

Viabilidad de semillas de arroz provenientes de plantas obtenidas *in vitro*

Viability in rice seeds obtained from plants developed *in vitro*

Maylin Pérez-Bernal¹, Daylenis Lorenzo Salinas² y Magalis Delgado Rigo¹.

⁽¹⁾Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado Postal 83. Código Postal 60200. Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu ⁽²⁾Estudiante de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

Rec.: 20.08.12 Acept.: 10.09.13

Resumen

Se evaluó la viabilidad de semillas de arroz indica (*Oryza sativa* L.) variedad IACuba-28 provenientes de plantas cultivadas *in vitro*. Dichas semillas fueron conservadas en bolsas de plástico durante 0, 2, 5, 7, 9 y 12 años en un banco de semillas a 4 °C y 34% de humedad relativa. La prueba de germinación se realizó en una muestra aleatoria de las accesiones A2000, A2003, A2005, A2007, A2010, A2012 y como prueba bioquímica se determinó la actividad alfa-amilasa en las semillas en germinación. En ambas determinaciones se incluyeron controles positivos con semillas nuevas obtenidas de plantas cultivadas en campo. Se halló una reducción progresiva del porcentaje de germinación, a medida que aumentó el tiempo de conservación en banco de germoplasma, así, a los 12 años de conservación se dio el mayor número de semillas muertas, contaminadas y plantas anormales. En todas las accesiones se observó un aumento de la actividad alfa-amilasa hasta el quinto día de germinación para luego disminuir, encontrando diferencias ($P < 0.05$) entre accesiones jóvenes y antiguas. La actividad alfa-amilasa promedio en el quinto día de germinación fue de 0.25 en las accesiones con menor tiempo de almacenamiento, mientras que en las más antiguas fue de 0.192. La diferencia más marcada se observó en la accesión almacenada por 12 años, donde el pico de actividad sólo llegó a 0.0614. Este estudio demostró que las semillas provenientes de cultivo *in vitro* mantienen su viabilidad durante 10 años de almacenamiento en las condiciones del estudio; transcurrido este tiempo se perciben cambios desfavorables en los parámetros de germinación y en los niveles de la actividad alfa-amilasa.

Palabras clave: Actividad alfa-amilasa, cultivo *in vitro*, prueba de germinación, .

Abstract

The viability of rice seeds (cv. IACuba-28) obtained from *in vitro* developed plants was evaluated. These seeds were stored for 0, 2, 5, 7, 9 and 12 years in a seed bank at 4°C in dry and 34% relative humidity. For monitoring viability we conducted a germination test and an alpha-amylase activity assay in germinating seeds. In both experiments we set a positive control with new seeds obtained from plants grown in the field. It was observed a gradual decrease in germination percentage with increasing storage time. In the accession with 12 years of conservation the largest number of dead and contaminated seeds and abnormal plants was found. Accessions showed increasing in alpha amylase activity until the fifth day of germination and then decreased, but quantitative significant differences ($P < 0.05$) among young and old accessions were found. The average of alpha amylase activity on the fifth day was 0.25 for young accessions, while for the oldest was 0.192. The highest difference was noted in the accession of 12 years, where the maximum activity only reached 0.0614. The present study demonstrated that

seeds from *in vitro* culture maintain their viability for 10 years of storage. After this time, we perceived adverse changes in germination parameters and in the alpha amylase activity.

Key words: Alpha amylase activity, germination test, *Oryza sativa*.

Introducción

Los bancos son medios para la conservación de la viabilidad y pureza de semillas en forma controlada a temperatura y humedad relativa bajas. Con ello se busca preservarlas desde la cosecha hasta la próxima siembra, conservar especies de alto valor genético, evitar la ruptura natural de la latencia y la erosión genética del germoplasma (Doria, 2010).

La viabilidad es la medida del porcentaje de semillas vivas con capacidad para germinar y producir plantas en condiciones adecuadas. Las bajas temperaturas y los bajos porcentajes de humedad favorecen un lento metabolismo de las semillas, lo que les permite una mayor longevidad (Doria, 2010). Las semillas almacenadas deben tener una viabilidad alta al inicio y durante el almacenamiento (Bradford, 2004), no obstante ésta disminuye progresivamente a través del tiempo; por tanto, es importante conocer el momento de inicio de reducción con el fin de tomar acciones apropiadas para conservar la accesión y evitar su deterioro excesivo y la pérdida del material (Rao *et al.*, 2007).

Existen varios métodos para determinar la viabilidad de las semillas, entre ellos la prueba de germinación sobre papel (AOSA, 2005) es considerada como la más exacta y confiable. Esta prueba se utiliza en semillas con diámetro < 2 mm que son colocadas sobre papel absorbente como sustrato, con humedad permanente y pH neutro. Con ella se determina qué proporción de las semillas de una accesión o lote germinará en condiciones favorables y producirá plántulas normales con raíces, brotes y suficiente reserva de alimento, para producir plantas completas.

También existen pruebas bioquímicas rápidas que requieren técnicas especiales para su realización; entre éstas la actividad amilasa, un indicador bioquímico de la viabilidad de las semillas ricas en almidón. En las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) la actividad amilasa puede ser detectada en

las etapas tempranas de germinación y en la movilización de sustancias de reserva como evento metabólico esencial para el desarrollo de la nueva plántula. Las amilasas (alfa y beta) son enzimas sintetizadas en la capa de aleurona que catalizan la hidrólisis del almidón para formar monosacáridos destinados al proceso de respiración celular (Bernal y Martínez, 2006).

En el Banco de Semillas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Cuba, se conservan semillas de arroz provenientes de plantas obtenidas mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Cuando estas plantas alcanzan 15 cm de altura son transferidas al ambiente *ex vitro*, donde se les garantiza los cuidados culturales que requieren. Para este estudio, las semillas obtenidas fueron secadas, empacadas en bolsas de plástico y conservadas por varios años a 4 °C y 34% de humedad relativa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de las semillas de diferentes accesiones de arroz provenientes de cultivo *in vitro*, después de 0, 2, 5, 7, 9 y 12 años de conservación en el banco de semillas antes mencionado.

Materiales y métodos

Prueba de germinación

Se utilizaron semillas de las accesiones A2000, A2003, A2005, A2007, A2010, A2012 de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad IACuba-28, conservadas a 4 °C y 34% de humedad relativa durante periodos variables de 0, 2, 5, 7, 9 y 12 años, correspondientes con el número de años en almacenamiento. De cada accesión (tratamientos) fueron seleccionadas en forma aleatoria 300 semillas frescas distribuidas en tres repeticiones de 100 semillas cada una, más un control consistente en 300 semillas cosechadas en campo en 2012. Todas las semillas fueron sometidas a un calentamiento a 40 °C con circulación de aire durante los 5 días previos a la prueba de germinación según las normas AOSA (2005).

Las semillas fueron sumergidas por 10 min en una solución de hipoclorito de sodio (1%) y lavadas cinco veces con agua estéril. Posteriormente se colocaron de manera uniforme sobre papel absorbente húmedo, en placas Petri de 9 cm para incubación a 25 °C. Catorce días después del comienzo de la prueba se hizo el conteo final de plántulas normales y defectuosas y de semillas muertas o latentes, y se determinó el porcentaje de germinación a partir del número de plantas normales versus el total de semillas, descartando las contaminadas que se eliminaron de la prueba.

Determinación de la actividad alfa-amilasa

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

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

$$Aaa = \frac{\Delta Abs (550nm)}{\Delta t}$$

donde, Abs es absorbancia y t es tiempo.
 $\Delta Abs = Abs2 - Abs1$, $\Delta t = t2 - t1$

Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de germinación y de actividad alfa-amilasa correspondientes a tres repeticiones fueron analizados mediante Anova en un diseño completamente aleatorizado. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$) con el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

Resultados y discusión

Evaluación de la germinación

La germinación de las semillas se define como la reanudación del crecimiento del embrión y la protusión de la radícula desde las estructuras de la testa (Rao *et al.*, 2007). La germinación no es completa hasta tanto se califique la plántula como normal, según los criterios específicos para cada especie. Las plántulas que se obtienen durante una prueba de germinación se clasifican como normales o anormales. Las normales poseen estructuras adecuadas de raíces y brotes esenciales para su desarrollo posterior; las anormales no tienen capacidad para desarrollarse y sufren deficiencia, descomposición o debilidad en sus sistemas de raíces y brotes (AOSA, 2005). En el Cuadro 1 aparecen los porcentajes de germinación 14 días después del inicio de la prueba de germinación. La contaminación por hongos afectó el 3.85% del total de semillas, las cuales fueron eliminadas para evitar la propagación de los contaminantes. Las principales deficiencias observadas en las plántulas anormales fueron la presencia de menos de dos raíces secundarias y la aparición de brotes cortos, gruesos y/o torcidos.

La ausencia de germinación de las semillas es debida, entre otras causas, a la latencia y/o muerte del embrión (Rao *et al.*, 2007). En este último caso por lo general las semillas se ablandan durante la germinación; mientras que las latentes son semillas viables que no germinan aun en condiciones favorables. En este trabajo, las semillas que no germinaron fueron inspeccionadas para comprobar si estaban blandas (muertas) o eran latentes. Los resultados en el tratamiento control indicaron que las condiciones

Cuadro 1. Resultados de la prueba de germinación sobre papel de semillas de accesiones de arroz almacenadas y provenientes de plantas obtenidas *in vitro*^{a,b}.

Almacenamiento (años)	Plántulas			Semillas		Germinadas (%) ^c
	Normales	Anormales	Muertas	Duras/ latentes	Contaminadas	
12 años	180	18	57	0	45	70.58 a*
9 años	249	6	24	0	21	90.24 b
7 años	270	3	21	0	6	91.83 b
5 años	285	0	9	0	6	96.93 c
2 años	288	6	3	0	3	96.96 c
0 años	294	3	3	0	0	98.00 d
Control	294	0	0	6	0	98.00 d

a. Semillas empacadas en bolsas de plástico y conservadas a 4 °C y 34% de humedad relativa.

b. Conteo total en tres repeticiones de 100 semillas cada una.

c. El porcentaje de germinación se calculó con el número de plantas normales respecto al total de semillas (descartando las contaminadas).

* Valores seguidos de letras iguales en la misma columna no difieren en forma significativa ($P > 0.05$), según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

de germinación fueron buenas, ya que no se encontraron semillas muertas y solamente dos semillas no germinadas permanecieron duras y con embriones potencialmente viables; éstas eran probablemente semillas latentes que a menudo están presentes en lotes recién cosechados (Doria, 2010).

El resto de las semillas no germinadas fueron clasificadas como muertas por ser blandas al tacto y en algunas se observó oscurecimiento de los embriones. En el tratamiento correspondiente a la accesión A2012 no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto al control; ambas tenían tiempos iguales de conservación, pero las semillas de la accesión se obtuvieron a partir de plantas provenientes del cultivo *in vitro* y las del control provenían directamente de plantas en campo.

El porcentaje de germinación decreció a medida que aumentó el tiempo de conservación. En los tratamientos de 2 y 5 años de almacenamiento no se hallaron diferencias ($P > 0.05$) en el porcentaje de germinación, pero sí en el número de semillas muertas ($P < 0.05$) (Cuadro 1). El comportamiento de las semillas almacenadas durante 7 y 9 años fue similar en todos los parámetros evaluados, evidenciando en ambos lotes una disminución más acentuada en el porcentaje de germinación respecto a aquéllas almacenadas 2 y 5 años.

En el tratamiento de 12 años de almacenamiento hubo mayor cantidad de semillas contaminadas, muertas y plántulas anormales, así como un porcentaje bajo de germinación (75%). Como este valor se encontraba por debajo de 90%, fue necesario hacer una prueba de germinación en una muestra adicional, según recomendación de FAO/IPGRI (1994), siendo el promedio de ambas pruebas de 69.33%, lo que indica que después de 12 años de almacenamiento, las semillas habían perdido su integridad y su viabilidad.

Las mediciones del contenido de humedad, un factor crítico que determina la longevidad de las semillas, mostraron un porcentaje de 4% para la accesión 2012, un valor inferior al recomendado para cereales en almacenamiento (Walters, 2003). Probert *et al.* (2003) consideran que pequeños cambios en el contenido de humedad de las semillas tienen un efecto significativo en la viabilidad de éstas en almacenamiento. Esta es una de las causas de la reducción en la capacidad de germinación de las semillas de la accesión A2000. En las demás accesiones el contenido de humedad permaneció en el rango normal (5.3%, aproximadamente).

Actividad alfa-amilasa

La enzima alfa-amilasa cataliza la hidrólisis del almidón durante la germinación y como productos se generan azúcares que reducen

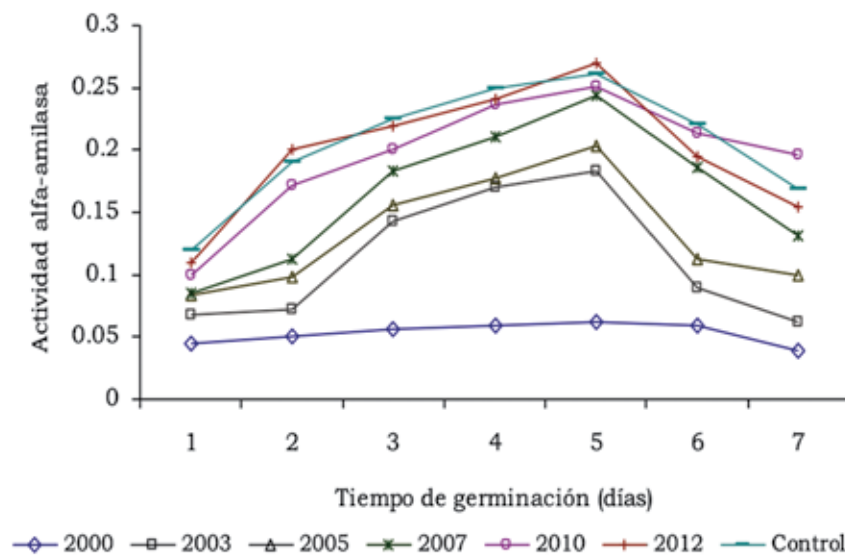


Figura 1. Actividad alfa amilasa en extractos de proteínas totales solubles de semillas de diferentes accesiones de arroz almacenadas en banco de conservación y germinadas sobre papel durante 7 días. Promedios de tres repeticiones.

el ácido dinitrosalicílico en presencia de calor, dando como resultado un cambio de color de amarillo a rojo oscuro, cuya intensidad depende de la cantidad de azúcares provenientes de la hidrólisis y que puede ser cuantificada por método colorimétrico (Miller, 1959). En todas las accesiones ocurrió un incremento de la actividad alfa-amilasa hasta el quinto día de germinación (Figura 1). A partir de este día la actividad se redujo rápidamente, lo cual era de esperar debido a un agotamiento de las sustancias de reserva en las semillas. En semillas de soya, Salinas *et al.* (2002) encontraron que la actividad alfa-amilasa aumentó hasta el día 8 desde el comienzo de la germinación. Por otra parte, Wilson (1987) observó que las reservas de almidón en las semillas son bajas al comienzo de la germinación, no obstante después de 5 días de imbibición se presentan picos de actividad amilasa.

En el presente estudio, a pesar de las tendencias en aumento y disminución de la actividad amilásica, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) cuantitativas entre las accesiones más jóvenes y las más antiguas. La actividad alfa-amilasa promedio en el quinto día en las accesiones A2003 y A2005 fue de 0.192, mientras que en las accesiones con menor tiempo de almacenamiento (A2007, A2010 y A2012) la actividad máxima fue alrededor de 0.25,

sin diferencias con el tratamiento control. La diferencia más marcada se observó en la accesión A2000, donde el pico de actividad sólo llegó a 0.0614, cuatro veces menor que en las semillas más jóvenes (Figura 1).

Debido al envejecimiento de las semillas existen cambios notables en las actividades enzimáticas al comienzo de la germinación. Salinas *et al.* (2002) hallaron que los primeros estadios de deterioro de las semillas están asociados con una reducida síntesis proteica. Milanés y González (1999), por otra parte, encontraron que la actividad de la enzima alfa-amilasa disminuye en semillas que han sido expuestas a condiciones de estrés.

Los pobres resultados de la prueba de germinación y la baja actividad alfa-amilasa en la accesión A2000 reafirman que su viabilidad ha decaído en los doce años de almacenamiento. Las demás accesiones conservaron normales los parámetros de germinación, inclusive la accesión A2003 que estaba por cumplir una década de almacenamiento.

Conclusiones

- A medida que aumentó el tiempo de conservación ocurrió una disminución progresiva del porcentaje de germinación de las semillas de arroz provenientes de plantas cultivadas *in vitro* y conservadas a 4 °C

con 34% de humedad. No obstante, los porcentajes se mantienen por encima de 90% en las semillas almacenadas durante 10 años, por lo que el criterio de viabilidad en este estudio fue adecuado.

- En las semillas conservadas por más de 10 años se perciben cambios desfavorables en los parámetros de germinación y en los niveles de actividad alfa-amilasa.

Referencias

- AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2005. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, USA. Disponible en: <http://www.aosaseed.com> [Fecha revisión: junio 28 de 2012].
- Bernal, L. y Martínez, E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Rev. Centro de Inv. (Méx.)* 7(25):76 - 90.
- Bradford, K. J. 2004. Seed storage and longevity. En: *Seed production and quality*. UC Davis, Seed Biotechnology Center, USA. p. 76 - 84.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cult. Trop.* 31(1):74 - 85.
- FAO/IPGRI. 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO y el IPGRI, Roma, Italia. Disponible en: <http://www.bioversityinternational.org/publications> [Fecha revisión: mayo 15 de 2012].
- Milanés, I. y González, L. M. 1999. Cambios en la actividad de las enzimas peroxidasa, catalasa y alfa-amilasa en semillas de arroz durante la germinación en condiciones salinas. *Centro Agríc.* 26(2):73 - 75.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analyt. Chem.* 31(3):426 - 428.
- Probert, R. J.; Manger, K.R.; y Adams, J. 2003. Non-destructive measurement of seed moisture. En: *Seed conservation: turning science into practice*. En: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard y R.J. Probert (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido. p. 367 - 387.
- Rao, N. K.; Hanson, J.; Dulloo, M. E.; Ghosh, K.; Novell, D.; y Larinde, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. *Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8*. Bioversity International, Roma, Italia.
- Salinas, A. R.; Yoldjian, A. M.; Dietrich, M. L.; Craviotto, R. M.; y Bisaro, V. 2002. Comportamiento de glicinina, β -conglucina y α -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas. *Pesq. Agropec. Bras.* 37(8):1175 - 1181.
- Walters, C. 2003. Principles of preserving germplasm in gene banks. En: E. Guerrant, K. Havens y M. Maunder (eds.). *Strategies for survival*. Island Press, Covelo, CA, USA. p. 113 - 138.
- Wilson, R.F. 1997. Seed metabolism. En: Wilcox, J. R. (ed.). *Soybeans: improvement, production and uses*. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 643 - 686.