*Nomenclatura de los parámetros, definida en la lista de abreviaturas.

TABLA 77. Matriz de significación de los coeficientes de correlación señalados en la Tabla 76. P<0,001 (***); P<0,01 (**); P<0,05 (*); diferencias no significativas (NS).

	G	N	A	M	TMG	P ₂₄	A ₂₈₀	ICE _{24CP}	ICE _{24SP}	MDA	MDA 4h	SOD	SOD 4h	CAT	CAT 4h	G _{TOTAL}	GSSG	GSH	T.O.	GSSGred	G _{TOTAL} 4h	GSSG 4h	GSH 4h	T.O. 4h	GSSGred 4h
G	-																								
N	*	-																							
A	**	NS	-																						
M	***	*	***	-																					
TMG	**	***	NS	**	-																				
P ₂₄	***	*	**	***	**	-																			
A ₂₈₀	**	**	*	**	*	***	-																		
ICE _{24CP}	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-																	
ICE _{24SP}	***	**	**	***	***	***	***	NS	-																
MDA	NS	***	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	-															
MDA 4h	*	***	NS	*	***	NS	NS	**	***	***	-														
SOD	NS	**	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	***	***	-													
SOD 4h	NS	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	**	-												
CAT	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	**	***	-											
CAT 4h	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	-										
G _{TOTAL}	*	***	NS	*	**	NS	NS	NS	*	*	***	**	NS	NS	NS	-									
GSSG	***	NS	***	***	NS	**	**	NS	***	NS	*	NS	*	*	*	*	-								
GSH	**	***	NS	**	**	NS	NS	NS	**	NS	***	**	NS	NS	NS	***	**	-							
T _{OXIDACION}	***	**	***	***	*	***	***	NS	***	NS	**	NS	NS	NS	NS	**	***	**	-						
GSSGred	NS	***	NS	NS	**	*	*	NS	*	**	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-				
G _{TOTAL} 4h	NS	***	NS	NS	**	NS	*	NS	*	***	***	**	NS	NS	NS	***	NS	***	*	*	-				
GSSG 4h	***	NS	***	***	*	***	***	NS	***	NS	*	NS	*	*	NS	NS	***	NS	***	NS	NS	-			
GSH 4h	NS	***	NS	NS	**	NS	*	NS	*	***	***	**	NS	NS	NS	***	NS	***	*	**	***	NS	-		
T.O. 4h	***	*	***	***	**	***	***	NS	***	NS	**	NS	*	*	NS	NS	***	*	***	NS	NS	***	NS	-	
GSSGred 4h	NS	***	NS	NS	**	*	*	*	*	***	***	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	***	***	NS	***	NS

TABLA 78. Matriz de correlación entre los [†]parámetros fisiológicos y bioquímicos analizados en las semillas (SG) de girasol cv. Peredovik, sometidas a envejecimiento artificial.

	G	N	A	M	MGT	P ₂₄	A ₂₈₀	ICE _{24cp}	ICE _{24sp}	MDA	MDA 4h	MDA 12h	SOD	SOD 4h	CAT	CAT 4h	G _{TOTAL}	GSSG	GSH	T.O.	GSSGred	G _{TOTAL} 12h	GSSG 12h	GSH 12h	T.O. 12h	GSSGred 12h	
G	1,0000																										
N	0,5904	1,0000																									
A	-0,7475	-0,4476	1,0000																								
M	-0,9996	-0,5856	0,7473	1,0000																							
MGT	-0,6029	-0,8532	0,6118	0,5961	1,0000																						
P ₂₄	-0,8126	-0,8126	-0,4073	0,8563	0,8153	1,0000																					
A ₂₈₀	-0,6011	-0,4548	0,4913	0,5986	0,3951	0,6625	1,0000																				
ICE _{24cp}	-0,2424	-0,0567	0,2922	0,2384	0,2755	0,4353	0,5076	1,0000																			
ICE _{24sp}	-0,6885	-0,4213	0,8680	0,6909	0,6628	0,8964	0,5370	0,4493	1,0000																		
MDA	-0,3954	0,3178	0,2981	0,3987	-0,1604	0,5055	0,3950	0,3098	0,3540	1,0000																	
MDA 4h	-0,1577	0,4906	0,0674	0,1557	-0,3585	0,2128	-0,0942	0,0274	-0,0458	0,4704	1,0000																
MDA 12h	-0,1667	0,4831	0,0682	0,1695	-0,3657	0,3651	0,3519	0,3011	0,1509	0,8524	0,5499	1,0000															
SOD	0,5986	0,9014	-0,5384	-0,5962	-0,8230	-0,5113	-0,5101	-0,2194	-0,6376	0,1831	0,5733	0,3751	1,0000														
SOD 12h	0,0704	0,6381	0,1554	-0,0656	0,0000	0,2503	0,1224	0,2578	0,2068	0,5158	0,6031	0,6167	0,5026	1,0000													
CAT	-0,3525	0,1077	0,6218	0,3478	0,2685	0,5258	0,1817	0,4362	0,6082	0,3408	0,3877	0,1516	0,0030	0,5755	1,0000												
CAT 12h	0,1053	0,6212	0,1372	-0,0987	-0,4267	0,1346	-0,0312	0,1657	0,2124	0,5547	0,3123	0,5031	0,4229	0,6545	0,4838	1,0000											
G _{TOTAL}	0,1554	0,6171	0,1225	-0,1580	-0,2483	0,1080	-0,1254	0,0821	0,1435	0,5535	0,5056	0,5060	0,5065	0,7543	0,5303	0,5323	1,0000										
GSSG	-0,4384	0,1248	0,5421	0,4395	0,2186	0,5744	0,1928	0,2188	0,5582	0,6201	0,4123	0,4768	0,0525	0,5616	0,6877	0,5707	0,6023	1,0000									
GSH	0,1016	0,7008	0,0461	-0,1032	-0,3547	0,0310	-0,2403	0,0875	0,0549	0,5412	0,5927	0,5006	0,5733	0,7356	0,5012	0,5130	0,9190	0,5404	1,0000								
T.O.	-0,6404	-0,0650	0,5971	0,6452	0,2006	0,7874	0,5848	0,3412	0,5945	0,5391	0,4455	0,5196	-0,0747	0,4631	0,5601	0,3029	0,1826	0,5641	0,1685	1,0000							
GSSGred	0,2863	0,8605	-0,3156	-0,2784	-0,7729	-0,1551	-0,3458	-0,0681	-0,2878	0,4857	0,6843	0,6176	0,7969	0,6274	0,0775	0,6008	0,4664	0,2356	0,5994	0,1529	1,0000						
G _{TOTAL} 12h	0,4248	0,8815	-0,3276	-0,4261	-0,6825	-0,2760	-0,4531	-0,1745	-0,3496	0,2964	0,7224	0,4371	0,8750	0,6913	0,2671	0,5090	0,7018	0,2753	0,7874	0,0421	0,8223	1,0000					
GSSG 12h	-0,8705	-0,5022	0,7807	0,8677	0,6053	0,8563	0,7187	0,2713	0,7287	0,4423	0,1177	0,3190	-0,5140	0,1288	0,4274	-0,0821	0,0841	0,5296	0,0406	0,7383	-0,3314	-0,3246	1,0000				
GSH 12h	0,4521	0,8994	-0,3555	-0,4529	-0,7081	-0,3087	-0,4689	-0,1749	-0,3779	0,2739	0,7044	0,4328	0,8928	0,6820	0,2380	0,5117	0,6823	0,2486	0,7769	0,0272	0,8307	0,9978	-0,3533	1,0000			
T.O. 12h	-0,8282	-0,6772	0,8225	0,8254	0,8066	0,8712	0,6901	0,4025	0,9001	0,2679	-0,1498	0,0779	-0,7882	-0,0495	0,4537	-0,0928	-0,0716	0,4338	-0,1564	0,5807	-0,5420	-0,5595	0,8812	-0,5898	1,0000		
GSSGred 12h	0,1428	0,7585	-0,1786	-0,1339	-0,6972	-0,0072	-0,2866	-0,1248	-0,1993	0,4351	0,7866	0,5702	0,7344	0,6001	0,1388	0,5478	0,4060	0,2575	0,5124	0,3238	0,9294	0,7702	-0,2118	0,7747	-0,4357	1,0000	

[†]Nomenclatura de los parámetros, definida en la lista de abreviaturas

TABLA 79. Matriz de significación de los coeficientes de correlación señalados en la Tabla 78. P<0,001 (***); P<0,01 (**); P<0,05 (*) y diferencias no significativas (NS).

	G	N	A	M	TMG	P ₂₄	A ₂₈₀	ICE _{24cp}	ICE _{24sp}	MDA	MDA 4h	MDA 12h	SOD	SOD 12h	CAT	CAT 12h	G _{TOTAL}	GSSG	GSH	T.O.	GSSGred	G _{TOTAL} 12h	GSSG 12h	GSH 12h	T.O. 12h	GSSGred 12h	
G	-																										
N	**	-																									
A	***	*	-																								
M	***	**	***	-																							
TMG	**	***	**	**	-																						
P ₂₄	***	***	NS	***	***	-																					
A ₂₈₀	**	*	*	**	NS	**	-																				
ICE _{24cp}	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	-																			
ICE _{24sp}	***	NS	***	***	**	***	*	*	-																		
MDA	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	-																	
MDA 4h	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	-																
MDA 12h	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	*	-															
SOD	**	***	*	**	***	*	*	NS	**	NS	**	NS	-														
SOD 12h	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	**	*	-													
CAT	NS	NS	**	NS	NS	*	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**	-												
CAT 12h	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*	NS	**	*	-											
G _{TOTAL}	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	*	*	*	***	*	*	-										
GSSG	NS	NS	*	NS	NS	**	NS	NS	*	**	NS	*	NS	**	***	**	**	-									
GSH	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	*	**	***	*	*	***	*	-								
T.O.	**	NS	**	**	NS	***	**	NS	**	*	*	*	NS	*	*	NS	NS	**	NS	-							
GSSGred	NS	***	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	*	***	**	***	**	NS	**	*	NS	**	NS	-						
G _{TOTAL} 12h	NS	***	NS	NS	***	NS	*	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	*	***	NS	***	NS	***	-					
GSSG 12h	***	*	***	***	**	***	***	NS	***	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	NS	NS	-				
GSH 12h	*	***	NS	*	***	NS	*	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	*	***	NS	***	NS	***	***	NS	-			
T.O. 12h	***	**	***	***	***	***	***	NS	***	NS	NS	NS	***	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	**	*	*	***	**	-	
GSSGred 12h	NS	***	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	***	**	***	**	NS	*	NS	NS	*	NS	***	***	NS	***	NS	-	

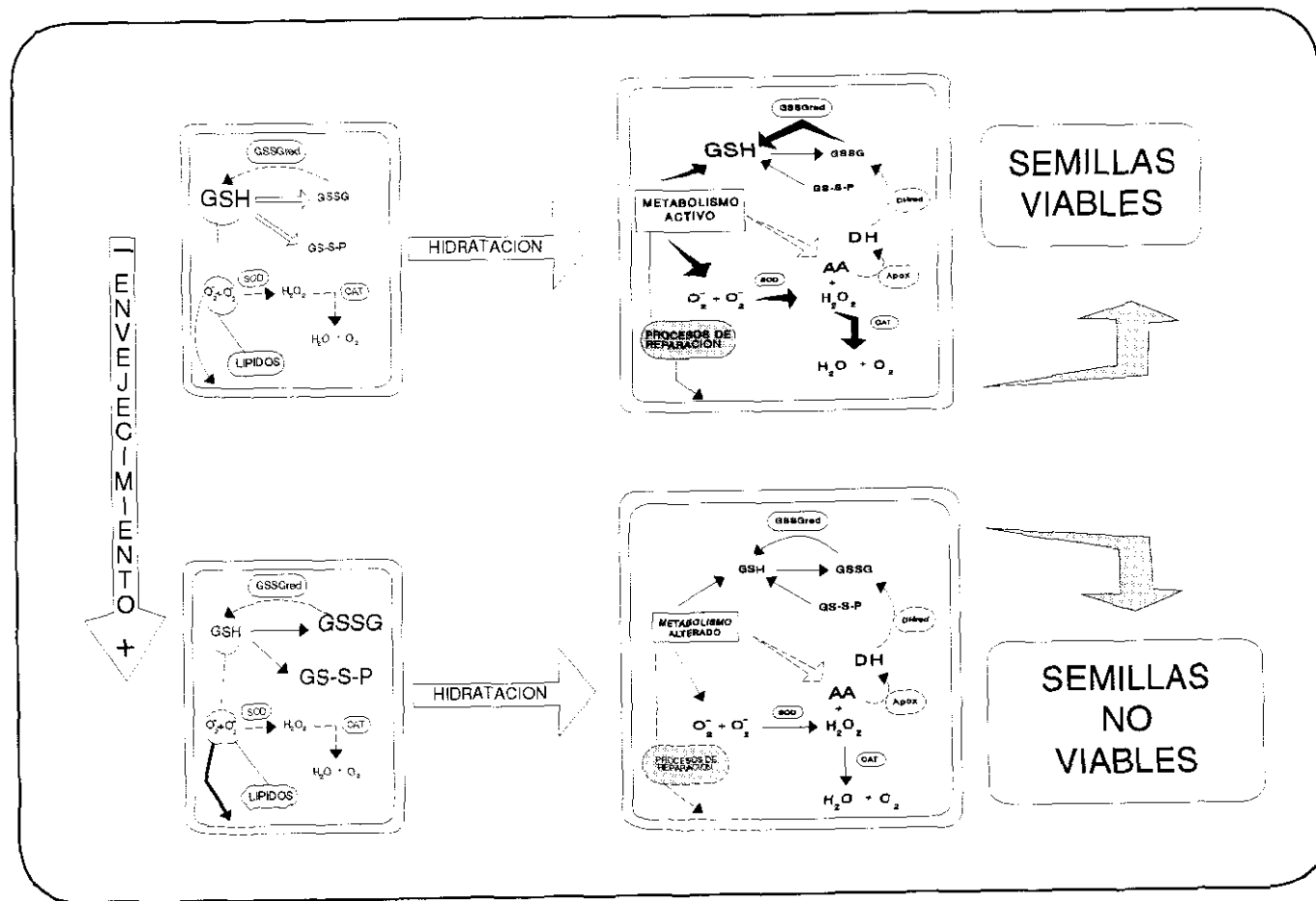


Figura 53. Alteraciones bioquímicas y fisiológicas observadas durante el envejecimiento artificial y posterior hidratación de las semillas de girasol cv. Peredovik.

6. CONCLUSIONES

- 1.- El envejecimiento artificial produce una pérdida progresiva de la viabilidad de las semillas de girasol cv. Peredovik, que se manifiesta por un descenso de la capacidad germinativa y un aumento del número de plántulas anormales y semillas muertas. El efecto del envejecimiento artificial es más evidente en las semillas de mayor tamaño, que presentan una menor tolerancia a las condiciones adversas de humedad y temperatura, mostrando, además, mayores alteraciones en los parámetros de vigor.

- 2.- Los ensayos de liberación de solutos reflejan la existencia de alteraciones en las membranas de las semillas artificialmente envejecidas, que se ponen de manifiesto por la salida masiva de compuestos orgánicos e iones, medida mediante la determinación de la absorbancia a 280 nm y del fósforo presente en los exudados y mediante los ensayos de ICE, a las 24 horas de imbibición. Sin embargo, la presencia del pericarpio y su aportación de iones al medio dificulta la interpretación de este ensayo y no permite estimar de forma fiable la pérdida de viabilidad observada en las semillas envejecidas. Por ello, el análisis de la liberación de iones a lo largo de todo el período de imbibición, así como la determinación de la ICE en las semillas "*sensu stricto*" proporcionan una información más rigurosa sobre las alteraciones de la permeabilidad de las membranas que se observa en las semillas almacenadas en condiciones adversas.

- 3.- Los resultados de los ensayos de ICE permiten proponer que la liberación de iones hasta las 16 horas de imbibición, se ajusta a un modelo de cesión de primer orden, que asume que la ICE final es dependiente de la cantidad de iones presentes en la semilla completa (pericarpio y semilla propiamente dicha), que se liberan con distinta velocidad de cesión.
- 4.- La existencia de procesos de peroxidación lipídica, que se pone de manifiesto por la presencia de MDA detectada en las semillas en estado seco, podría afectar fundamentalmente a los lípidos de reserva. La ausencia de un aumento significativo de los niveles de MDA durante el envejecimiento artificial no excluye que la alteración observada en las membranas de las semillas envejecidas pueda deberse también a la peroxidación de los lípidos que las componen.
- 5.- El envejecimiento artificial afecta a los sistemas antioxidantes analizados, alterando tanto las enzimas como las sustancias antioxidantes de la fracción soluble celular. Sin embargo, la capacidad de actuación de estos sistemas depende del estado fisiológico de la semilla. En su estado seco, los mecanismos de defensa celulares frente a los ambientes adversos se basan en el mantenimiento de una reserva de antioxidantes no enzimáticos que, en el caso del girasol, está constituida principalmente por glutatión, localizado mayoritariamente en el eje embrionario. Con la rehidratación, se alcanza el contenido hídrico necesario para reactivar el metabolismo de la semilla, lo cual permite que las enzimas implicadas en los procesos de destoxificación ejerzan su actividad. En la semilla rehidratada se observa la restauración de los niveles de glutatión, generándose un ambiente reductor que favorece la reparación de los daños producidos por el envejecimiento, lo que se traduce en el mantenimiento de la viabilidad, siempre que las alteraciones metabólicas no sean excesivamente severas.

- 6.- Las semillas de girasol cv. Peredovik presentan diferente sensibilidad a las condiciones de envejecimiento artificial en función de su tamaño, lo que podría estar relacionado con la actuación de los lípidos de reserva. De acuerdo con esta idea, en las SG, los lípidos de reserva ejercerían una acción protectora frente a los agentes tóxicos, a expensas de su alteración cuantitativa o cualitativa, difícilmente reversible, lo cual podría influir en el proceso de movilización de reservas, necesario para la culminación de la etapa germinativa. Por su parte, las semillas de menor tamaño, con menor cantidad de lípidos de reserva, utilizan el glutatión como principal mecanismo antioxidante de la fracción soluble. La oxidación del glutatión se revierte durante la fase pregerminativa por la acción de la glutatión reductasa y, en consecuencia, existe una recuperación más rápida de la completa funcionalidad celular.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-SAMAD, I.M. AND PEARCE, R.S.** (1978) Leaching of ions, organic molecules, and enzymes from seeds of peanut (*Arachis hypogea*) imbibing without testas or with intact testas. *J. Exp. Bot.* **29**, 1471-1478.
- ABDUL-BAKI, A.A. AND ANDERSON, J.D.** (1973) Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.* **13**, 630-633.
- ABU-SHAKRA, S.S. AND CHING, T.M.** (1967) Mitochondrial activity in germinating new and old soybean seeds. *Crop Sci.* **7**, 115-118.
- ACKIGOZ, E. AND KNOWLES, R.P.** (1983) Long term storage of grass seeds. *Can. J. Plant Sci.* **63**, 669-674.
- AEBI, H.** (1983) Catalase. En: *Methods of enzymatic analysis. Vol. III*, (H. Bergmeyer, ed.), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273-277.
- AGRAWAL, P.K.** (1990) Seed deterioration during storage. *Proceedings of the International Congress of Plant Physiology*, (S. K. Siriha, P. V. Sane, S. C. Bhargava and P. K. Agrawal, eds.), Society for Plant Physiology and Biochemistry Publ., New Delhi, pp. 1271-1278.
- AGROSCIENCE.** (1984) The automatic seed analyzer instruction manual, model ASAC-1000, Ann Arbor, Michigan, USA, pp. 60.
- ALBRECHT, G. AND WIEDENROTH, E-M.** (1994) Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of the glutathione system. *J. Exp. Bot.* **45**, 449-455.
- ALSCHER, R.G.** (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* **77**, 457-464.
- AMICO ROXAS, U.; ZIZZO, G.V.; AGNELLO, S.; SCIORTINO, A. AND IAPICHINO, G.** (1994) Effect of seed storage and seed size on germination, emergence and bulblet production of *Amaryllis belladonna*. *Acta Hort.* **362**, 281-288.
- ANDERSON, J.D. AND ABDUL-BAKI, A.A.** (1971) Glucose metabolism of embryos and endosperms from deteriorating barley and wheat seeds. *Plant Physiol.* **48**, 270-272.

- ANDERSON, J.D. AND BAKER, J.E. (1983) Deterioration of seeds during aging. *Phytopathol.* **73**, 321-325.
- ANDERSON, J.V.; HESS, J.L. AND CHEVONE, B.I. (1990) Purification, characterization, and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine needles. *Plant Physiol.* **94**, 1402-1409.
- ANFINRUD, M.N. AND SCHNEITER, A.A. (1984) Relationship of sunflower germination and vigor tests to field performance. *Crop Sci.* **24**, 341-344.
- ARRIGONI, O.; DE GARA, L.; TOMMASI, F. AND LISO, F. (1992) Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **99**, 235-238.
- ARRIGONI, O.; DIPIERRO, S. AND BORRACCINO, G. (1981) Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett.* **125**, 242-244.
- ASADA, K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* **85**, 235-241.
- ASPINALL, D. AND PALEG, L.G. (1971) The deterioration of wheat embryo and endosperm function with age. *J. Exp. Bot.* **22**, 925-935.
- ATTUCCI, S.; CARDE, J.P.; RAYMOND, P.; SAINT-GÈS, V.; SPITERI, A. AND PRADET, A. (1991) Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol.* **95**, 390-398.
- AVER'YANOV, A.A.; LAPIKOVA, V.P. AND DJAWAKHIA, V.G. (1993) Active oxygen mediates heat-induced resistance of rice plant to blast disease. *Plant Sci.* **92**, 27-34.
- BADIANI, M.; SCHENONE, G.; PAOLACCI, A.R. AND FUMAGALLI, I. (1993) Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant Cell Physiol.* **34**, 271-279.
- BARBER, R.F. AND THOMPSON, J.E. (1980) Senescence-dependent increase in permeability of liposomes prepared from bean cotyledons. *J. Exp. Bot.* **31**, 1305-1313.
- BARLA-SZABO, G. AND DOLINKA, B. (1988) Complex stressing vigour test: a new method for wheat and maize seeds. *Seed Sci. Technol.* **16**, 63-73.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S. AND PRAKASH, H.S. (1991) Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. Technol.* **19**, 279-286.

- BASS, L.N. AND STANWOOD, P.C. (1978) Long term preservation of *Shorgum* seeds as affected by seed moisture, temperature, and atmospheric environment. *Crop Sci.* **18**, 575-577.
- BAUTISTA, G.M.; LUGAY, J.C.; CRUZ, L.J. AND JULIANO, B.O. (1964) Glutamic acid decarboxylase activity as a viability index of artificially dried and stored seeds rice. *Cereal Chem.* **41**, 188-191.
- BEAUCHAMP, C.O. AND FRIDOVICH, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
- BENNICI, A.; BITONTI, M.B.; FLORIS, C.; GENNAI, D. AND INNOCENTI, A.M. (1984) Ageing in *Triticum durum* wheat seeds: early storage in carbon dioxide prolongs longevity. *Environ. Exp. Bot.* **24**, 159-165.
- BEWLEY, J.D. AND M. BLACK (1978) The structure of seeds and their food reserves. En: *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1*, (J. D. Bewley and M. Black, eds.), Springer-Verlag, Berlín, pp. 7-37.
- BEWLEY, J.D. AND M. BLACK (1982) Viability and longevity. En: *Physiology and biochemistry of seeds. Viability, dormancy and environment control. Vol. 2*, (J. D. Bewley and M. Black, eds.), Springer-Verlag, Berlín., pp. 1-59.
- BEYER, W.F. AND FRIDOVICH, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* **161**, 559-566.
- BHATTACHARYA, S.; HAZRA, A.K. AND SEN MANDI, S. (1985) Accelerated ageing of seeds in hot water: germination characteristics of aged wheat seeds. *Seed Sci. Technol.* **13**, 683-690.
- BIELAWSKI, W. AND JOY, K.W. (1986a) Reduced and oxidized glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* **169**, 267-272.
- BIELAWSKI, W. AND JOY, K.W. (1986b) Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochemistry* **25**, 2261-2265.
- BIELSKI, B.H.J.; ALLEN, A.O. AND SCHWARZ, H.A. (1981) Mechanism of disproportionation of ascorbate radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3516-3518.
- BORRACCINO, G.; DIPIERRO, S. AND ARRIGONI, O. (1986) Purification and properties of ascorbate free-radical reductase from potato tubers. *Planta* **167**, 521-526.
- BORRACCINO, G.; DIPIERRO, S. AND ARRIGONI, O. (1989) Interaction of ascorbate free radical reductase with sulphhydryl reagents. *Phytochemistry* **28**, 715-717.

- BORRACCINO, G.; MASTROPASQUA, L.; DE LEONARDIS, S. AND DIPIERRO, S.** (1994) The role of ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avena sativa* L.) leaf segments. *J. Plant Physiol.* **144**, 161-166.
- BOURLAND, F.M.; KAISER, G. AND CABRERA, E.R.** (1988) Rapid deterioration of cotton *Gossypium hirsutum* L. seed using hot water. *Seed Sci. Technol.* **16**, 673-683.
- BOWDITCH, M.I. AND DONALDSON, R.P.** (1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxisomal membranes. *Plant Physiol.* **94**, 531-537.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M. AND INZÉ, D.** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- BROWN, J.H.; PALIYATH, G. AND THOMPSON, J.E.** (1990) Influence of acyl chain composition on the degradation of phosphatidylcholine by phospholipase D in carnation microsomal membranes. *J. Exp. Bot.* **41**, 979-986.
- BRUGGINK, H.** (1989) Evaluation and improvement of vigour test methods. I. An alternative procedure for the controlled deterioration test. *Acta Horticul.* **253**, 143-151.
- BRUGGINK, H.; KRAAK, H.L.; DIJKEMA, M.H.G.E. AND BEKENDAM, J.** (1991) Some factors influence electrolyte leakage from maize (*Zea mays* L.) kernels. *Seed Sci. Research.* **1**, 15-20.
- BRUNI, F. AND LEOPOLD, A.C.** (1991a) Hydration, protons and onset of physiological activities in maize seeds. *Physiol. Plant.* **81**, 359-366.
- BRUNI, F. AND LEOPOLD, A.C.** (1991b) Glass transitions in soybean seed. *Plant Physiol.* **96**, 660-663.
- BUHAVAROV, P. AND GANTCHEFF, T.** (1984) Influence of accelerated and natural ageing on free radical levels in soybean seeds. *Physiol. Plant.* **60**, 53-60.
- BUCKLAND, S.M.; PRICE, A.H. AND HENDRY, G.A.** (1991) The role of ascorbate in drought-treated *Cochlearia atlantica* Poved. and *Armeria maritima* (Mill.) Willd. *New Phytol.* **119**, 155-160.
- BURKE, J.J. AND HATFIELD, J.L.** (1987) Plant morphological and biochemical responses to field water deficit. III. Effect of foliage temperature on the potential activity of glutathione reductase. *Plant Physiol.* **85**, 100-103.
- BUTT, A.D. AND OHLROGGE, J.B.** (1991) Acyl carrier protein is conjugated to glutathione in spinach seed. *Plant Physiol.* **96**, 937-942.

- BUTTROSE, M.S. AND SOEFFKY, A. (1973) Ultrastructure of lipid deposits and other contents in freeze-etched coleoptile cells of ungerminated rice grains. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 357-364.
- CAKMAK, I. AND HORST, W.J. (1991) Effect of aluminium in lipid peroxidation, superoxide dismutase catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* **83**, 463-468.
- CAKMAK, I.; STRBAC, D. AND MARSCHNER, H. (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J. Exp. Bot.* **44**, 127-132.
- CARDOSO, C. (1990) Germinación de semillas deterioradas de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica, Madrid.
- CHAVAGNAT, A. (1987) Use of soft X-ray radiography for studying seed quality in horticulture. *Acta Hort.* **215**, 152-158.
- CHAVAGNAT, A. (1989a) Soft X-rays radiography: from flower to seed. *Acta Hort.* **253**, 374-375.
- CHAVAGNAT, A. (1989b) Soft X-ray radiography and study of seeds. *Acta Hort.* **253**, 270-271.
- CHEN, G. AND ASADA, K. (1992) Inactivation of ascorbate peroxide by thiols requires hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* **33**, 117-123.
- CHING, T.M. (1973) Adenosine triphosphate content and seed vigor. *Plant Physiol.* **51**, 400-402.
- CLARKE, N.A. AND JAMES, P.E. (1991) The effects of priming and accelerated ageing upon the nucleic acid content of leek seeds and their embryos. *J. Exp. Bot.* **42**, 261-268.
- CONNELL, J.P. AND MULLET, J.E. (1986) Pea chloroplast glutathione reductase: purification and characterization. *Plant Physiol.* **82**, 351-356.
- CORVILLON, E. (1977) Estudio de los inhibidores de la germinación de semillas de *Pinus pinea* en distintas condiciones de almacenamiento. *Memoria de Licenciatura*. Facultad de Farmacia, Madrid.
- CRONQUIST, A. (1981) Orden Asterales Lindley 1833. En: *An integrated system of classification of flowering plants*, (A. Cronquist, ed.), Columbia University Press, New York, pp. 1020-1028.

- CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A. AND CROWE, L.M. (1989) Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* **86**, 520-523.
- DADLANI, M. AND AGRAWAL, P.K. (1983) Factors influencing leaching of sugars and electrolytes from carrot and okra seeds. *Scientia Hort.* **19**, 39-44.
- DALLING, M.J. AND P.L. BHALLA (1984) Endosperm nitrogen and phosphorus mobilization. En: *Seed Physiology. Vol 2. Germination and reserve mobilization*, (D. R. Murray, ed.), Academic Press, London, pp. 182-199.
- DALTON, D.A.; HANUS, F.J.; RUSSELL, S.A. AND EVANS, H.J. (1987) Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.* **83**, 789-794.
- DALTON, D.A.; LAGENBERG, L. AND ROBBINS, M. (1992) Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 281-286.
- DALTON, D.A.; LAGENBERG, L. AND TRENEMAN, N.C. (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol. Plant.* **87**, 365-370.
- DALTON, D.A.; POST, C.J. AND LAGENBERG, L. (1991) Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant Physiol.* **96**, 812-818.
- DELOUCHE, J.C. (1965) An accelerated technique for predicting relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. *Agronomy Abstracts, American Society of Agronomist Meeting*, pp. 40.
- DE GARA, L.; PACIOLLA, C.; LISO, R.; STEFANI, A. AND ARRIGONI, O. (1991) Correlation between ascorbate peroxidase activity and some anomalies of seedlings from aged caryopses of *Dasypyrum villosum* (L.) Borb. *J. Plant Physiol.* **137**, 697-700.
- DE PAULA, M. (1991) Evaluación del deterioro de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Memoria de Licenciatura*. Facultad de Farmacia, Madrid.
- DE PAULA, M.; M. DARDER; M. TORRES Y C.J. MARTÍNEZ-HONDUVILLA (1991a) Evaluación por ensayos bioquímicos del vigor de semillas deterioradas de girasol. *IX Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal*, Madrid, pp. 418.

- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M. Y MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1991b) Evaluación del deterioro de semillas de girasol almacenadas a altas temperaturas. *Actas de Horticultura* **8**, 325-329.
- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M. AND MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1992) Electrolyte leakage from sunflower seeds deteriorated by high temperatures. *Physiol. Plant* **85**, Part 2, 564.
- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M. Y MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1993) Evaluación de la actividad malato deshidrogenasa en semillas de girasol deterioradas por almacenamiento a altas temperaturas. *Rev. Esp. Fisiol.* **49**, 225-230.
- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M. AND MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1994) Electrical conductivity changes in deteriorated sunflower seeds. *Acta Hort.* **362**, 273-279.
- DE PAULA, M.; M. DARDER; M. TORRES; C.J. MARTÍNEZ-HONDUVILLA AND FEJOO, B. (1991c) Glutathione reductase activity in sunflower seeds deteriorated by heat treatment. *IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress*, Povoá de Varzim, pp. 15.
- DE VOS, C.H.R. (1994) Thiol oxidation in ageing tomato seeds. En: *Technological advances in variety and seed research*, (W. J. van der Burg and R. J. Bino, eds.), Wageningen Academic Press, Wageningen, pp. 8.
- DELL'AQUILLA, A. (1987) Mean germination time as a monitor of seed ageing. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 761-768.
- DELL'AQUILLA, A.; DE LEO, P.; CALDIROLI, E. AND ZOCCHI, G. (1978) Damages at translational level in aged wheat embryos. *Plant Sci. Lett.* **12**, 217-226.
- DESWAL, D.P. AND SHEORAN, I.S. (1993) A simple method for seed leakage measurement: applicable to single seeds of any size. *Seed Sci. Technol.* **21**, 179-185.
- DHINDSA, R.S. (1982) Inhibition of protein synthesis by products of lipid peroxidation. *Phytochemistry* **21**, 309-313.
- DHINDSA, R.S. (1991) Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* **95**, 648-651.
- DHINDSA, R.S. AND MATOWE, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* **32**, 79-91.

- DHINDSA, R.S.; PLUMB-DHINDSA, P. AND THORPE, T.A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* **32**, 93-101.
- DIPIERRO, S. AND BORRACCINO, G. (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry* **30**, 427-429.
- DREYER, M. AND VAN DE VENTER, H.A. (1992) Differential effect of temperature on mitochondrial activity in shoots from freshly harvested and moderately aged kernels of maize (*Zea mays* L.). *Plant Growth Regulation* **11**, 267-271.
- DROTAR, A.; PHELPS, P. AND FALL, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**, 35-40.
- DRUMM-HERREL, H.; GERHÄUBER, U. AND MOHR, H. (1989) Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta* **178**, 103-109.
- DUKE, S.H. AND KAKEFUDA, G. (1981) Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. *Plant Physiol.* **67**, 449-456.
- DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G. AND HARVEY, T.M. (1983) Differential leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds. *Plant Physiol.* **72**, 919-924.
- DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G.; HENSON, C.A.; LOEFFLER, N.L. AND VAN HULLE, N.M. (1986) Role of the testa epidermis in the leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds and its implications for seedling survival. *Physiol. Plant.* **68**, 625-631.
- EDWARDS, C.J. AND HARTWIG, E.E. (1971) Effect of seed size upon rate of germination in soybeans. *Agron. J.* **63**, 429-430.
- EDWARDS, E.A.; ENARD, C.; CREISSEN, G.P. AND MULLINEAUX, P.M. (1994) Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* **192**, 137-143.
- ELIA, M.R.; BORRACCINO, G. AND DIPIERRO, S. (1992) Soluble ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Sci.* **85**, 17-21.
- ELLIS, R.H. AND ROBERTS, E.H. (1981) The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. Technol.* **9**, 373-409.
- ELSTNER, E.F. (1987) Metabolism of activated oxygen species. En: *The biochemistry of Plants. Vol. 11*, (D. D. Davies, ed.), Academic Press, London, pp. 253-313.

- ESTERBAUER, H. AND GRILL, D. (1978) Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol.* **61**, 119-121.
- FAHEY, R.C.; DI STEFANO, D.L.; MEIER, G.P. AND BRYAN, R.N. (1980) Role of the hydration state and thiol-disulphide status in the control of thermal stability and protein synthesis in wheat embryo. *Plant Physiol.* **65**, 1062-1066.
- FERNANDEZ GARCIA DE CASTRO, M. AND MARTINEZ-HONDUVILLA, C.J. (1982) Biochemical changes in *Pinus pinea* seeds during storing. *Rev. Esp. Fisiol.* **38**, 13-20.
- FERNANDEZ GARCIA DE CASTRO, M. AND MARTINEZ-HONDUVILLA, C.J. (1984) Ultrastructural changes in naturally aged *Pinus pinea* seeds. *Physiol. Plant.* **62**, 581-588.
- FINCKH, B.F AND KUNERT, K.J. (1985) Vitamins C and E: an antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agr. Food Chem.* **33**, 574-577.
- FONTAINE, O.; HUAULT, C.; PAVIS, N. AND BILLARD, J.P. (1994) Dormancy breakage of *Hordeum vulgare* seeds: effects of hydrogen peroxide and scarification on glutathione level and glutathione reductase activity. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 677-683.
- FOSTER, J.G. AND HESS, J.L. (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiol.* **66**, 482-487.
- FOSTER, J.G. AND HESS, J.L. (1982) Oxygen effects on maize leaf superoxide dismutase and glutathione reductase. *Phytochemistry* **21**, 1527-1532.
- FOYER, C. AND HALLIWELL, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
- FOYER, C. AND HALLIWELL, B. (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**, 1347-1350.
- FOYER, C.; LELANDAIS, M.; GALAP, C. AND KUNERT, K.J. (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* **97**, 863-872.

- FRANCIS, A. AND COOLBEAR, P. (1984) Changes in membrane phospholipid composition of tomato seeds accompanying loss of germination capacity caused by controlled deterioration. *J. Exp. Bot.* **35**, 1764-1770.
- FRANCIS, A. AND COOLBEAR, P. (1988) Changes in the fatty acid content of the polar lipid fraction of tomato seeds induced by ageing and for subsequent low temperature pre-sowing treatment. *Seed Sci. Technol.* **16**, 87-95.
- FUERST, E.P.; IRZYK, G.P. AND MILLER, K.D. (1993) Partial characterization of glutathione-S-transferase isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize. *Plant Physiol.* **102**, 795-802.
- FUJIMOTO, H.; NEFF, W.E. AND FRANKEL, E.N. (1984) The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals, and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 100-107.
- GAMBLE, P.E. AND BURKE, J.J. (1984) Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiol.* **76**, 615-621.
- GANDER, J.E. (1982) Polyhydroxi acids: relation to hexose phosphate metabolism. En: *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. **13A**. (F. A. Loewus and W. Tanner, eds.), Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg, pp. 77-95.
- GAY, C.; CORBINEAU, F. AND CÔME, D. (1991) Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environ. Exp. Bot.* **31**, 193-200.
- GELMOND, H. (1972) Relationship between seed size and seedling vigour in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* **37**, 797-802.
- GHOSH, B.J. AND CHOUDHURI, M.A (1984) Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthetic capacity with loss of viability of rice embryos (*Oryza sativa*). *Seed Sci. Technol.* **12**, 669-677.
- GIANINETTI, A.; CANTONI, M.; LORENZONI, C.; SALAMINI, F. AND MAROCCO, A. (1993) Altered levels of antioxidant enzymes associated with two mutations in tomato. *Physiol. Plant.* **89**, 157-164.
- GIANNOPOLITIS, C.N. AND RIES, S.K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**, 309-314.
- GIDROL, X.; NOUBHANI, A.; MOCQUOT, B.; FOURNIER, A. AND PRADET, A. (1988) Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 281-288.

- GIDROL, X.; NOUBHANI, A. AND PRADET, A.** (1990) Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. II. RNA populations and protein synthesis. *Physiol. Plant.* **80**, 598-604.
- GIDROL, X.; SERGHINI, H.; NOUBHANI, A.; MOCQUOT, B. AND MAZLIAK, P.** (1989) Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiol. Plant.* **76**, 591-597.
- GILHAM, D.J. AND DODGE, A.D.** (1986) Hydrogen-peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. *Planta* **167**, 246-251.
- GILHAM, D.J. AND DODGE, A.D.** (1987) Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: seasonal variations. *Plant Sci.* **50**, 105-109.
- GIVELBERG, A.; HOROWITZ, M. AND POLJAKOFF-MAYBER, A.** (1984) Solute leakage from *Solanum nigrum* L. seeds exposed to high temperatures during imbibition. *J. Exp. Bot.* **35**, 1754-1763.
- GONZALEZ-JULIA, B.; MARTINEZ-HONDUVILLA, C.J. Y FERNANDEZ GARCIA DE CASTRO, M.** (1983) Cambios en proteínas y proteasas durante el envejecimiento artificial en semillas de *Pinus pinea*. *Rev. Esp. Fisiol.* **38**, 307-314.
- GORECKI, R.J. AND HARMAN, G.E.** (1987) Effects of antioxidants on viability and vigour of ageing pea seeds. *Seed Sci. Technol.* **15**, 109-117.
- GRIFFITH, O.W.** (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
- GRILLI, I.; ANGUILLES, C.; MELETTI, P.; FLORIS, C. AND GALLESCHI, L.** (1982) Influence of age and storage temperature on RNA metabolism in durum wheat seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* **107**, 211-221.
- HAILSTONES, M.D. AND SMITH, M.T.** (1988) Lipid peroxidation in relation to declining vigour in seeds of soya (*Glycine max.*L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Plant Physiol.* **133**, 452-456.
- HALDER, S. AND GUPTA, K.** (1980) Effect of storage of sunflower seeds in high and low relative humidity on solute leaching and internal biochemical changes. *Seed Sci. Technol.* **8**, 317-321.
- HALDER, S. AND GUPTA, K.** (1982) On the mechanism of sunflower seed deterioration under low and high RH. *Seed Sci. Technol.* **10**, 267-276.

- HALDER, S.; KOLE, S. AND GUPTA, K. (1983) On the mechanism of sunflower seed deterioration under two different types of accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.* **11**, 331-339.
- HALLOIN, J.M. (1975) Solute loss from deteriorated cotton seed; relationship between deterioration, seed moisture and solute loss. *Crop Sci.* **15**, 11-15.
- HALLOIN, J.M. (1986) Microorganism and seed deterioration. En: *Physiology of seed deterioration*, (M. B. Jr. McDonald and C. J. Nelson, eds.), CSSA Spec. Publ. N° 11, Madison, Wisconsin, pp. 89-99.
- HALMER, P. AND BEWLEY, J.D. (1984) A physiological perspective on seed vigour testing. *Seed Sci. Technol.* **12**, 561-575.
- HAMPTON, J.G. AND COOLBEAR, P. (1990) Potential versus actual seed performance. Can vigour testing provide an answer? *Seed Sci. Technol.* **18**, 215-228.
- HARMAN, G.E. AND GRANETT, A.L. (1972) Deterioration of stored pea seed: changes in germination, membrane deterioration and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from ageing. *Physiol. Plant Pathol.* **2**, 271-278.
- HARMAN, G.E. AND MATTICK, L.R. (1976) Association of lipid oxidation with seed ageing and dead. *Nature (Lond.)* **260**, 323-324.
- HARRINGTON, J.F. (1972) Seed storage and longevity. En: *Seed Biology. Vol III*, (T. T. Kozłowski, ed.), Academic Press, London, pp. 145-245.
- HASSAN, H.M. AND J.G. SCANDALIOS (1990) Superoxide dismutases in aerobic organisms. En: *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, (R. G. Alscher and J. R. Cumming, eds.), Wiley-Liss, New York, pp. 175-199.
- HAUSLADEN, A.; MADAMANCHI, N.R.; FELLOWS, S.; ALSCHER, R.G. AND AMUNDSON, R.G. (1990) Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytol.* **115**, 447-458.
- HELM, K.W.; PETERSEN, N.S. AND ABERNETHY, R.H. (1989) Heat shock response of germinating embryos of wheat. Effects of imbibition time and seed vigor. *Plant Physiol.* **90**, 598-605.
- HELMER, J.D. (1962) Evaluation of some methods of differentiating among vigor levels of seeds of crimson and red clover. *Ph.D. Thesis*. Mississippi University, Mississippi.

- HEPBURN, H.A.; GOODMAN, B.A.; MCPHAIL, D.B.; MATTHEWS, S. AND POWELL, A. (1986) An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *J. Exp. Bot.* **37**, 1675-1684.
- HEPBURN, H.A.; POWELL, A. AND MATTHEWS, S. (1984) Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in germination testing of peas and soyabeans. *Seed Sci. Technol.* **12**, 403-413.
- HILDEBRAND, D.F. (1989) Lipoxygenases. *Physiol. Plant.* **76**, 249-253.
- HILL, H.J.; TAYLOR, A.G. AND HUANG, X.L. (1988) Seed viability determinations in cabbage utilizing sinapine leakage and electrical conductivity measurements. *J. Exp. Bot.* **39**, 1439-1447.
- HOEKSTRA, F.A.; J.H. CROWE AND L.M. CROWE (1989) Membrane behaviour in drought and its physiological significance. En: *Recent advances in the development and germination of seeds*, (R. B. Taylorson, ed.), Plenum Press, New York , pp. 71-88.
- HOPPER, N.W. AND HINTON, H.R. (1987) Electrical conductivity as a measure of planting seed quality in cotton. *Agron. J.* **79**, 147-152.
- HOSSAIN, M.A. AND ASADA, K. (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* **260**, 12920-12926.
- HOY, D.J. AND GAMBLE, P.E. (1985) The effects of seed size and seed density on germination and vigor in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Can. J. Plant Sci.* **65**, 1-8.
- HUANG, Y.G. (1989) Evaluating lodgepole pine and white spruce seed vigour by seedling uniformity. *Seed Sci. Technol.* **17**, 543-553.
- IDA, S. AND MORITA, Y. (1971) Enzymatic properties and physical and chemical characterization of glutathione reductase from rice embryos. *Agr. Biol. Chem.* **35**, 1550-1557.
- ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION) (1985) International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* **13**, 299-513.
- JAHNKE, L.S.; HULL, M.R. AND LONG, S.P. (1991) Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ.* **14**, 97-104.

- JAMES, E. (1968) Limitation of glutamic acid decarboxylase activity for estimating viability in beans. *Crop Sci.* **9**, 403-404.
- KALPANA, R. AND MADHAVA RAO, K.V. (1994) Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. *Seed Sci. Technol.* **22**, 253-260.
- KAN, B.; LONDON, I.M. AND LEVIN, D.H. (1988) Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. *J. Biol. Chem.* **263**, 15652-15656.
- KELLY, K.M.; VAN STADEN, J. AND BELL, W.E. (1992) Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation* **11**, 201-209.
- KHARLUKHI, L. AND AGRAWAL, P.K. (1984) Evidence of participation of pentose phosphate pathway during seed deterioration and storage. *Ind. J. Exp. Bot.* **22**, 612-614.
- KLAPHECK, S.; ZIMMER, I. AND COSSE, H. (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus comunis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **31**, 1005-1013.
- KNOX, J.P. AND DODGE, A.D. (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**, 889-896.
- KOOSTRA, P.T. AND HARRINGTON, J.F. (1969) Biochemical effects of age on membrane lipids of *Cucumis sativus* L. seed. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* **34**, 329-340.
- KOSHIBA, T. (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol.* **34**, 713-721.
- KRANNER, I. AND GRILL, D. (1993) Content of low-molecular-thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiol. Plant.* **88**, 557-562.
- KUMAR, G.N.M. AND KNOWLES, N.R. (1993) Changes in lipid peroxidation and lysoytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* **102**, 115-124.
- KURODA, H.; SAGISAKA, S.; ASADA, M. AND CHIBA, K. (1991) Peroxide-scavenging systems during cold acclimation of apple callus in culture. *Plant Cell Physiol.* **32**, 635-641.
- LAGÔA, A.M. AND PEREIRA, M.F. (1987) The role of the caruncle in the germination of seeds of *Ricinus comunis*. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 125-128.

- LARSON, R.A. (1988) The antioxidants in higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
- LEOPOLD, A.C. (1980) Temperature effects on soybean imbibition and leakage. *Plant Physiol.* **65**, 1096-1098.
- LEOPOLD, A.C. AND MUSGRAVE, M.E. (1980) Respiratory pathways in aged soybean seeds. *Physiol. Plant.* **49**, 49-54.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M. AND HENDRY, G.A.F. (1990) The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* **116**, 573-580.
- LEVITT, J. (1980) Responses of plants to environmental stress. Chilling, freezing and high temperature stress, Academic Press, New York, pp. 3-497.
- LIEBLER, D.C.; KLING, D.S. AND REED, D.J. (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -tocopherol. Control of α -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.* **261**, 12114-12119.
- LIKHATCHEV, B.S.; ZELENSKY, G.V.; KIASHKO, Y.G. AND SCHEVCHENKO, Z.N. (1984) Modelling of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* **12**, 385-393.
- MADAMANCHI, N.R.; ANDERSON, J.V.; ALSCHER, R.G.; CRAMER, C.L. AND HESS, J.L. (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiol.* **100**, 138-145.
- MARTINEZ VASSALLO, L. Y BURGOS RODENAS, A. (1986) Manual de ensayos al tetrazolio, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, pp. 8-99.
- MARTINEZ-HONDUVILLA, C.J. AND SANTOS-RUIZ, A. (1975) Rapid biochemical test for seed germinability. *Rev. Esp. Fisiol.* **31**, 289-292.
- MASON, S.C.; VORST, J.J.; HANKINS, B.J. AND HOLT, D.A. (1982) Standard, cold, and tetrazolium germination tests as estimators of field emergence of mechanically damaged soybean seed. *Agron. J.* **74**, 546-550.
- MATTHEWS, S. (1980) Controlled deterioration: a new vigour test for crop seeds. En: *Seed production*, (P. Hebblethwaite, ed.), Butterworths Ltd., London, pp. 647-660.
- MATTHEWS, S. (1994) Ageing tests as a basis for evaluating seed quality. *Acta Hort.* **362**, 251-261.

- MATTHEWS, S. AND BRADNOCK, W.T. (1968) Relationship between seed exudation and field emergence in peas and French beans. *Hortic. Res.* **8**, 89-93.
- MATTHEWS, S. AND ROGERSON, N.E. (1976) The influence of embryo condition on the leaching of solutes from pea seeds. *J. Exp. Bot.* **27**, 961-968.
- MAY, M.J. AND LEAVER, C.J. (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* **103**, 621-627.
- MAYER, A.M. AND A. POLJAKOFF-MAYBER (1989) The development of the seed and the structure of the seeds and seedlings. En: *The germination of seeds*, (A. M. Mayer and A. Poljakoff-Mayber, eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 1-22.
- MCCORD, J.M. AND FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
- MCDONALD, M.B. AND WILSON, D.O. (1979) An assessment of the standardization and ability of the ASA-610 to rapidly predict potential soybean germination. *J. Seed Technol.* **4**, 1-11.
- MCDONELL, E.M.; PULFORD, F.G.; MIRBAHAR, R.B.; TOMOS, A.D. AND LAIDMAN, D.L. (1982) Membrane lipids and phosphatidyl choline turnover in embryos from germinating low and high vigour wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Exp. Bot.* **33**, 631-642.
- MCKERSIE, B.D. AND STINSON, R.H. (1980) Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiol.* **66**, 316-320.
- MCKERSIE, B.D.; TOMES, D.T. AND YAMAMOTO, S. (1981) Effect of seed size on germination, seedling vigor, electrolyte leakage, and establishment of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Can. J. Plant Sci.* **61**, 337-343.
- MEHLHORN, H. (1990) Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant Cell Environ.* **13**, 971-976.
- METCALF, C.R. AND CHALK, L. (1965) Anatomy of dicotyledons. Oxford Press, Oxford, pp. 782-804.
- MINOTTI, G. AND AUST, S.D. (1987) The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **262**, 1098-1104.

- MISHRA, N.P.; MISHRA, R.K. AND SINGHAL, G.S. (1993) Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* **102**, 903-910.
- MONK, L.S.; FAGERSTEDT, K.V. AND CRAWFORD, R.M.M. (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* **76**, 456-459.
- MOROHASHI, Y. (1986) Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: a survey. *Physiol. Plant.* **66**, 653-658.
- MUKHTAR, N.O. AND LAIDMAN, D.L. (1982) Mineral ions content, solute release and aspects of ion transport in embryos of germinating low and high vigour wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.* **33**, 619-630.
- MULLET, J.H. AND CONSIDINE, J.A. (1980) Potassium release and uptake in germinating legume seeds in relation to seed condition and germination environment. *J. Exp. Bot.* **31**, 151-162.
- MURPHY, J.B. AND NOLAND, T.L. (1982) Temperature effects on seed imbibition and leakage mediated by viscosity and membranes. *Plant Physiol.* **69**, 428-431.
- NAKAYAMA, N.; SUGIMOTO, I. AND ASAHI, T. (1980) Presence in dry cotyledons of soluble succinate dehydrogenase that is assembled into the mitochondrial inner membrane during seed imbibition. *Plant Physiol.* **65**, 229-233.
- NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; IZZO, R. AND PINZINO, C. (1992) Degradation of membrane lipid components and antioxidant levels in *Hordeum vulgare* exposed to long-term fumigation with SO₂. *Physiol. Plant.* **84**, 73-79.
- NIETO-SOTELO, J. AND HO, T-H.D. (1986) Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiol.* **82**, 1031-1035.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N. AND YAGI, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- OHTA, H.; SHIDA, K.; PENG, Y.L.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J.; SIBARA, S. AND MORITA, Y. (1990) The occurrence of lipid hydroperoxide-descomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol.* **31**, 1117-1122.
- OLIVEIRA, M.A.; MATTHEWS, S. AND POWELL, A. (1984) The role of split seed coats in determining seed vigour in commercial seed lots of soybean, measured by electrical conductivity. *Seed Sci. Technol.* **12**, 659-668.

- OSBORNE, D.J. (1980) Senescence in seeds. En: *Senescence in plants*, (K. V. Thimann, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 14-38.
- OVERAA, P. (1984) Distinguishing between dormant and inviable seeds. En: *Seed management techniques for genebanks*, (J. B. Dickie, S. Linington and J. T. Williams, eds.), International Board for Plant Genetic Resources, Roma, pp. 182-196.
- PANDEY, D.K. (1989) Short duration accelerated ageing of French bean seeds in hot water. *Seed Sci. Technol.* **17**, 106-114.
- PARAMESWARAN, M.; N. SUBHASH; Y.M. SHUKLA AND S. CHAKRABORTY (1990) Relationship between groundnut seed leachate characteristics and its germination potential. En: *Proceedings of the International Congress of Plant Physiology*, (S.K. Siriha, P.V. Sane, S.C. Bhargava and P.K. Agrawal, eds.), Society for Plant Physiology and Biochemistry Publ., New Delhi, pp. 1302-1305.
- PARRISH, D.J. AND LEOPOLD, A.C. (1977) Transient changes during soybean imbibition. *Plant Physiol.* **56**, 1111-1115.
- PARRISH, D.J. AND LEOPOLD, A.C. (1978) On the mechanism of ageing in soybean seeds. *Plant Physiol.* **61**, 365-368.
- PASTORI, G.M. AND TRIPPI, V.S. (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.* **33**, 957-961.
- PAULS, K.P. AND THOMPSON, J.E. (1984) Evidence of the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* **75**, 1152-1157.
- PEARCE, R.S. AND ABDEL-SAMAD, I.M. (1980) Change in fatty acid content of polar lipids during ageing of peanut (*Arachis hypogea*). *J. Exp. Bot.* **31**, 1238-1290.
- PERL, M. (1980) An ATP-synthesizing system in seeds. *Planta* **149**, 1-6.
- PERL, M. AND FEDER, Z. (1983) Cotton seed quality prediction with the Automatic Seed Analyser. *Seed Sci. Technol.* **11**, 273-280.
- PERL, M.; LURIA, I. AND GELMOND, H. (1978) Biochemical changes in shorgum seeds affected by accelerated ageing. *J. Exp. Bot.* **29**, 497-509.
- PERRY, D.A. (1977) A vigour test for seeds of barley (*Hordeum vulgare*) based on measurement of plumule growth. *Seed Sci. Technol.* **5**, 709-719.

- PEREZ OTAOLA, M.** (1992) Actividad leucín aminopeptidasa durante la germinación y el envejecimiento de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Memoria de Licenciatura*. Facultad de Farmacia, Madrid.
- PEREZ OTAOLA, M.; DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M.; FRUTOS, G. AND MARTINEZ-HONDUVILLA, C.J.** (1994) Ascorbate peroxidase activity in cotyledons from germinating sunflower seeds. *Biol. Plant.* **36**, S117.
- POWELL, A.** (1986) Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. *J. Seed Technol.* **10**, 81-100.
- POWELL, A. & MATTHEWS, S.** (1994) The role of seed size and the controlled deterioration test in determining seed quality in brassicas. *Acta Hort.* **362**, 263-272.
- POWELL, A.; DON, R.; HAIGH, P.; PHILIPS, G.; TONKIN, J.H.B. AND WHEATON, O.T.** (1984) Assesment of the repeatability of the controlled deterioration vigour tests both within and between laboratories. *Seed Sci. Technol.* **12**, 412-427.
- POWELL, A. AND HARMAN, G.E.** (1985) Absence of a consistent association of changes in membrane lipids with ageing in pea seeds. *Seed Sci. Technol.* **13**, 659-667.
- POWELL, A. AND MATTHEWS, S.** (1977) Deteriorative changes in pea seeds (*Pisum sativum* L.) stored in humid or dry conditions. *J. Exp. Bot.* **28**, 225-234.
- POWELL, A. AND MATTHEWS, S.** (1978) The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* **29**, 1215-1229.
- POWELL, A. AND MATTHEWS, S.** (1979) The influence of testa condition on the imbibition and vigour of pea seeds. *J. Exp. Bot.* **30**, 193-197.
- POWELL, A. AND MATTHEWS, S.** (1981) A physical explanation for solute leakage from dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* **32**, 1045-1050.
- POWELL, A.; OLIVEIRA, M.A. AND MATTHEWS, S.** (1986) The role of imbibition damage in determining the vigour of white and coloured seed lots of dwarf French beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* **37**, 716-722.
- PRADET, A.** (1982) Oxidative phosphorylation in seeds during the initial phases of germination. En: *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*, (A. A. Khan, ed.), Elsevier Biomedical Press, New York, USA, pp. 347-369.
- PRICE, A.; LUCAS, P.W. AND LEA, P.J.** (1990) Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: a leaf section approach. *J. Exp. Bot.* **41**, 1309-1317.

- PRIESTLEY, D.A.** (1986) Seed ageing. Implications for seed storage and persistence in the soil, Cornell University Press, Ithaca, USA, pp. 5-303.
- PRIESTLEY, D.A. AND LEOPOLD, A.C.** (1979) Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiol.* **63**, 726-729.
- PRIESTLEY, D.A. AND LEOPOLD, A.C.** (1983) Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. *Physiol. Plant.* **59**, 467-470.
- PRIESTLEY, D.A.; MCBRIDE, M.B. AND LEOPOLD, A.C.** (1980) Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiol.* **66**, 715-719.
- PRIESTLEY, D.A.; WERNER, B.G. AND LEOPOLD, A.C.** (1985a) The susceptibility of soybean lipids to artificially enhanced atmospheric oxidation. *J. Exp. Bot.* **36**, 1653-1659.
- PRIESTLEY, D.A.; WERNER, B.G.; LEOPOLD, A.C. AND MCBRIDE, M.B.** (1985b) Organic free radical levels in seeds and pollen. *Physiol. Plant.* **64**, 88-94.
- PUKACKA, S.** (1991) Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of *Acer platanoides*. *Physiol. Plant.* **82**, 306-310.
- PUKACKA, S. AND KUIPER, P.J.C.** (1988) Phospholipid composition and fatty acid peroxidation during ageing of *Acer platanoides* seeds. *Physiol. Plant.* **72**, 89-93.
- PUNTARULO, S.; BECONI, M.T.; SANCHEZ, R.A. AND BOVERIS, A.** (1988) Oxidative activities in soybean embryonic axes during germination. *Plant Sci.* **52**, 33-39.
- PUNTARULO, S. AND BOVERIS, A.** (1990) Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Sci.* **68**, 27-32.
- PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SÁNCHEZ, R.A. AND BOVERIS, A.** (1991) Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 277-283.
- QUEIROGA, V.P.** (1989) Predicción de la capacidad germinativa en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) mediante test de conductividad eléctrica. *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica, Madrid.
- RAM, C. AND WIESNER, L.E.** (1988) Glutamic acid decarboxylase (GADA) as indicator of field performance of wheat. *Seed Sci. Technol.* **16**, 11-18.

- RANIERI, A.; LENCIONI, L.; SCHENONE, G. AND SOLDATINI, G.F.** (1993) Glutathione-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open-top chambers. *J. Plant Physiol.* **142**, 286-290.
- RAO, R.S.N.** (1976) Sunflower seed viability under different storage conditions. *Seed Abstracts* **1**, 9.
- RAUSER, W.E.** (1990) Phytochelatins. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 61-86.
- RAUSER, W.E.; SCHUPP, R. AND RENNENBERG, H.** (1991) Cysteine, Γ -glutamylcysteine, and glutathione levels in maize seedlings. Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants. *Physiol. Plant.* **97**, 128-138.
- RAYMOND, P.; SPITERI, A.; DIEUAIDE, M.; GERHARDT, B. AND PRADET, A.** (1992) Peroxisomal β -oxidation of fatty acids citrate formation by a particulate fraction from early germinating sunflower seeds. *Plant Physiol. Biochem.* **30**, 153-161.
- RENNENBERG, H.** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**, 2771-2781.
- RETAMAL, N.; LOPEZ-VENCES, M. AND DURAN, J.M.** (1990) Effect of gamma-irradiation on germination and leakage of electrolytes from peanut (*Arachis hypogea*) seeds. *Environ. Exp. Bot.* **30**, 1-7.
- RIVICKER, C.M.** (1981) Long term subfreezing storage of forage crop seeds. *Crop Sci.* **23**, 229-231.
- ROBERTS, E.H.** (1983) Loss of seed viability during storage. *Adv. Res. Technol. Seeds* **4**, 9-34.
- ROBERTS, E.H. AND ABDALLA, F.H.** (1968) The influence of temperature, moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. *Ann. Bot.* **32**, 97-117.
- ROBINSON, N.J. AND JACKSON, P.J.** (1986) "Metallothionein-like" metal complexes in angiosperms; their structure and function. *Physiol. Plant.* **67**, 499-506.
- ROOS, E.** (1980) Histological, biochemical and genetics changes in seeds quality during storage. *Hort. Sci.* **15**, 781-784.
- ROSTOVTSEV, S.A. AND LYUBICH, E.S.** (1978) Determination of the viability of tree and shrub seeds by staining with indigo carmine in the URSS. *Seed Sci. Technol.* **6**, 869-875.

- ROUSER, G.; FLEISCHER, S. AND YAMAMOTO, A. (1969) Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496.
- RUDRAPAL, D. AND BASU, R.N. (1982) Lipid peroxidation and membrane damage in deteriorating wheat and mustard seeds. *Ind. J. Exp. Bot.* **20**, 465-470.
- RUPLEY, J.A.; GRATTON, E. AND CARERI, G. (1983) Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 18-22.
- SABATER, F. (1991) Radicales libres y especies afines. *Bol. Soc. Esp. Fis. Veg.* **14**, 3-13.
- SALAMA, A.M. AND PEARCE, R.S. (1993) Ageing of cucumber and onion seeds: phospholipase D, lipoxygenase activity and changes in phospholipid content. *J. Exp. Bot.* **44**, 1253-1265.
- SANDALIO, L.M. AND DEL RÍO, L.A. (1991) Especies de oxígeno activado en situaciones de estrés en plantas. *Bol. Soc. Esp. Fis. Veg.* **15**, 3-10.
- SANKARA-RAO, D.S. AND ACHAYA, K.T. (1969) Occurrence and possible protective function of carbon dioxide in oil seeds. *J. Sci. Food Agric.* **20**, 531-534.
- SAXENA, O.P. AND MAHESHWARI, D.C. (1980) Biochemical aspects of viability in soybean. *Acta Bot. Ind.* **8**, 229-234.
- SAXENA, O.P.; PAKEERAI AH, T. AND LAKSHMI, P. (1985) Studies on accelerated ageing in *Sesamun*. *Ind. J. Plant Physiol.* **28**, 35-42.
- SCANDALIOS, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **101**, 7-12.
- SCHMIDT, A. AND JÄGER, K. (1992) Open questions about sulfur metabolism in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43**, 325-349.
- SCHMIDT, A. AND KUNERT, K.J. (1986) Lipid peroxidation in higher plants. The role of glutathione reductase. *Plant Physiol.* **82**, 700-702.
- SCHOETTLE, A.W. AND LEOPOLD, A.C. (1984) Solute leakage from artificially aged soybean seeds after imbibition. *Crop Sci.* **24**, 835-838.
- SCOTT, S.J.; JONES, R.A. AND WILLIAMS, W.A. (1984) Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Sci.* **24**, 1192-1199.

- SEEL, W.E.; HENDRY, G.A.F. AND LEE, J.A. (1992) Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and anti-oxidants in mosses. *J. Exp. Bot.* **43**, 1031-1037.
- SEEWALDT, V.; PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C.; FEIGENSON, G.W. AND GOODSAY-ZALDUONDO, F. (1981) Membrane organization in soybean seeds during hydration. *Planta* **152**, 19-23.
- SENARATNA, T.; GUSSE, J.F. AND MCKERSIE, B.D. (1988) Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean seed axes. *Physiol. Plant.* **73**, 85-91.
- SENARATNA, T. AND MCKERSIE, B.D. (1983) Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. *Plant Physiol.* **72**, 911-914.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. AND BOROCHOV, A. (1987) Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. *J. Exp. Bot.* **38**, 2005-2014.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. AND STINSON, R.H. (1985) Antioxidant levels of germinating soybean seeds axes in relation to free radical and dehydration tolerance. *Plant Physiol.* **78**, 168-171.
- SGHERRI, C.L.M.; LOGGINI, B.; PULIGA, S. AND NAVARI-IZZO, F. (1994) Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to dessication and rehydration. *Phytochemistry* **35**, 561-565.
- SHIINITZKY, M. AND INBAR, M. (1976) Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 133-149.
- SIMON, E.W. AND RAJA HARUN, R.M. (1972) Leakage during seed imbibition. *J. Exp. Bot.* **77**, 1076-1085.
- SIMON, E.W. AND WIEBE, H.H. (1975) Leakage during imbibition, resistance to damage at low temperature and the water content of peas. *New Phytol.* **74**, 407-411.
- SIVASUBRAMANIAN, S. AND RAMAKRISHNAN, V. (1974) Effect of seed size on seedling vigour in groundnut. *Seed Sci. Technol.* **2**, 435-441.
- SMITH, C.A.D. AND BRAY, C.M. (1982) Intracellular levels of polyadenylated RNA and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta* **156**, 413-420.
- SMITH, C.A.D. AND BRAY, C.M. (1984) Polyadenylated RNA levels and macromolecular synthesis during loss of seed vigour. *Plant Sci. Lett.* **34**, 335-343.

- SMITH, I.K. (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* **79**, 1044-1047.
- SMITH, I.K.; KENDALL, A.C.; KEYS, A.J.; TURNER, J.C. AND LEA, P.J. (1985) The regulation of biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.* **41**, 12-17.
- SMITH, I.K.; A. POLLE AND H. RENNENBERG (1990) Glutathione. En: *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, (R. G. Alscher and J. R. Cumming, eds.), Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 201-215.
- SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L. AND THORNE, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **175**, 408-413.
- SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L. AND THORNE, C.A. (1989) Properties and function of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.* **77**, 449-456.
- SMITH, M.T. (1991) Studies of the anhydrous fixation of dry seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *New Phytol.* **119**, 575-584.
- SMITH, S.E. AND DOBRENZ, A.K. (1987) Seed age and salt tolerance at germination in alfalfa. *Crop Sci.* **27**, 1053-1056.
- SMITH, S.E.; WELCH, N.C. AND LITTLE, T.M. (1973) Studies on lettuce seed quality: I. Effect of seed size and weight on vigor. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **98**, 529-533.
- SPIEGEL, S. AND MARCUS, A. (1975) Polyribosome formation in earling wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature (Lond.)* **256**, 228-230.
- SPRAGG, S.P. AND YEMM, E.W. (1959) Respiratory mechanisms and the changes of glutathione and ascorbic acid in germinating peas. *J. Exp. Bot.* **10**, 409-425.
- SPYCHALLA, J.P. AND DESBOROUGH, S.L. (1990) Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* **94**, 1214-1218.
- STANDARD, S.A.; PERRET, D. AND BRAY, C.M. (1983) Nucleotide levels and loss of vigour and viability in germinating wheat embryos. *J. Exp. Bot.* **34**, 1047-1054.
- STEERE, W.C.; LEVENGOOD, W.C. AND BONDIE, J.M. (1981) An electronic analyzer for evaluating seed germination and vigour. *Seed Sci. Technol.* **9**, 567-576.
- STEINER, J.J.; GRABE, D.F. AND TULO, M. (1989) Single and multiple vigor tests for predicting seedling emergence of wheat. *Crop Sci.* **29**, 782-786.

- STEWART, R.R.C. AND BEWLEY, J.D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated ageing of soybean axes. *Plant Physiol.* **65**, 245-248.
- SUN, W.Q. AND LEOPOLD, A.C. (1994) The glassy state and accelerated aging of soybeans. *Physiol. Plant.* **89**, 767-774.
- SUNG, J.M. AND JENG, T.L. (1994) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiol. Plant.* **91**, 51-55.
- TAO, K.L.J. (1978) Factors causing variations in the conductivity test for soybean seeds. *J. Seed Technol.* **3**, 10-18.
- TAYLOR, A.G.; HUANG, X.L. AND HILL, H.J. (1988) Sinapine leakage from non-viable cabbage seeds. *J. Exp. Bot.* **39**, 1433-1438.
- THOMPSON, J.E.; LEGGE, R.L. AND BARBER, R.F. (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* **105**, 317-344.
- THOMSEN, B.; DRUMM-HERREL, H. AND MOHR, H. (1992) Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments. *Planta* **186**, 600-608.
- THRONEBERRY, G.O. AND SMITH, F.G. (1955) Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. *Plant Physiol.* **30**, 337-343.
- TORRES, M.; CARDOSO, C. AND DURAN, J.M. (1988) Electrical conductivity test and seed germination of sunflower after ultraviolet-C irradiation. *6th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP)*, Split (Yugoslavia), Abs. 10.20.
- TORRES, M.; FRUTOS, G. AND DURAN, J.M. (1991) Sunflower seed deterioration from exposure to U.V.-C radiation. *Environ. Exp. Bot.* **31**, 201-207.
- TORRES, M. Y C.J. MARTÍNEZ-HONDUVILLA (1987) Envejecimiento o pérdida de viabilidad de semillas. *Primer Symposium Nacional de Semillas*, Sevilla, pp. 233-252.
- TORRES, M. Y MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1988) Efecto de tres cultivares en el vigor de semillas de girasol. *An. Edaf. Agrobiol.* **47**, 1199-1207.
- TORRES, M. AND MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. (1990) Effect of seed size on the germination and vigour of sunflower. *Agr. Med.* **120**, 220-225.
- TYAGI, C.S. (1993) Evaluating viability and vigour in soybean seed by an exudate pH test. *Seed Sci. Technol.* **21**, 475-478.

- USHIMARU, T.; SHIBASAKA, M. AND TSUJI, H. (1992) Development of the O₂⁻ detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **33**, 1065-1071.
- VAN BILSEN, D.G.J.L.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. AND CROWE, J.H. (1994) Altered phase behavior in membranes of aging dry pollen may cause imbibitional leakage. *Plant Physiol.* **104**, 1193-1199.
- VAN DER BURG, W.J.; JALINK, R.A.; VAN ZWOL, J.W.; AARTASE, J.W. AND BINO, R.J. (1994) Non-destructive seed evaluation with impact measurements and x-ray analysis. *Acta Hort.* **362**, 149-154.
- VERTUCCI, C.W. (1989) The effects of low water contents on physiological activities of seeds. *Physiol. Plant.* **77**, 172-176.
- VERTUCCI, C.W. AND LEOPOLD, A.C. (1983) Dynamics of imbibition by soybean embryos. *Plant Physiol.* **72**, 190-193.
- VERTUCCI, C.W. AND LEOPOLD, A.C. (1984) Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiol.* **75**, 114-117.
- VERTUCCI, C.W. AND LEOPOLD, A.C. (1987) Oxidative processes in soybean and pea seeds. *Plant Physiol.* **84**, 1038-1043.
- VERTUCCI, C.W. AND ROOS, E.E. (1990) Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiol.* **94**, 1019-1023.
- VILLIERS, T.A. (1980) Ultrastructural changes in seed dormancy and senescence. En: *Senescence in plants*, (K. V. Thimann, ed.), CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp. 39-83.
- WAGGONER, P.E. AND PARLANGE, J.Y. (1976) Water uptake and water diffusivity of seeds. *Plant Physiol.* **57**, 153-156.
- WALKER, M.A. AND MCKERSIE, B.D. (1993) Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* **141**, 234-239.
- WANG, J.; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T.; ENDO, Y. AND KITAMURA, K. (1990) Sensitivity of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. *Phytochemistry* **29**, 3739-3742.
- WANG, S.Y.; JIAO, H.J. AND FAUST, M. (1991) Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiol. Plant.* **82**, 231-236.

- WANN, E.V. (1986) Leaching of metabolites during imbibition of sweet corn seed of different endosperm genotypes. *Crop Sci.* **26**, 731-733.
- WILLIAMS, R.J. AND LEOPOLD, A.C. (1989) The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol.* **89**, 977-981.
- WILSON, D.O., JR. AND McDONALD, M.B. (1986) The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* **14**, 269-300.
- WILSON, D.O., JR.; McDONALD, M.B. AND MARTIN, S.K.S. (1989) A probit planes method for analyzing seed deterioration data. *Crop Sci.* **29**, 471-476.
- WINGATE, V.P.M.; LAWTON, M.A. AND LAMB, C.J. (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.* **87**, 206-210.
- WINGSLE, G. (1989) Purification and characterization of glutathione reductase from Scots pine needles. *Physiol. Plant.* **76**, 24-30.
- WINGSLE, G. AND HALLGREN, J.E. (1993) Influence of SO₂ and NO₂ exposure on glutathione, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in Scots pine needles. *J. Exp. Bot.* **44**, 463-470.
- WINSTON, G.W. (1990) Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. En: *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, (R. G. Alscher and J. R. Cumming, eds.), Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 57-86.
- WOLF, S.P. AND DEAN, R.T. (1986) Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Biochem. J.* **234**, 399-403.
- WOODSTOCK, L.W. (1973) Physiological and biochemical tests for seed vigour. *Seed Sci. Technol.* **1**, 127-157.
- WOODSTOCK, L.W.; FURMAN, K. AND LEFFLER, H.R. (1985) Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism and mineral leaching from cotton seeds. *Crop Sci.* **25**, 459-466.
- WOODSTOCK, L.W.; FURMAN, K. AND SOLOMOS, T. (1984) Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. *Plant Cell Physiol.* **25**, 15-26.
- WOODSTOCK, L.W. AND TAYLORSON, R.B. (1981) Soaking injury and its reversal with polyethylene glycol in relation to respiratory metabolism in high and low vigour soybean seeds. *Physiol. Plant.* **53**, 263-268.

BIBLIOGRAFÍA

- YOKOTA, A.; SHIGEOKA, S.; ONISHI, T. AND KITAOKA, S. (1988) Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO₂ grown *Chlamydomonas reihardtii*. *Plant Physiol.* **86**, 649-651.
- ZEWDIE, M. AND ELLIS, R.H. (1991) Survival of tef and niger seeds following exposure to subzero temperatures at various moisture contents. *Seed Sci. Technol.* **19**, 309-317.
- ZIANG, J. AND KIRKHAM, M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* **35**, 785-791.