

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/271512205>

Desarrollo y germinación de las semillas

Chapter · October 2008

READS

1,219

1 author:



[Angel Jesús Matilla](#)

University of Santiago de Compostela

108 PUBLICATIONS 1,462 CITATIONS

SEE PROFILE

Desarrollo y germinación de las semillas

ÁNGEL J. MATILLA



1. El desarrollo de la semilla. 2. La dormición de semillas. 3. La germinación de semillas.

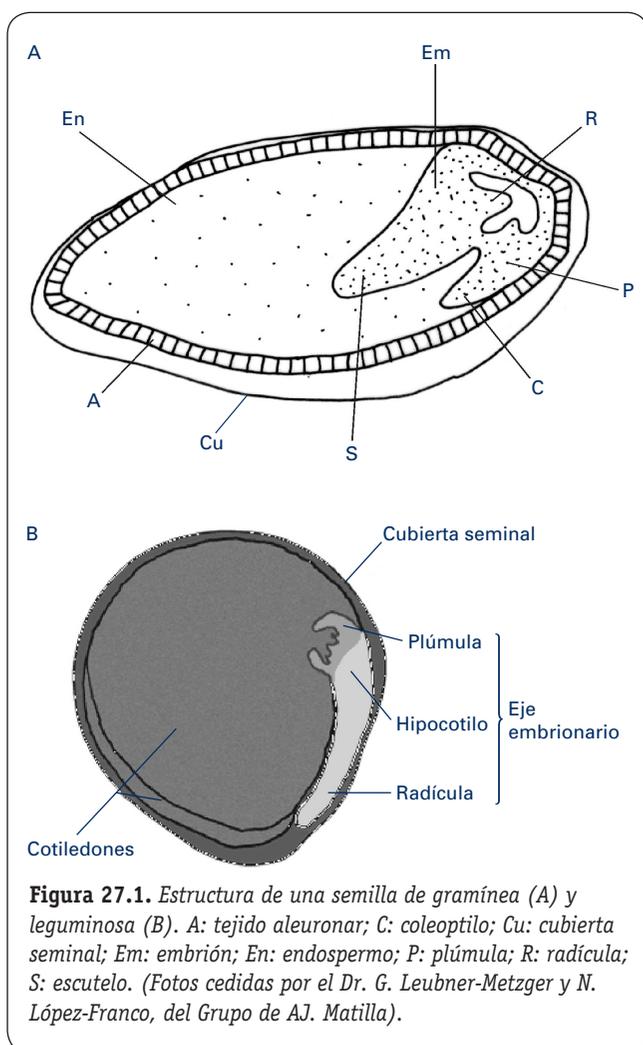
1. EL DESARROLLO DE LA SEMILLA

1.1. La aparición de la semilla constituyó un avance evolutivo trascendental

Las transformaciones progresivas que tienen lugar en el ovario para producir un fruto maduro implican una interacción muy compleja de cambios bioquímicos, moleculares y estructurales coordinados temporal y espacialmente por las fitohormonas y por el programa de desarrollo. Uno de los productos de esta compleja «cascada» de procesos es la semilla, que constituye el órgano de dispersión y perpetuación de las angiospermas y representa la **culminación de la evolución reproductiva de las plantas**. En el curso de la evolución, la semilla fue asociándose progresivamente a una serie de órganos florales para constituir finalmente una unidad de dispersión sumamente compleja que denominamos fruto. En términos evolutivos, el fruto implica una coordinación íntima entre el desarrollo de sus semillas y el ovario. La semilla se forma mediante una **embriogénesis cigótica** que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y maduración del embrión. Éste podrá germinar cuando las condiciones endógenas y medioambientales sean las apropiadas. De la embriogénesis dependerá el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo del nuevo individuo. Además de ser el período en el que se forma la semilla, la embriogénesis también constituye la fase de preparación para la germinación.

1.2. En el desarrollo de la semilla, a la fase inicial de histodiferenciación le siguen las de expansión, maduración y desecación

La formación de la semilla implica la interacción de diversos procesos relacionados con el programa de desarrollo. **La doble fecundación**, después de la interacción entre los gametos masculino (grano de polen) y femenino (saco embrionario), es una característica de las plantas con flores (Fig. 18-1). Tras la fecundación, y una vez que ha crecido de forma unidireccional, el cigoto se divide transversalmente de forma asimétrica, originándose una célula pequeña (*célula apical*) que no aumenta de tamaño y que, tras sucesivas divisiones, dará origen al **embrión**; y otra célula alargada (*célula basal*) que originará el **suspensor** (véase Fig. 18-2), una estructura que actúa como un conducto transportador de nutrientes desde el tejido materno hacia el embrión, sin descartar la síntesis de otros compuestos producidos por el propio suspensor (p. ej., GAs). Al comenzar la desecación de la semilla el suspensor degenera, y desaparece la conexión con la planta madre. La función del suspensor la adoptan entonces los tejidos de reserva (**endospermo** y **cotiledones**) (Fig. 27.1). Los embriones obtenidos mediante una embriogénesis somática no poseen suspensor. La *célula basal* está próxima al micropilo y la *apical*, a la chalaza, lo que conferirá una **polaridad** incipiente al cigoto. El **establecimiento de la polaridad** está muy regulado por el programa de desarrollo y es de importancia capital en la embriogénesis de las plantas. Sin embargo, en las coníferas, que son las gimnospermas



más estudiadas, el núcleo del huevo fertilizado se divide en dos y luego en cuatro, estando embebida esta tétrada en un citoplasma muy denso, probablemente como consecuencia del gran tamaño del citoplasma y de la imposibilidad de lograr una segmentación de éste mediante la formación de una pared celular.

Para estudiar mejor el desarrollo de la semilla se ha dividido en varias fases: histodiferenciación, expansión y maduración y desecación. La duración del desarrollo depende del tipo de semilla. Así, en *A. thaliana* (crucífera) oscila entre 25 y 26 días; en *Z. mays* (gramínea) la duración es de entre 40 y 50 días, y en *Prunus domestica* (rosácea) dura 95-100 días (Fig. 27-2). La mayor parte de los conocimientos sobre la regulación del crecimiento y organización de los tejidos del embrión, la diferenciación celular y la transducción de señales hormonales provienen del estudio de las semillas de *A. thaliana*. Actualmente, existen datos suficientes para concluir que los mecanismos reguladores fundamentales de esta crucífera modelo son similares a los que operan en las semillas de las Leguminosas, entre las que figuran muchas semillas de interés agrícola.

1.2.1. Fase de histodiferenciación

Esta fase, que algunos investigadores denominan también **período embriogénico temprano o inicial**, se caracteriza por una alta tasa de divisiones nucleares y por la formación concomitante de paredes celulares (PC). Todo ello trae consigo un aumento notable del número de células en el embrión. Debido al reducido tamaño de la semilla en esta fase, es muy complicado aislar las diferentes partes de que consta y proceder a la cuantificación hormonal. Sin embargo, los datos de que se dispone en la actualidad indican que las **auxinas** y **citoquininas** son las fitohormonas predominantes (Fig. 27-3). Ello parece ajustarse a los procesos de mitosis que imperan y al papel cada vez más evidente de ambas hormonas en el ciclo celular. Recientemente se ha constatado la implicación del AIA en la simetría bilateral de los embriones. Citoquininas y auxinas parece que preceden secuencialmente a las **GAs**, las cuales están probablemente implicadas en los procesos de alargamiento celular de los tejidos de reserva y el embrión. La actividad mitótica del endospermo tiene lugar antes que la del embrión.

Sin embargo, no está clara la procedencia de las fitohormonas involucradas en la regulación de las fases iniciales de la embriogénesis; es posible que sean importadas de la raíz (p.ej., tomate), o bien que las produzcan las propias semillas (quizá el suspensor). Algunos embriones en el estado globular son capaces de sintetizar sus propias hormonas. El suspensor, por otra parte, está muy relacionado con la biosíntesis de citoquininas y GAs detectadas en el endospermo en este período, hasta el punto de que, en cultivos *in vitro*, el suspensor puede ser suplido por GAs exógenas. Recientemente se ha demostrado que las células epidérmicas son capaces de integrar las señalizaciones del ABA y los azúcares y la actividad del gen FUS3, el cual es necesario exclusivamente en la epidermis para modular la división celular. Finalmente, la **espermidina** y la **espermina** en su forma «libre»(poliaminas relacionadas con el ciclo mitótico) también experimentan un incremento al inicio del desarrollo de algunas semillas.

En las semillas de leguminosas, el crecimiento inicial del embrión está sometido a un control por parte de los tejidos maternos, y el número de células de los cotiledones está correlacionado con el tamaño de la semilla. Éste y otros hechos demuestran que el control de la división celular es clave en la fase inicial del desarrollo seminal. Así, en las semillas de *A. thaliana*, los **azúcares** procedentes del tejido materno (cubierta seminal) inducen **ciclínas** de tipo D2 y D3, y probablemente coordinen el proceso de división celular durante estas etapas iniciales. No obstante, el mecanismo de control del tamaño de la semilla es muy complejo y está lejos de conocerse en profundidad. En las semillas de *Vicia faba* la cubierta seminal tiene un papel notable en este proceso, hasta el punto de que las **cubiertas seminales** con desarrollo incipiente funcionan como un sumidero transitorio, acumulando almidón y proteínas antes de que el embrión comience a almacenar sustancias. Las mutaciones que imposibilitan esta función en la cubierta seminal (p. ej., **mutación rb**) impiden

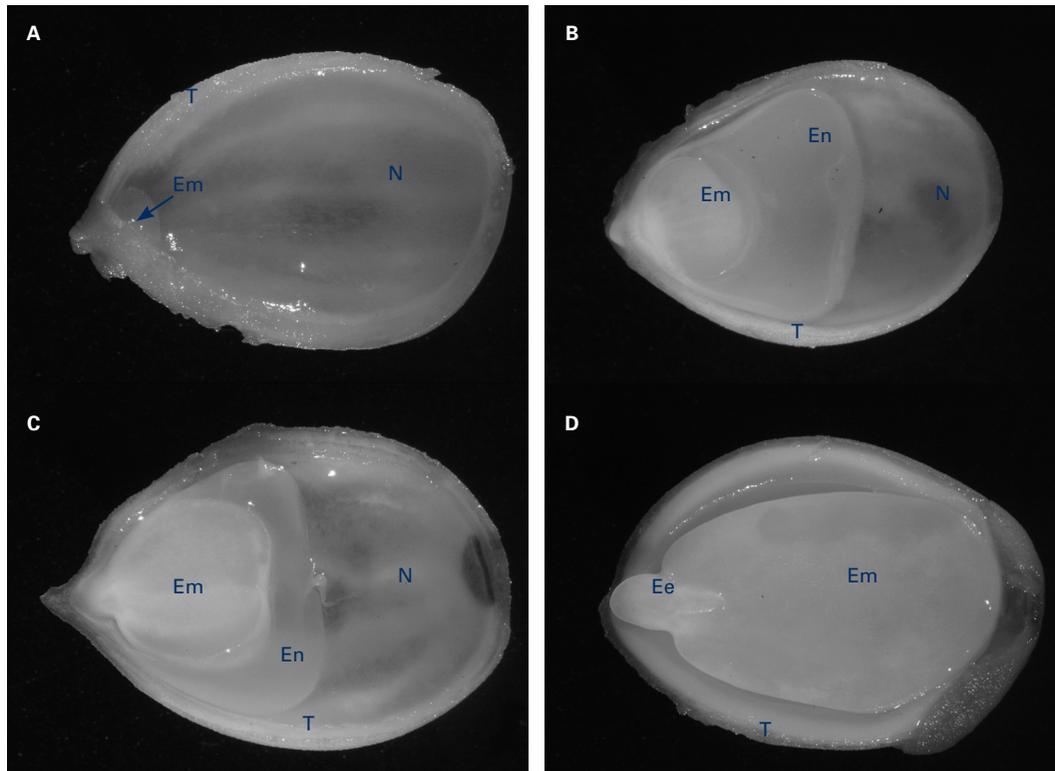


Figura 27.2. Diferentes etapas del desarrollo de la semilla de *Prunus domestica* (mirabel; Rosácea). (A) 21 DDP; (B) 35 DDP; (C) 42 DDP; (D) 56 DDP. T: tegumento; N: nucela; Em: embrión; En: endospermo; Ee: eje embrionario; DDP: días después de la polinización. (Fotos cedidas por N. López-Franco).

el crecimiento del embrión. Así, en las semillas transgénicas de *Vicia narbonensis*, en las que la actividad ADP-glucosa pirofosforilasa está restringida al embrión, el crecimiento de la cubierta seminal y el contenido de almidón no se reduce y, consecuentemente, el tamaño final de la semilla no se

altera. El **ABA materno** sintetizado en la cubierta seminal de *A. thaliana* y *Nicotiana tabacum* se transporta al embrión, promueve su crecimiento y evita su aborto. Sin embargo, en las leguminosas no se ha probado que este ABA esté relacionado con la diferenciación del embrión. Por otra parte, no

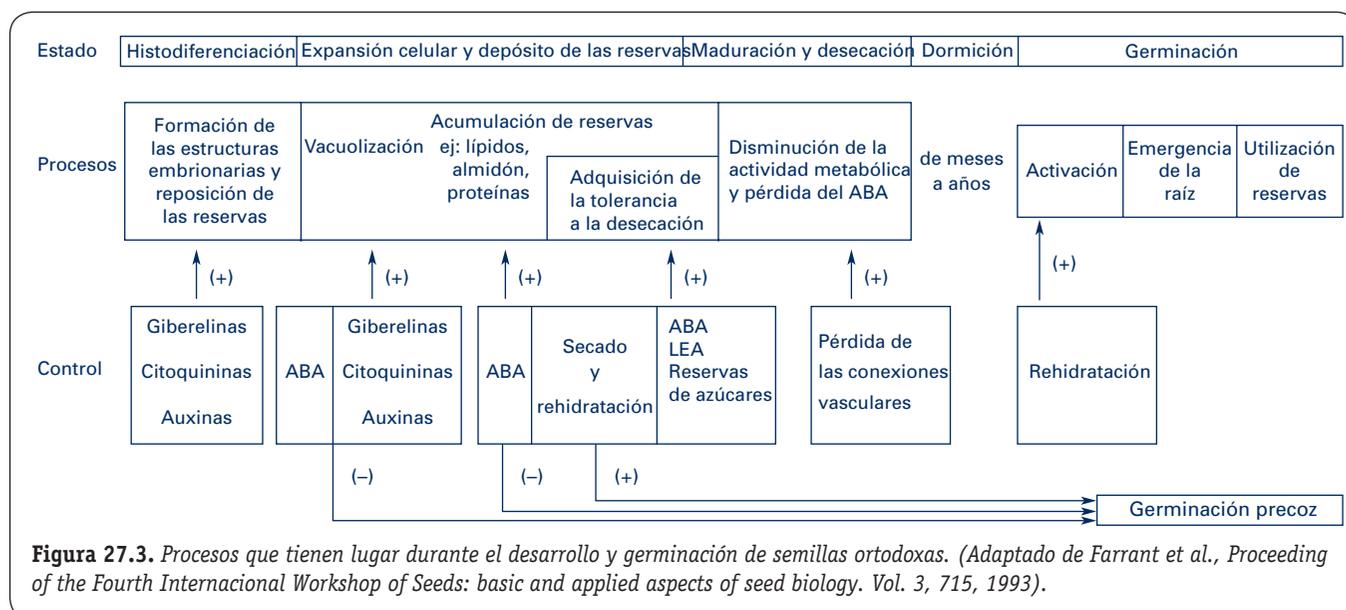


Figura 27.3. Procesos que tienen lugar durante el desarrollo y germinación de semillas ortodoxas. (Adaptado de Farrant et al., *Proceeding of the Fourth Internacional Workshop of Seeds: basic and applied aspects of seed biology*. Vol. 3, 715, 1993).

está descartado que el ABA materno regule la importación de asimilados al embrión.

Generalmente, la **invertasa ácida** (IA) está relacionada con las fases iniciales del desarrollo, mientras que la **sacaroza sintetasa** lo está con la de maduración. De hecho, las modificaciones en los niveles de la IA en ciertas fases del desarrollo pueden alterar la histodiferenciación. La IA de la pared celular es activa en los órganos en crecimiento, facilitando la descarga de asimilados debido a la promoción del gradiente de sacarosa. Es lo que sucede en la cubierta seminal de *V. faba* cuando hay una preponderancia de la actividad mitótica. El alto contenido en azúcares resultante promueve el crecimiento del embrión por división celular. La **mutación miniatura 1** (*mn1*) reduce la IA e impide el desarrollo del endospermo mediante una disminución del número de células. El ABA induce la síntesis de inhibidores de la IA y, por consiguiente, puede iniciar la histodiferenciación, porque la división celular finaliza por ausencia de hexosas. En resumen, la cubierta seminal en fase de histodiferenciación determina, «*vía IA*», la concentración y composición de

azúcares en la vacuola del endospermo y afecta al desarrollo del embrión (Cuadro- 27-1).

1.2.2. La expansión celular predomina en el período embriogénico medio

1.2.2.1. La fase de expansión se caracteriza por una síntesis elevada de auxinas

El crecimiento por división celular desaparece en esta fase y es sustituido por un crecimiento debido, preferentemente, a la elongación celular. Sin embargo, en la mayoría de las semillas de cereales cultivados el endospermo (constituido al final de esta fase por células vivas o alternativamente vivas y muertas) sigue creciendo por mitosis, por elongación o por ambos mecanismos, y llega a alcanzar un gran tamaño. En este período existe un **contenido elevado de auxinas** en sus formas «libre» y «conjugada» (Fig. 27-3). El AIA se sintetiza en los tejidos de la propia semilla; no es impor-

CUADRO 27-1. Sustancias de reserva y su lugar de acumulación en semillas de plantas con interés agrnómico

	Proteínas	Aceites ¹	Hidratos de Carbono	Órgano de almacén
Cereales				
Cebada	12	3	76	endospermo
Maíz	10	5	80	endospermo
Avena	13	8	66	endospermo
Centeno	13	2	76	endospermo
Trigo	12	2	75	endospermo
Leguminosas				
Haba	23	1	56	cotiledones
Guisantes	25	6	523	cotiledones
Cacahuete	31	48	12	cotiledones
Soja	37	17	26	cotiledones
Otras				
Ricino	18	64	nd	endospermo
Palmera	9	49	28	endospermo
Colza	21	48	19	endospermo
Pino	35	48	6	megagametofito

Los números expresan el porcentaje de sustancias de reserva (nd = no detectado).

1 En los cereales los lípidos son almacenados en el escutelo (tejido embrionario).

2 En los cereales el almidón es el principal hidrato de carbono.

tado de los tejidos maternos. Asimismo, **las GAs «libres» y «conjugadas» también aumentan**, las citoquininas tienden a desaparecer y no se detecta todavía ABA. Conviene señalar que, si bien las GAs son importantes en este período, sobre todo en las gramíneas, no se detecta la expresión del gen correspondiente a la α -amilasa en las capas aleuronares. En la mayoría de las dicotiledóneas, se utiliza el material de reserva del endospermo y, consecuentemente, éste queda reducido a una delgada capa de células al final de esta fase.

2.2.2.2. Durante la fase de expansión se acumulan las sustancias de reserva de las semillas

La embriogénesis provoca la aparición de tejidos muy bien organizados para desempeñar funciones muy concretas en la semilla. Entre otras, podemos citar la síntesis coordinada y la acumulación, en su caso, de proteínas, lípidos e hidratos de carbono en diferentes períodos de la embriogénesis y en diversos órganos de la semilla (cotiledones y endospermo) (Cuadro 27-1). El crecimiento del cotiledón comprende dos fases de desarrollo celular (Fig. 27-4 y 27-5): en la primera, el crecimiento se produce fundamentalmente por mitosis (aumento del número de células); en la segunda, predomina la expansión celular (aumento de volumen). Sin embargo, el patrón de desarrollo del endospermo consta de: a) divisiones nucleares periféricas muy rápidas en la célula madre del endospermo (localizada en la región media del saco embrionario) en ausencia de síntesis de pared celular; b) vacuolización próxima a estos núcleos; c) aparición de células individualizadas (cerca de 100 000 en la cebada) una

vez producida la síntesis de la pared celular; d) expansión celular para que se depositen en la región central del endospermo las sustancias de reserva (almidón y proteínas, fundamentalmente), y e) formación y diferenciación de las **capas aleuronares** (uno de los pocos ejemplos de tejido digestivo encontrado en el reino vegetal), proceso que se inicia en una hendidura que posee la célula madre del endospermo en su zona basal y que termina cuando las capas aleuronares rodean totalmente al endospermo.

Las gimnospermas acumulan fundamentalmente lípidos y proteínas, que almacenan en las diferentes partes del megagametofito (haploide) y del embrión (diploide) en desarrollo. En *Pseudotsuga menziesii* y en *Picea glauca* los lípidos constituyen entre el 50 y el 30% del peso seco del megagametofito y del embrión, respectivamente, mientras que las proteínas representan un 12 y un 10%, respectivamente. Sin embargo, en *Pinus tadea* los lípidos constituyen el 36% del megagametofito y el 51% del embrión. Es importante resaltar el caso de la gimnosperma primitiva *Ginkgo biloba*, cuyos productos de reserva se detectan antes de que exista el embrión; en esta semilla, el almidón es la reserva más abundante y la primera en aparecer (cuando los arquegonios son todavía jóvenes). En general, la distribución de las sustancias de reserva en el megagametofito maduro es como sigue: lípidos en la zona superficial, lipoproteínas en la zona media y almidón en las zonas media y profunda. Las proteínas de reserva, la fitina y los depósitos minerales se acumulan en plastos especiales en forma de **crystaloides** (agregados proteicos insolubles). En *Pinus pinaster*, las gluteninas, globulinas y albúminas constituyen el 70, 26 y 4%, respectivamente, de las proteínas de los crystaloides. En G.

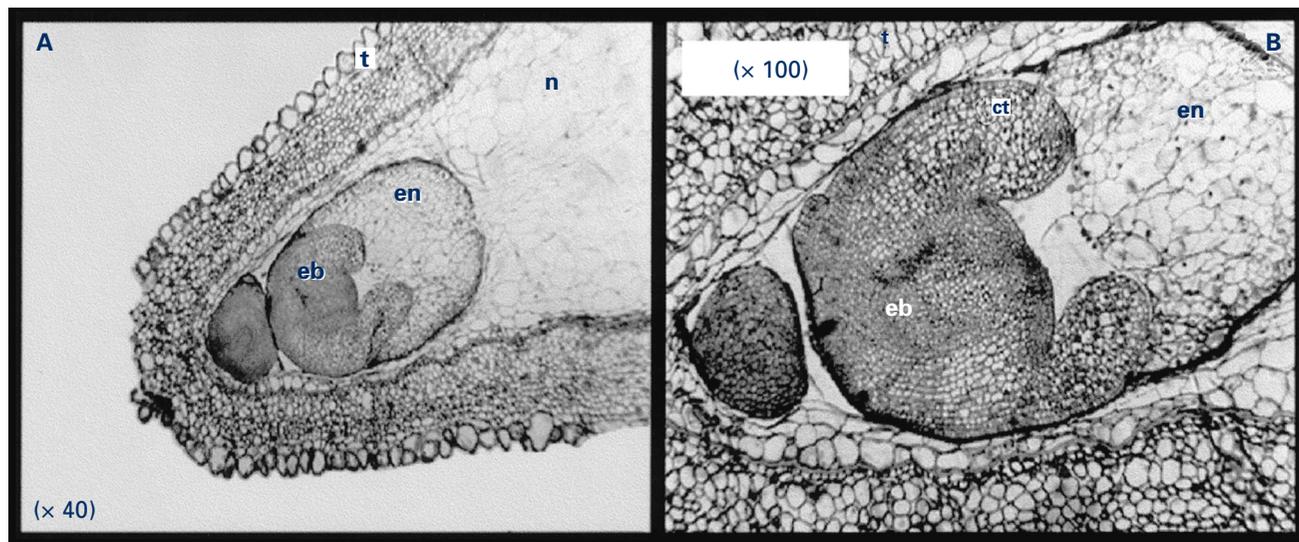
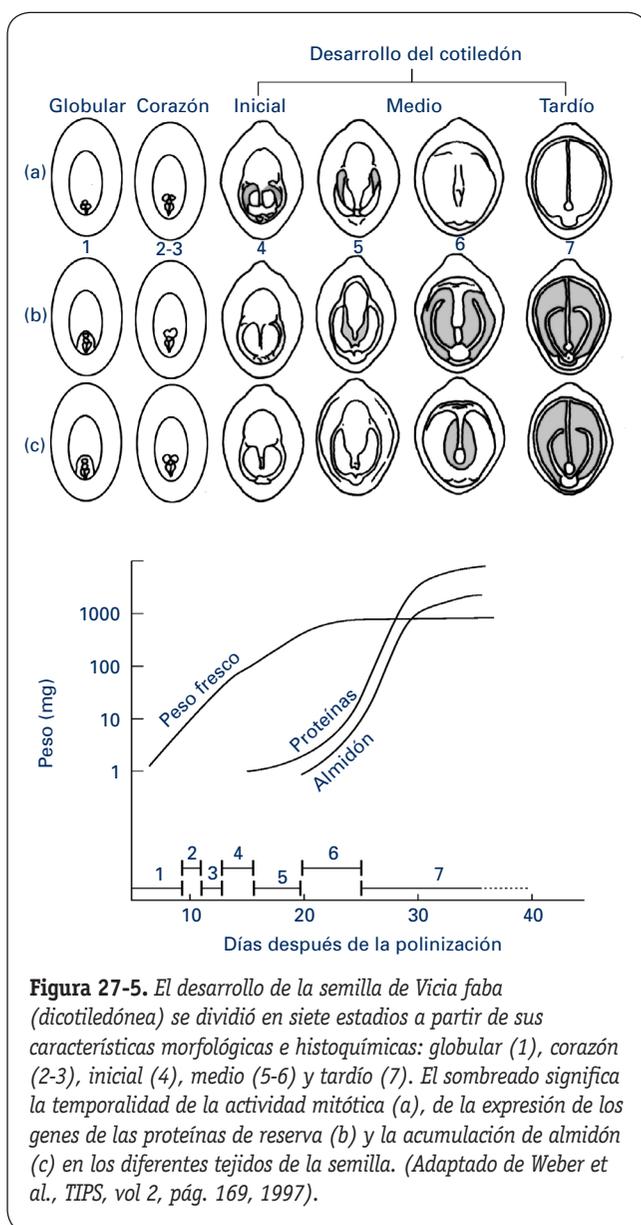


Figura 27.4. Fase inicial de crecimiento de los cotiledones de la semilla inmadura de melocotón (*Prunus persica*). **(A)** Vista general de la región apical o micropilar de la semilla inmadura en la que se observa la envuelta externa o tegumento (t) y la nucela (n). Embebido en la nucela se encuentra el saco embrionario, que contiene el embrión en desarrollo (eb) y el endospermo (en) ya celularizado. **(B)** Detalle de la figura A en donde se observa el inicio del crecimiento de los cotiledones (ct) a partir de dos grupos de células localizados en la porción basal o chalazal del embrión en desarrollo. (Fotos cedidas por el Dr. J. A. Arnau.)



biloba ya aparecen las leguminas y vicilinas como proteínas de reserva.

Las semillas de angiospermas acumulan las sustancias de reserva en **cuerpos proteicos** (vacuolas especiales o vesículas originadas del RE), **cuerpos lipídicos** (oleosomas o esferosomas) y amiloplastos (Fig. 27-6). Existen algunas semillas que acumulan hemicelulosas en las paredes celulares del endospermo y las utilizan como material de reserva. Las proteínas de las semillas se han clasificado en tres grupos, de acuerdo con su función fisiológica: 1) **enzimas**, en su mayor parte implicadas en la movilización de reservas (p. ej., cisteína endopeptidasa y proteínasa A y B); 2) **proteínas de reserva** (proteínas diferentes a las que existen en las partes vegetativas de la planta que son utilizadas habitualmente para alimentar a la plántula antes de que se convierta en un organismo autótrofo; sirven en algunos casos como protectores celulares durante la fase de desecación de la semilla

y constituyen una parte de la dieta de algunos animales, entre ellos el hombre) y 3) **proteínas estructurales**. Desde el punto de vista bioquímico, las proteínas de reserva se clasifican en **globulinas** (características de las leguminosas y de algunos cereales como el arroz y la avena), **prolaminas y gluteninas** (abundantes en los cereales), **albúminas y vicilinas**. En la actualidad, las gluteninas se consideran un subgrupo de las prolaminas. Este complejo conjunto de proteínas se forma en los tejidos de reserva durante la embriogénesis cigótica y tiene una relación «fuente-sumidero» con los órganos de crecimiento de la semilla durante la germinación. Entre las proteínas de reserva suelen incluirse las **lectinas** (fitohemaglutinina, ricina-D, abrina, concanavalina-A o aglutinina, etc.), ciertos inhibidores y algunas proteínas de carácter tóxico. Sin embargo, se excluyen aquellas proteínas asociadas directa o indirectamente con la maduración, el estrés y la dormición de las semillas (como, por ejemplo, las proteínas LEA). Normalmente, el nombre de las proteínas de reserva se deriva del latín (zeina de *Zea*, hordeina de *Hordeum*, heliantina de *Helianthus* o napina de *B. napus*, etc.).

La mayor parte de las proteínas de reserva poseen una estructura muy compleja. Son oligómeros con subunidades polimórficas de más de un polipéptido y codificadas por familias multigénicas. Debido a su abundancia en las semillas, sus genes fueron de los primeros en ser estudiados en las plantas, y los de las dicotiledóneas y cereales de interés agronómico han sido clonados, y caracterizadas sus secuencias *cis*. Las alteraciones que tienen lugar desde que se sintetiza la molécula proteica precursora hasta que se acumula como material de reserva son muy complejas y afectan a varios compartimentos celulares (Fig. 27-7). Sus precursores están en el interior del retículo endoplasmático (RE) rugoso, y desde aquí son transportados mediante vesículas de la cara *trans* del AG. En algunos casos, no está implicado el AG. Estas proteínas poseen un péptido de señalización vacuolar; en un mismo cuerpo proteico pueden coexistir diferentes tipos de estas proteínas. Pueden ser glicosiladas en el RE y el AG y procesadas posteriormente en la vacuola mediante una **proteólisis limitada**, a fin de que la degradación no se generalice a lo largo de toda la molécula proteica.

Las proteínas de reserva de las semillas de dicotiledóneas han sido muy estudiadas (Fig. 27-7). Las leguminas son hexámeros constituidos por seis subunidades casi idénticas. Las proteínas no maduras de cada monómero son introducidas en el RE, en donde se forma un puente S-S que une las dos cadenas polipeptídicas que forman cada subunidad. Después se agrupan tres monómeros (trímero) para ser transportados a la vacuola de almacenamiento, en donde continúa el proceso de maduración, y finalmente se constituye el **hexámero**. Las vicilinas (como β -conglicina y faseolina) son **trímeros** constituidos por dos tipos diferentes de subunidades, las cuales no pueden unirse entre sí mediante puentes S-S, ya que no poseen cisteína. En el RE adquieren la configuración trimérica y, posteriormente, son transportadas a la vacuola de almacenamiento, en donde sufren la correspondiente fragmentación. Las albúminas (globulinas y albúmi-

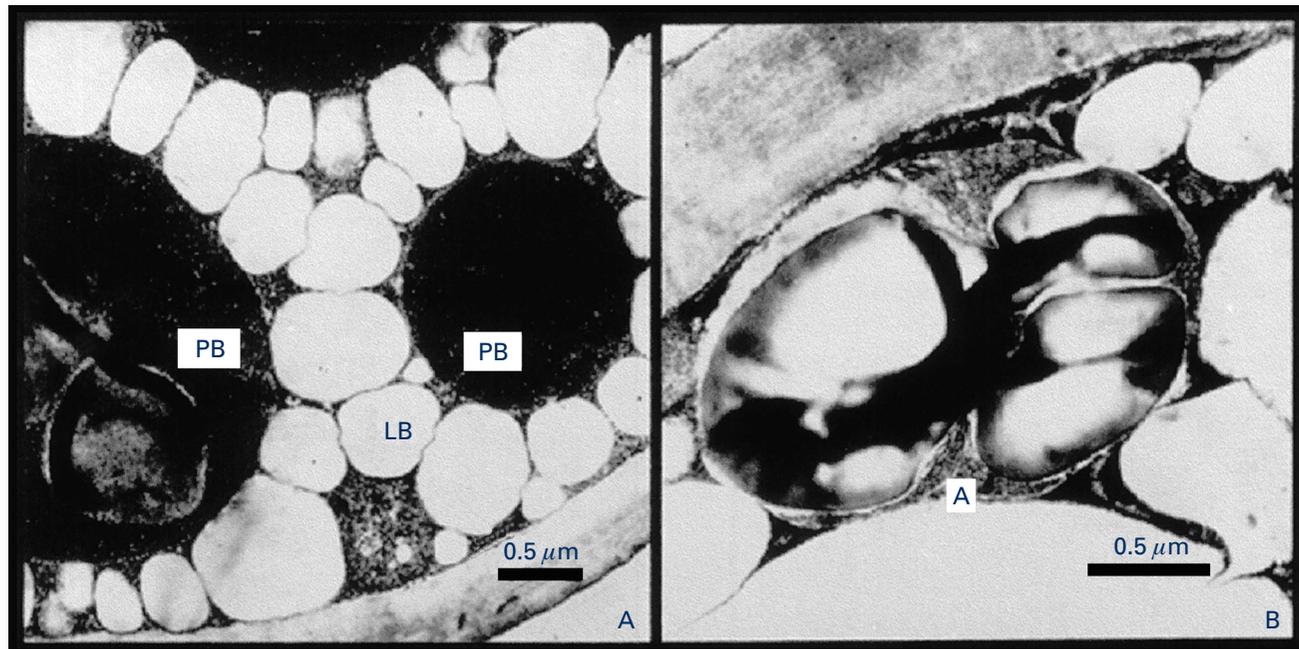


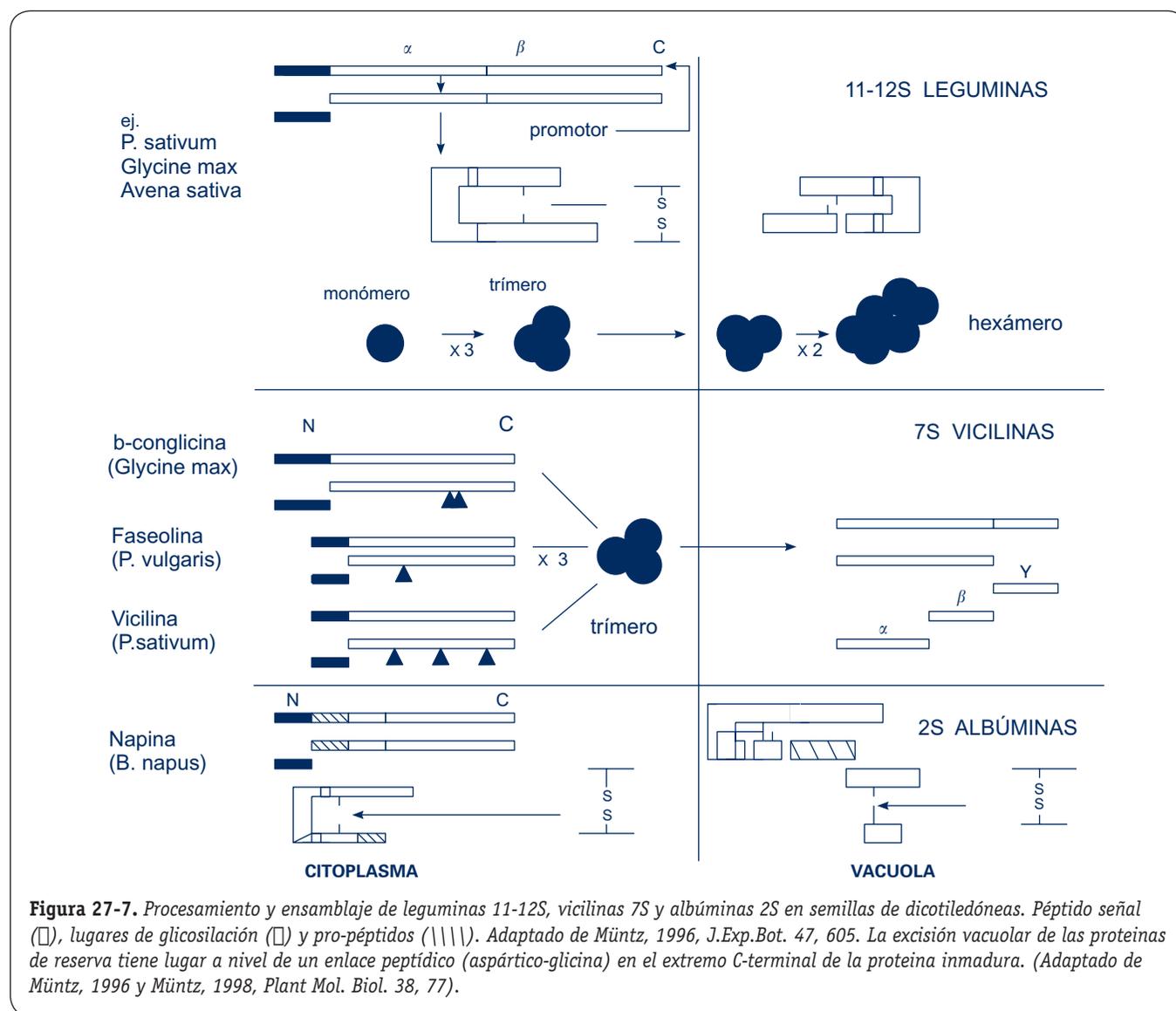
Figura 27.6. Imagen con microscopio electrónico de transmisión de las estructuras en donde se almacenan las reservas en la semilla seca y quiescente del limón (*Citrus limon*). (A) Cuerpos proteicos (PB) y lipídicos (LB). (B) Almidón almacenado en un amiloplasto (A).

nas, como por ejemplo la napina y el inhibidor de α -amilasa de las semillas de cereales) son **monómeros** que adquieren los puentes S-S en el RE y cuya maduración termina en la vacuola. Por lo que respecta a las proteínas de reserva de las semillas de cereales, se conocen en detalle las prolaminas (p. ej., zeína y gluteninas), que son procesadas en el AG o en el RE. Mediante vesículas del AG se transportan a una vacuola de almacenamiento ya existente; en ocasiones, el propio RE puede generar vesículas que contienen prolaminas y, una vez fusionadas varias de estas vesículas, forman en el citoplasma una nueva vacuola de almacenamiento.

El mecanismo de la expresión génica de algunas proteínas de reserva se ha estudiado extensamente en Leguminosas, hasta el punto de que actualmente constituye un modelo biológico de regulación génica. Las secuencias reguladoras para la expresión de estas proteínas en las semillas se localizaron en las regiones promotoras de sus genes. Las globulinas (7S y 11S) son las proteínas de reserva mayoritarias y poseen secuencias muy conservadas en su promotor («caja de vicilina» y «caja de legumina»), concretamente, la **secuencia CATGCATG**, perteneciente a la «caja de leguminas», encontrada en la mayoría de las semillas. Esta secuencia es esencial para la expresión específica de estas proteínas de reserva. En la actualidad se investiga sobre la mejora de la calidad de las proteínas de reserva en las semillas de leguminosas mediante la transformación de estas plantas. La utilización de las semillas de leguminosas para el consumo humano es muy importante. Pero como sus proteínas son deficitarias en metionina, se intenta conseguir, mediante técnicas de biotecnología, semillas con proteínas ricas en este aminoácido para que la alimentación sea más equilibrada.

Los hidratos de carbono de la semilla proceden de la actividad fotosintética que tiene lugar después de la antesis y mayoritariamente son importados «vía floema» desde las hojas mediante un típico proceso de «descarga» de **fotoasimilados**. Sin embargo, no hay conexiones vasculares entre la parte vegetativa de una planta y los órganos de reserva de las semillas; si acaso, acceden a la parte externa de la semilla (cubierta seminal). Por consiguiente, los fotoasimilados deben ser «descargados» en el apoplasto, que está inmediatamente en contacto con la cubierta seminal, y posteriormente enviados al órgano de reserva. Las **células de transferencia** existentes en la periferia de los cotiledones y endospermo tienen una pared celular muy rica en invaginaciones y un plasmalema muy amplio en superficie, contribuyendo ambas propiedades a facilitar la entrada de compuestos. En la mayor parte de las dicotiledóneas, la sacarosa es «descargada» sin hidrólisis previa. Sin embargo, en algunas gramíneas, antes de la «descarga», se produce la hidrólisis de la sacarosa (glucosa + fructosa) catalizada por una IA dependiente de Ca^{2+} . Una vez efectuada la «descarga» de ambos azúcares, tiene lugar nuevamente la síntesis de sacarosa y la posterior utilización de éste y otros azúcares por los tejidos de reserva para producir sustancias de reserva más complejas. No se descarta que en algunas leguminosas y gramíneas exista una ruta simplástica previa a la entrada en el apoplasto. Cuando la deshidratación de la semilla (parte final de la embriogénesis) llega a un punto concreto, la concentración de almidón y proteínas es tal que paraliza su propia síntesis.

En las semillas de dicotiledóneas, el almidón inicia su aparición 10-15 días después de la antesis (Fig. 27-5). Existe



un grano de almidón por cada cloroplasto. Pasados 25-30 días de postantesis, el grano de almidón alcanza un tamaño suficiente como para inhibir la actividad fotosintética del sistema lamelar y transformar el plasto en un amiloplasto (Fig. 27-6). La actividad fotosintética durante la embriogénesis de las dicotiledóneas se realiza en los tejidos de la vaina, estípulas y folíolos.

En las leguminosas, es de destacar la síntesis de lípidos, la cual se inicia pasados 20-25 días de post-antesis; los ácidos grasos se almacenan en cuerpos lipídicos (**elaioplastos**) y están directamente relacionados con los glioxisomas. En las semillas, los lípidos de reserva son almacenados en los **cuerpos lipídicos**, cuya membrana es una monocapa lipídica con la cabeza polar dirigida hacia el citoplasma y con un diámetro de entre 0.6-2.0 μm . En las semillas ortodoxas los cuerpos lipídicos contienen en su membrana **oleosina**, una proteína poco frecuente que posee una parte central de su secuencia (70-80 Aa) altamente hidrofóbica. Su misión es desconocida, pero no aparecen en los oleosomas de

semillas recalcitrantes (que no se desecan en la madurez). Además de los componentes de almacén antes mencionados, las semillas pueden acumular elementos minerales esenciales (magnesio, potasio, calcio, hierro, cobre y manganeso). Alguno de estos minerales puede aparecer en forma de sal; es el caso del **ácido fítico** (*mioinositol hexafosfato*), un importante almacén de fosfato.

1.2.3. En el período tardío tiene lugar la preparación para la maduración y desecación en presencia de niveles elevados de ABA

El período embriogénico tardío está relacionado con la preparación para la maduración de la semilla. Al inicio de la maduración tiene lugar, entre otros procesos importantes, la estimulación de la expresión de un inhibidor de una quinasa dependiente de la ciclina que provoca la paralización del

ciclo celular. Durante este período se detecta la presencia de **niveles elevados de ABA-libre** (Fig. 27-3), un descenso en el peso fresco de la semilla debido a una notable pérdida de agua, la tolerancia a la desecación y ausencia de alteraciones en el peso seco. Generalmente, con esta fase se completa el programa de desarrollo de la semilla. El ABA es el responsable de que, en la planta madre, la semilla no pase directamente de la embriogénesis a la germinación y, por consiguiente, de que adquiera y mantenga la **dormición primaria**. Además, el ABA también es el responsable de la morfogénesis del embrión y de la tolerancia a la desecación por su implicación en la **síntesis de proteínas LEA** y otras proteínas relacionadas con el estrés. Experimentos con embriones aislados han demostrado que algunos efectos inducidos por el ABA (por ejemplo, la activación de genes relativos al estrés) pueden conseguirse en presencia de molaridades altas. No obstante, la señalización inducida por la molaridad elevada no es similar a la del ABA. Una vez que el ABA libre ha ejercido su acción hormonal, se produce un aumento en el nivel de sus «conjugados» (uniones covalentes a azúcares, azúcares-alcohol o aminoácidos) y de algunos de sus metabolitos, como el ácido faseico y el dihidrofaseico, hecho éste muy contrastado en leguminosas (véase Capítulo 22). En el período de maduración no se detectan citoquininas, AIA ni GAs en sus formas «libres»; sí aparecen, en cambio, sus formas «conjugadas», que en algún caso pueden convertirse en formas «libres» en el proceso de la germinación mediante la hidrólisis de los correspondientes «conjugados». Por otra parte, a medida que avanza esta fase embriogénica, las capas más externas de la semilla (como la cubierta seminal) se endurecen a causa de un enriquecimiento en sustancias cerasas, cutina o lignina. Asimismo, las etapas finales del desarrollo seminal se caracterizan por la inhibición de un gran número de procesos metabólicos, entre ellos la actividad respiratoria, la cual adquiere niveles apenas detectables con el fin de mantener a una serie de orgánulos de la semilla (p.ej., mitocondrias), y a la propia semilla, en un estado metabólico «basal» que algunos autores denominan **quiescente**. A diferencia de la semilla durmiente, la semilla quiescente puede germinar si se dan las condiciones óptimas para ello.

En las semillas de dicotiledóneas existen cinco estadios bien diferenciados dentro del período embriogénico tardío: 1) **maduración** (máximo contenido en ABA, máximo tamaño del embrión y máxima acumulación de mRNA de proteínas de reserva; 2) **postabscisión** (máxima concentración de ABA en monocotiledóneas, oscurecimiento de los tegumentos del óvulo ocasionado por la degradación de las clorofilas y la biosíntesis de carotenoides no fotosintéticos, desconexión del tejido vascular e incremento del mRNA de las proteínas específicas de este período); 3) **predesecación** (finalización de la transcripción); 4) **desecación** (pérdida rápida de agua), y 5) **formación de un embrión susceptible** de germinar. En las semillas ortodoxas la desecación está relacionada con la tolerancia a las condiciones medioambientales adversas y, por consiguiente, sirve de «llave» entre el desarrollo y la germinación (Fig. 27-3). Con el inicio de la desecación concluye la acumulación de sustancias de reserva y se im-

pide que éstas sean utilizadas. Sin embargo, en semillas recalcitrantes, como las de *A. marina*, la utilización de las reservas se inicia antes de que la semilla se disperse. Por último, y tomado en su conjunto el período tardío de la embriogénesis, la desecación desencadena un enorme proceso estresante en la semilla y, por consiguiente, aparecen niveles tóxicos de radicales de O_2 , altas concentraciones de sal y cristales en la célula, y un peligro subyacente para los sistemas membranosos y para las macromoléculas delicadas (DNA y RNA, entre otras). En el control de este ambiente estresante están implicadas las proteínas LEA, como se verá en el apartado 2, dedicado a la dormición primaria.

En la transición hacia la maduración de una semilla en desarrollo tiene una especial relevancia la interacción entre azúcares y ABA. Se sabe que los niveles de ABA están regulados espacial y temporalmente durante el desarrollo de las semillas. Sin embargo, la señal que desencadena su síntesis es todavía desconocida. Se cree que puede ser una señal de estrés, nutricional o de ambos tipos (por ejemplo, el nivel de azúcares), pero no existen datos experimentales directos que lo confirmen. Si está confirmado, en cambio, que la señalización del ABA no debe estar alterada para que la señalización de azúcares sea correcta. Corroborando lo anterior, el ABA aumenta la capacidad de respuesta a la señalización de azúcares. Es posible que la sacarosa incremente la sensibilidad al ABA o sus niveles endógenos.

2.3. El metabolismo de los ácidos nucleicos y la expresión génica son muy intensos durante la embriogénesis

Durante los primeros estadios de la embriogénesis, el programa de desarrollo se orienta a la producción de nuevas células. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la variación del DNA durante las primeras divisiones mitóticas. El DNA puede seguir replicándose al tiempo que ciertos órganos de la semilla acumulan sustancias de reserva y no se detecta en ellos actividad mitótica. En muchas semillas, entre ellas las de leguminosas, tiene lugar el **proceso de poliploidía** durante la embriogénesis (así, durante el desarrollo de los cotiledones de *Pisum sativum* aparecen células 32, 64 y 128 C). La función exacta de este proceso no se conoce, pero sí se ha demostrado que es necesaria una señalización hormonal (p. ej., citoquininas) para que se lleve a cabo en tejidos ya diferenciados. **Esta poliploidía no parece estar relacionada con una amplificación génica**, ya que no se ha encontrado un incremento de proteínas de reserva concomitante con el aumento de DNA. Es más, la gran mayoría de los genes relacionados con las proteínas de reserva son copias simples, o tienen 4-5 copias por genoma haploide. La forma en que se utiliza el número extra de copias de DNA es uno de los muchos aspectos desconocidos de la embriogénesis. No se descarta que tengan una función de reserva nucleotídica para llevar a cabo la división celular durante la germinación.

El **metabolismo del RNA** es otro de los aspectos importantes de la embriogénesis cigótica. Durante la fase inicial

de la embriogénesis no sólo se sintetiza RNA, sino que también se degrada una parte de él y, por tanto, se producen nucleótidos y ribosa, que se integran en las rutas metabólicas celulares. Los niveles de RNA (mRNA y tRNA) se incrementan notablemente a lo largo del desarrollo de la semilla y, sobre todo, durante la fase de expansión celular, en que la síntesis de proteínas de reserva es muy alta. Es probable que esta traducción tan elevada se efectúe utilizando un material génico sintetizado en periodos anteriores. La síntesis de proteínas de reserva parece que está controlada a nivel de transcripción, ya que su intensidad depende del nivel y de la estabilidad de los transcritos presentes. No obstante, también se ha observado que algunas proteínas de reserva están reguladas a nivel de traducción. Por último, mientras que el contenido en RNA permanece constante durante la maduración de la semilla, la actividad transcripcional es casi indetectable.

Como se indicó anteriormente, durante el desarrollo de la semilla (excepción hecha de la fase de desecación) se sintetiza una gran cantidad de proteínas. Algunos de los componentes que intervienen en la proteínosíntesis se degradan, mientras que otros permanecen y se conservan hasta el momento de la rehidratación de la semilla previa a la germinación. Así, tRNA, factores de iniciación y elongación, ribosomas, aminoácidos o aminoacil-tRNA sintetasas, entre otros, se encuentran almacenados y protegidos en la semilla seca para realizar una parte de la síntesis proteica durante los primeros momentos del proceso germinativo. Sin embargo, el papel del mRNA no degradado durante la maduración y la desecación, y almacenado en la semilla seca, dista mucho de ser conocido, si bien se ha demostrado que, al inicio de la germinación, algunas proteínas se sintetizan utilizando estos transcritos almacenados. Es muy posible que sea necesaria la transcripción para la reanudación de la síntesis proteica al principio de la imbibición de semillas. Esta población de «mRNA almacenado» puede dividirse en dos grupos: **mRNA no esencial** para el proceso germinativo y que, en su mayor parte, se degrada como cualquier otra sustancia de reserva; y **mRNA disponible** para ser traducido en proteínas que son importantes para el comienzo o terminación del proceso germinativo. En el maíz y otros cereales, las capas de aleurona del endospermo permanecen viables después de que la semilla se haya secado; por esta razón, es lógico pensar también en un proceso de maduración de estas células que van a desempeñar un papel clave en la degradación del endospermo durante la germinación.

La embriogénesis cigótica implica la expresión temporal y espacial de unos 20 000 genes. Por lo que respecta a la semilla, alguno de estos genes se transcriben con baja o alta intensidad en tejidos muy concretos de ella. Otros pueden transcribirse en el período final de la embriogénesis y durante los primeros instantes de la germinación. Se calcula que hay unos 4 000 genes directamente relacionados con el desarrollo de la semilla. Por ahora, los conocimientos sobre la expresión y regulación génica durante los primeros momentos de la embriogénesis contienen muchas lagunas. El empleo de mutantes de *A. thaliana*, maíz, algodón y *P.*

vulgaris, entre otras especies, está ayudando a identificar genes que regulan aspectos muy concretos de la embriogénesis cigótica, cuya expresión génica puede depender, entre otros factores, de la metilación del DNA, la posición de las células en el embrión, el nivel de fitohormonas, la regulación de la fosforilación (p. ej., PEP-carboxilasa) y la «cascada» del programa de desarrollo.

Los datos existentes sobre la expresión génica durante la embriogénesis de las angiospermas ha permitido agrupar los genes en: a) constitutivamente expresados, cuyos productos están presentes en todos los estadios embriogénicos; b) expresados de manera abundante en la fase temprana; c) genes relacionados en su mayoría con las proteínas de reserva, que prevalecen durante la fase de expansión del cotiledón (período medio) y cuya expresión disminuye intensamente al final de este período, y d) genes que se expresan con preferencia en el período final de la embriogénesis, y cuyos productos génicos son almacenados en los períodos de maduración y desecación de la semilla y se degradan a lo largo del período de imbibición y germinación de ésta (en su mayoría son genes relacionados con las proteínas LEA).

La expresión génica de las proteínas de reserva está controlada por el programa de desarrollo genético y ambiental, y su regulación se produce básicamente a nivel de transcripción. En las angiospermas, tal como se indicó en el apartado 1.2.2.2, los genes pertenecientes a estas proteínas se expresan con gran intensidad durante la fase de expansión celular. Sin embargo, en las gimnospermas se ha detectado la máxima expresión cuando la mitosis es más intensa y todavía no se han formado las regiones meristemáticas del embrión. Así pues, parece existir una regulación temporal de estas proteínas entre los dos grupos de plantas. Otros genes bien caracterizados en semillas de angiospermas son los de las proteínas LEA. Los mRNA ya se detectan en el período medio, y su máxima actividad transcripcional tiene lugar en la fase de desecación. Algunos mRNA se almacenan en las semillas secas y son rápidamente degradados en la fase de imbibición de la germinación. Contrariamente a lo que sucede con las proteínas de reserva, la temporalidad en la expresión de las proteínas LEA durante la embriogénesis de las gimnospermas y las angiospermas parece similar; por consiguiente, los mecanismos celulares que operan en ambos grupos de plantas durante el estrés embriogénico pueden ser comparables.

2. LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS

La mayoría de las plantas producen semillas incapaces de germinar antes de su dispersión. Se dice que estas semillas están durmientes. Algunas semillas, las menos, mantienen esta incapacidad incluso después de la dispersión; en cambio, otras pueden germinar en la planta madre. Este fenómeno se conoce como **viviparismo**, y en él está implicada la inhibición de la síntesis de ABA (niveles 25-50% menores) o la falta de sensibilidad a éste durante la fase media-final de la embriogénesis cigótica. **La dormición** puede definirse

como el bloqueo que tiene lugar en una semilla viable que le impide completar la germinación en condiciones favorables. Pese a la complejidad de la descripción de la dormición de semillas, los científicos Carol Baskin y Jerry Baskin (2004) han propuesto una descripción más sofisticada y experimentalmente probada: «una semilla durmiente carece de la capacidad para germinar en un período de tiempo concreto aunque se someta a una combinación de factores físicos medioambientales que en otras circunstancias favorecen su germinación». La dormición se divide en **primaria** o **secundaria**, según que la capacidad germinativa de una semilla esté bloqueada antes o después de su dispersión, respectivamente. El **ABA** está implicado en la aparición de la dormición primaria en semillas ortodoxas, la cual se produce durante la maduración de los órganos de dispersión en la planta madre. Sea cual fuere el tipo de dormición que adquiera una semilla, debe ser eliminada mediante el mecanismo adecuado para que pueda efectuarse la germinación. En el laboratorio, la dormición primaria se puede eliminar mediante un tratamiento de frío (**estratificación**), luz, GAs, etileno, sustancias presentes en el humo del tabaco (p. ej., butenolida) y óxido nítrico, entre otros. Durante el proceso de estratificación de semillas de algunas especies, se produce un descenso en la forma fisiológicamente activa del ABA (ABA-libre), con el consiguiente incremento de la capacidad germinativa. A diferencia de la dormición primaria, la dormición secundaria suele estar relacionada con los ciclos anuales de dormición en los bancos de semillas del suelo. Su eliminación suele producirse cuando las condiciones medioambientales en el suelo son las adecuadas para germinar.

La dormición depende tanto de las características fisiológicas como de las características morfológicas de la semilla. Por ello, se ha propuesto una clasificación que incluye cinco tipos de dormición: **fisiológica** (DF), **morfológica** (DM), **morfofisiológica** (DMF), **física** (Df) y **combinatoria** (DF + Df). La DF es la más abundante en todo tipo de semillas y puede, a su vez, dividirse en *no profunda* y *profunda* según que el tratamiento con GAs sea o no efectivo, respectivamente, para eliminarla (p. ej., *A. thaliana* y *Acer platanooides*). La DM se debe a un defecto en el crecimiento del embrión, el cual permanece durmiente hasta que su desarrollo ha finalizado con éxito (p. ej., *Acer graveolens*). Si la dormición se debe a una anomalía en el desarrollo del embrión y a la intervención de un componente fisiológico, se denomina DMF; para eliminarla se necesita calor y estratificación en frío, aunque en algún caso puede ser efectivo solamente un tratamiento de GAs (como ocurre en *Fraxinus excelsior*). La Df se debe a la impermeabilidad al agua de las células del tejido en empalizada de la cubierta seminal, responsable del control del movimiento del agua de imbibición; las cubiertas seminales duras comprimen el embrión, que no suele ser durmiente, y le impiden germinar (así sucede en las Fabáceas *Melilotus* y *Trigonella*). Para provocar la germinación en semillas con Df es preciso proceder a la escarificación (rotura o ablandamiento) física o química, o ambas, de la cubierta. La DF + Df aparece en semillas con cubiertas duras y va acompañada de una dormición fisiológica del embrión

(por ejemplo, en *Geranium* y *Trifolium*). Finalmente, y aunque no existen demasiadas pruebas experimentales, el tamaño del embrión parece ser determinante en la evolución de la dormición de las semillas en la escala biológica.

2.1. En la regulación de la dormición primaria está implicado el ABA

Aunque se sabe poco sobre la regulación y control molecular de los cinco tipos de dormición descritos anteriormente, existen muchos datos acerca de la **DF no profunda** (DFNP). Su estudio ha avanzado considerablemente en los últimos años, y se ha demostrado que la dormición del embrión y de los tejidos circundantes (endospermo, pericarpo y cubierta seminal, entre otros) está implicada en ella, y que la interacción entre el grado de dormición de ambas partes de la semilla determina la intensidad de la DFNP. Así, la resistencia mecánica que oponen el embrión y los tejidos envolventes cuando están durmientes parece ser una de las causas principales de la DFNP en semillas modelo, como la de *A. thaliana*.

Existen numerosas pruebas de que **el ABA es un regulador positivo** no sólo de la inducción de la DFNP sino también de su mantenimiento. Algunos hechos lo confirman:

- Una deficiencia en ABA durante las etapas finales de la embriogénesis cigótica provoca la ausencia de dormición primaria en la semilla madura, mientras que la sobre-expresión de genes de la biosíntesis de ABA induce el efecto contrario y el retraso en la germinación. Cruces recíprocos de plantas mutadas deficientes en ABA con plantas salvajes han permitido demostrar que la dormición primaria se induce solamente cuando la semilla en desarrollo sintetiza ABA en el endospermo y en el embrión. **El ABA materno no desempeña ningún papel en este tipo de dormición.** Por otra parte, el ABA exógeno provoca una respuesta temporal y espacial que es diferente a la del ABA endógeno, que la provoca permanentemente.
- El ABA localizado en las cubiertas seminales y en los tejidos que forman las vainas no contribuye a la dormición primaria. La dependencia de ABA en la dormición primaria quedó demostrada con plantas mutantes que tienen inhibida su biosíntesis (p. ej., la **mutación *sit*** de tomate produce semillas vivíparas con cubiertas seminales muy finas) o tienen escasa sensibilidad al ABA (p. ej., la **mutación *vp1*** del maíz) o bien mediante tratamientos con **fluridona**, un inhibidor de la síntesis de ABA.
- Se detectaron niveles altos de ABA durante el período inicial (imbibición) de la germinación de semillas con DFNP, disminuyendo con la desaparición de la dormición. La síntesis al inicio de la imbibición se interpreta como un mecanismo para mantener la dormición.
- **La DFNP parece depender del balance ABA/GAs;** es decir, la DFNP neta se caracteriza por un aumento en

la biosíntesis de ABA y una degradación de Gas, y la eliminación de este tipo de dormición es concomitante con la inhibición de la biosíntesis de ABA. Sin embargo, no siempre existe una correlación entre la concentración de ABA endógeno y el porcentaje de germinación, sobre todo en semillas secas viables que han sido almacenadas durante períodos más o menos largos. Tal vez el aumento de sensibilidad a las GAs durante el almacenaje sea la razón de estas respuestas.

- El ABA induce la dormición durante la maduración de la semilla, mientras que las GAs lejeren un papel relacionado con la eliminación del estado durmiente y promotor de la germinación; resultados recientes apuntan a que la **relación ABA:GAs es alta durante la DFNP**, mientras que para desencadenar la germinación se necesita que esa relación sea baja.

Además de lo expuesto más arriba, es necesario tener presente la **sensibilidad al ABA y GAs** de los tejidos implicados en la DFNP, la interconexión entre estas dos rutas de señalización, así como su regulación por el programa de desarrollo. La sensibilidad al ABA se modifica a lo largo del desarrollo de la semilla. La transición desde el estado de DFNP a la germinación va acompañada de un descenso en la sensibilidad al ABA concomitante con un aumento en la sensibilidad a las GAs. Asimismo, el estado durmiente se caracteriza por la transcripción de un buen número de genes, en especial de los que poseen en sus promotores **secuencias ABRE** (*abscisic responsive element*) y los correspondientes a los factores de transcripción que se unen a ABRE. Estos factores de transcripción son probablemente reguladores de la dormición de semillas. Por otra parte, durante la fase de imbibición de semillas con DFNP tiene lugar la inducción de varios genes que responden a Gas, fitohormonas que se sintetizan en el embrión con la intervención de la luz. El frío (estratificación), otro agente que hace desaparecer la DFNP, y la luz provocan la biosíntesis de GAs mediante la activación de la **GA 3-oxidasa**. Recientemente se ha demostrado que ambos factores ambientales (frío y luz) actúan mediante la interacción de los **factores de transcripción SPT** (*spatula*) y **PIL5** (*phytochrome-interacting-factor-like5*). En condiciones de oscuridad, SPT y PIL5 son represores activos de la germinación, mientras que en presencia de luz y frío, su actividad represiva es baja.

2.2. Las proteínas LEA y los azúcares desempeñan un papel importante en la tolerancia a la desecación de semillas

La etapa final del desarrollo de una semilla ortodoxa va acompañada de una pérdida considerable de agua. Sin embargo, las estructuras celulares de la semilla no se deterioran, debido a que adquieren tolerancia a la desecación, hasta el punto de que, una vez rehidratada la semilla, tiene lugar la reactivación de la actividad celular y el inicio de las actividades metabólicas implicadas en el desencadenamiento del proceso germinativo. Una de las respuestas inducidas

por el ABA en relación con la dormición primaria es la biosíntesis de **proteínas LEA** (*late embryogenic abundant*), las cuales contribuyen a la adquisición de la **tolerancia a la desecación** de las semillas. Las proteínas LEA son proteínas hidrófilas, ricas en aminoácidos no cargados e hidroxilados y con dominios muy conservados. **No son proteínas de reserva**. Se han caracterizado muchos genes LEA; en la actualidad estos genes se clasifican en: grupo I (p. ej., *Em*, *p8B6* y *D19*); grupo II, formado por los genes LEA propiamente dichos (*Rab 16*, *Rab 21* y *D11*, entre otros); y grupo III (*B19*, *D132*, etc.). Las proteínas LEA se unen a membranas y a proteínas celulares para preservarlas del estrés que provoca la pérdida de agua, y pueden ser inducidas también por heridas o por la sequía, tanto en semillas como en otros órganos de la planta. No es sorprendente, pues, que aún no se haya dilucidado si es el ABA o la sequedad lo que induce la síntesis de estas proteínas. Las semillas de *Avicennia marina* (recalcitrantes) son sensibles a la desecación, no producen ABA en el período embriogénico tardío y no se desecan en la planta madre, permaneciendo metabólicamente activas durante toda la embriogénesis, sin que exista una separación perceptible entre embriogénesis y germinación. **La falta de proteínas LEA en estas semillas** puede deberse a la ausencia de genes LEA o a la pérdida de competencia para transcribirlos, si los tuviera. Todo lo dicho parece apuntar a que, en semillas ortodoxas, la señal inducida por el ABA o la deshidratación se traduce en un buen número de familias proteicas, siendo una de ellas las LEA. Los mRNA de LEA se acumulan en semillas secas maduras y se degradan rápidamente con el proceso de imbibición previo a la germinación. Todavía no se ha demostrado si la señal provocada por ABA dentro de la «cascada» que ocasiona la estimulación de la transcripción de los genes LEA es la misma que tiene lugar en la desecación. Sin embargo, las proteínas LEA no parece que estén implicadas en la regulación de la dormición primaria. La función fisiológica de las proteínas LEA es estabilizar y proteger a otras proteínas y también, muy posiblemente, a las membranas para defender a la semilla durante el período de desecación, así como los complejos celulares durante el proceso de rehidratación, como se explicará más adelante.

La adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas, además de estar relacionada con el ABA, también lo está con la presencia de azúcares no reductores, con sistemas que secuestran radicales libres y con el grado de vacuolización. Es probable que durante el período de desecación ciertos azúcares (por ejemplo, sacarosa, rafinosa, verbascosa y estaquiosa, entre otros) reemplacen al agua sobre las superficies macromoleculares, facilitando la estabilización de las membranas. En semillas de *A. marina* se produce una notable disminución de sacarosa durante la desecación. Las semillas ortodoxas acumulan, en el período de desecación, reservas muy complejas en las vacuolas; **el grado de vacuolización disminuye** ostensiblemente para facilitar un mayor grado de estabilidad celular. Estas reservas complejas no parecen estar relacionadas con la tolerancia a la desecación. Sin embargo, las semillas de *A. marina* acumulan preferentemente reservas solubles, y sus células permanecen

muy vacuoladas, lo que podría contribuir al alto grado de sensibilidad a la desecación. Ahora bien, la tolerancia a la desecación no depende de un solo mecanismo de protección, sino que es una respuesta multifactorial y sinérgica en la que cada componente es igualmente esencial. En definitiva, la tolerancia a la desecación es una de las propiedades más importantes de las semillas, porque es necesaria para que se complete el ciclo biológico de la planta y porque capacita a la semilla para sobrevivir durante el almacenamiento o el estrés ambiental, asegurando de este modo su diseminación.

2.3. La dormición secundaria se induce por ausencia de señales medioambientales necesarias para la germinación

La dormición secundaria está vinculada fundamentalmente a las condiciones medioambientales, y se induce una vez que la semilla que la adquiere ha sido diseminada y la dormición primaria ha disminuido. En condiciones naturales, la dormición secundaria es inherente a muchas semillas integrantes del **banco de semillas del suelo** (conjunto de semillas de distintas especies que se encuentran en el suelo con diferentes grados de enterramiento y caracteres fisiológicos). Los cambios periódicos (anual o bianual) en la dormición secundaria pueden explicar la germinación estacional de las especies leñosas, entre otras. La dormición secundaria se induce cuando una semilla no durmiente no recibe la señal o señales externas necesarias para germinar. Si estos parámetros alcanzan unos valores óptimos para una semilla, tiene lugar el proceso germinativo. En términos fisiológicos, las semillas con dormición primaria y secundaria son diferentes, principalmente porque responden de forma distinta a un mismo factor estimulante de la germinación. **La temperatura** y, posiblemente, **el potencial hídrico (ψ)** del suelo son los factores que más determinan el carácter cíclico anual de la dormición secundaria. Paralelamente, otros estimulantes de la germinación, como la **luz** y el **NO₃**, colaboran en la eliminación de la dormición secundaria. Se ha postulado que las membranas biológicas podrían ser las «dianas» de la percepción de la temperatura. Por consiguiente, se supone que las alteraciones en sus propiedades están implicadas en la regulación de esta dormición (Fig. 27-8).

A diferencia de lo que sucede con la dormición primaria, los datos que existen en la actualidad sobre la dormición secundaria son básicamente descriptivos. Por tanto, sólo se puede especular sobre los posibles mecanismos que la provocan. Para facilitar el estudio de dichos mecanismos es necesario disponer de un sistema biológico en el que la reversión de la dormición secundaria y la inducción de la germinación estén separados. Pero este sistema todavía no se ha encontrado.

2.4. La pérdida de la dormición en las semillas

Aunque se conocen muchos aspectos relacionados con el inicio de la dormición primaria, la señal de su terminación no se

conoce con detalle. No obstante, es lógico pensar que pueda estar **relacionada con la señal que la produjo (ABA)**, es decir, con la pérdida de sensibilidad a esta hormona. La degradación del ABA-libre se registra durante el almacenamiento de las semillas secas. Esta desaparición se acelera a veces con altas temperaturas. Asimismo, las bajas temperaturas aceleran la salida del ABA al medio circundante en semillas totalmente hidratadas. Recientemente se ha demostrado que irradiaciones con luz roja o tratamientos con GA₃ consiguen eliminar la dormición, probablemente porque inducen la conjugación del ABA. Sea como fuere, la pérdida de la dormición primaria en semillas parece estar relacionada con un **incremento en la sensibilidad a las GAs**. Hasta ahora no se ha comprobado que una proteína concreta esté relacionada con la inducción de la germinación en semillas dormidas. Tampoco se ha demostrado ninguna relación con la respiración. Algunos datos apuntan a que las membranas pueden estar implicadas; pero no se sabe cuál es su mecanismo de participación.

Muchas semillas maduras almacenadas en seco y a temperatura ambiente durante varios meses (**after-ripening**) pierden la dormición primaria. Algunas de las alteraciones producidas durante el **after-ripening** que pueden inducir esta pérdida son: la ampliación del rango de temperatura para germinar, el descenso de la sensibilidad al ABA y de la concentración endógena de éste, el aumento de la sensibilidad a las GAs, la disminución de requerimientos de luz para germinar en aquellas semillas que no germinan en oscuridad, el incremento de sensibilidad a la luz en semillas que no germinan en luz, la pérdida de requerimiento de NO₃ y el aumento de la velocidad de germinación. Sin embargo, aunque el mecanismo molecular del **after-ripening** se desconoce se han propuesto como mecanismos implicados en la pérdida de la dormición primaria, entre otros, los siguientes: antioxidantes, reacciones no-enzimáticas que eliminan inhibidores de germinación, especies reactivas al O₂, alteración de membranas o degradación de proteínas «vía proteosoma».

La cubierta seminal y el endospermo desempeñan un papel muy importante en la desaparición de la DFNP. La rotura de la cubierta seminal y el «ablandamiento» del endospermo son procesos separados en el tiempo durante la germinación de varias especies (p. ej., *Nicotiana* y *Petunia*). La cubierta seminal puede provocar la DFNP en semillas debido a un impedimento en el crecimiento del embrión. Para que esta semilla deje de ser durmiente, el embrión deberá crear un potencial osmótico endógeno que genere fuerza suficiente como para atravesar la cubierta o, alternativamente, que disminuya la resistencia que opone la cubierta seminal mediante la acción de enzimas generadas por el tejido de reserva o por la propia radícula. Como se indicó anteriormente, la cubierta seminal es un tejido materno y, por consiguiente, **el fenotipo de la DFNP se hereda de la madre.** El requerimiento de GAs para la germinación de semillas de *A. thaliana* viene determinado por las características de la cubierta seminal, la capacidad de crecimiento del embrión y el contenido de ABA del propio embrión.

Por otra parte, el endospermo puede actuar como una barrera mecánica para la germinación de ciertas semillas. Es un

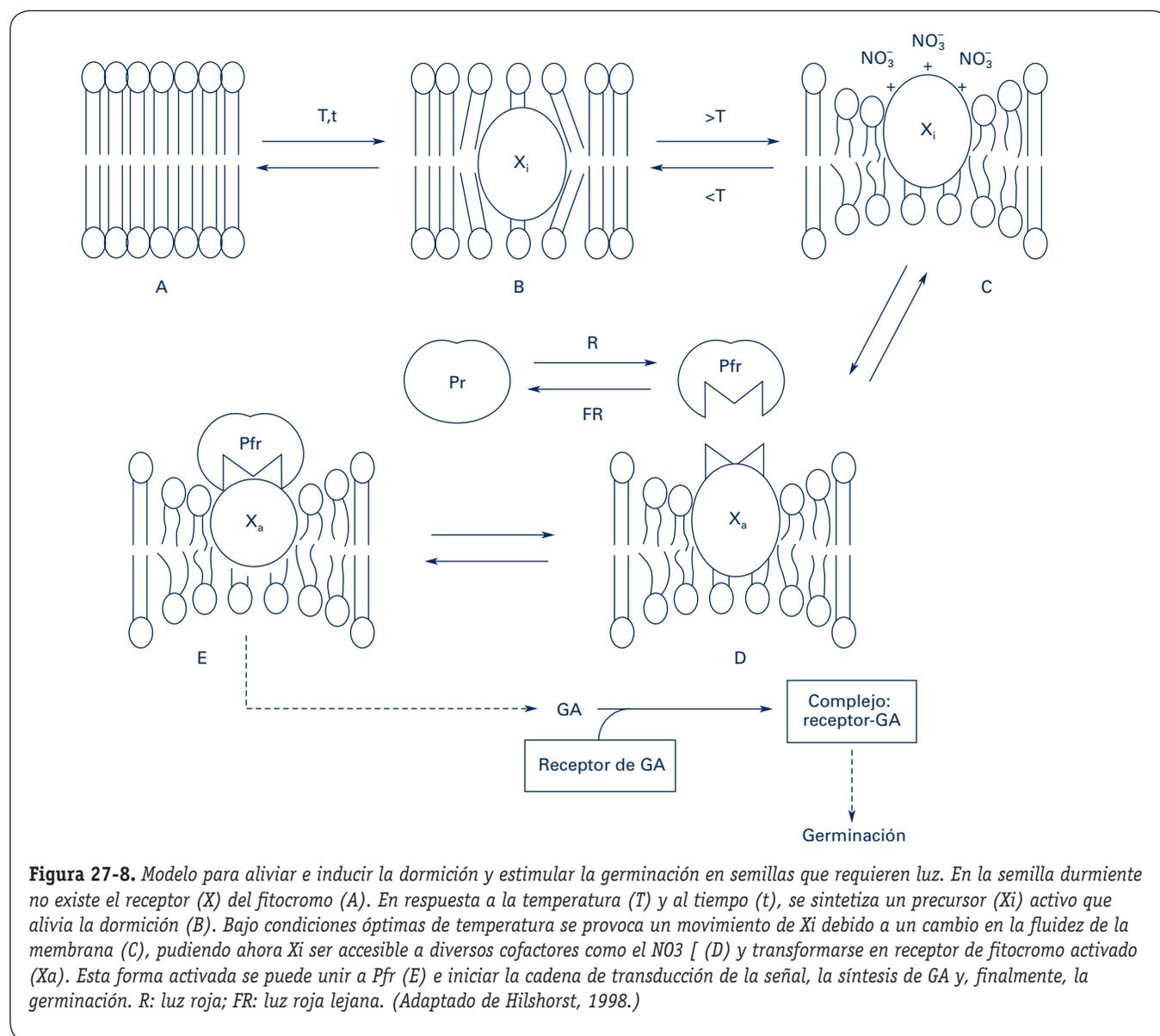


Figura 27-8. Modelo para aliviar e inducir la dormición y estimular la germinación en semillas que requieren luz. En la semilla durmiente no existe el receptor (X) del fitocromo (A). En respuesta a la temperatura (T) y al tiempo (t), se sintetiza un precursor (X_i) activo que alivia la dormición (B). Bajo condiciones óptimas de temperatura se provoca un movimiento de X_i debido a un cambio en la fluidez de la membrana (C), pudiendo ahora X_i ser accesible a diversos cofactores como el NO_3^- (D) y transformarse en receptor de fitocromo activado (X_a). Esta forma activada se puede unir a Pfr (E) e iniciar la cadena de transducción de la señal, la síntesis de GA y, finalmente, la germinación. R: luz roja; FR: luz roja lejana. (Adaptado de Hilshorst, 1998.)

requisito imprescindible para la germinación que se vence esta barrera mediante la disminución de la resistencia de la zona micropilar del endospermo (Fig. 27-9). **Este «ablandamiento» lo promueve las GAs y lo inhibe el ABA.** Sin embargo, actualmente no está claro si el «ablandamiento» es específico de las semillas con DFNP o si es la pauta general de la germinación. Existen semillas de gimnospermas en que el «ablandamiento» está perfectamente separado en semillas con DF de las carentes de ella. Resultados recientes en semillas de *Fraxinus excelsior* parecen demostrar que este «ablandamiento» micropilar es un proceso exclusivo de semillas con DFNP y que es bifásico: **la primera fase es insensible al ABA y la segunda la inhibe.** Tomando en su conjunto los datos existentes hasta la fecha, podemos decir que el control de la germinación por la cubierta seminal y el endospermo se efectúa mediante la intervención de varias enzimas relacionadas con la hidrólisis de componentes

estructurales de la pared celular (por ejemplo, endo- β -1,4-mananases y endo- β -1,3-glucanasas). Las β -1,3-glucanasas regulan el movimiento simplástico de ciertos compuestos (p. ej., GAs) mediante un **control de la deposición de la calosa** (β -1,3-glucano) en la luz del plasmodesmo. Así, **la dormición se relaciona con la acumulación de calosa**, mientras que las GAs provocan su degradación «vía β -1,3-glucanasas», la pérdida de la dormición y la posterior germinación de la semilla. La inducción por ABA de la inhibición de la expresión de la β -1,3-glucanasa en la zona micropilar del endospermo es un hecho constatado en semillas de solanáceas (así, en *N. tabacum*) y cucurbitáceas (como en *Cucumis melo*). Experimentos recientes en semillas de tomate hacen suponer que la β -1,3-glucanasa facilita el «ablandamiento» del endospermo mediante la rotura de la adhesión intercelular y provocando su separación. Todos los datos existentes se han obtenido mayoritariamente en semillas endospermicas.

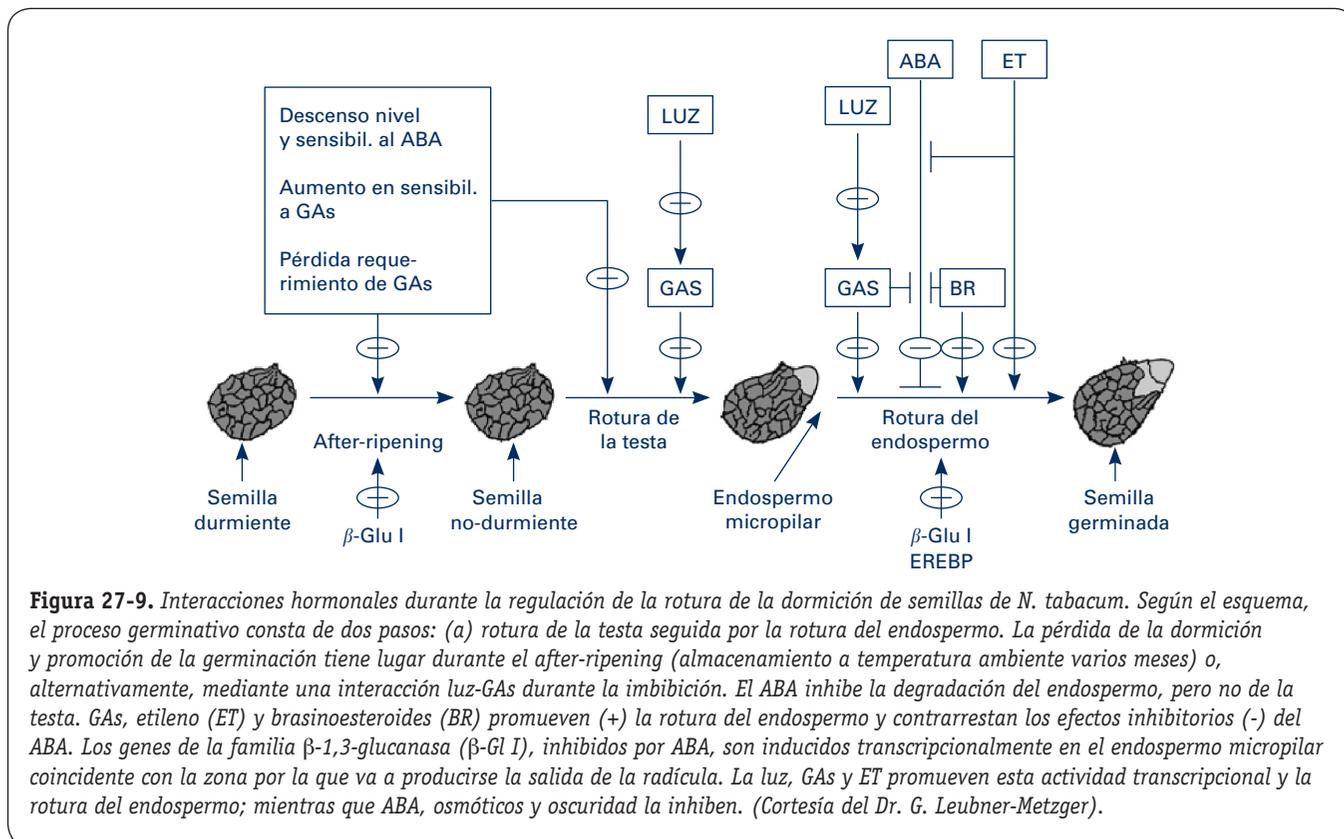


Figura 27-9. Interacciones hormonales durante la regulación de la rotura de la dormición de semillas de *N. tabacum*. Según el esquema, el proceso germinativo consta de dos pasos: (a) rotura de la testa seguida por la rotura del endospermo. La pérdida de la dormición y promoción de la germinación tiene lugar durante el after-ripening (almacenamiento a temperatura ambiente varios meses) o, alternativamente, mediante una interacción luz-GAs durante la imbibición. El ABA inhibe la degradación del endospermo, pero no de la testa. GAs, etileno (ET) y brasinoesteroides (BR) promueven (+) la rotura del endospermo y contrarrestan los efectos inhibitorios (-) del ABA. Los genes de la familia β-1,3-glucanasa (β-Gl I), inhibidos por ABA, son inducidos transcripcionalmente en el endospermo micropilar coincidente con la zona por la que va a producirse la salida de la radícula. La luz, GAs y ET promueven esta actividad transcripcional y la rotura del endospermo; mientras que ABA, osmóticos y oscuridad la inhiben. (Cortesía del Dr. G. Leubner-Metzger).

No obstante, el «ablandamiento» de la estrecha capa celular que constituye el endospermo en las Brassicáceas (semillas sin apenas endospermo y con cotiledones desarrollados) se ha demostrado recientemente, lo que confirma que ese endospermo tan incipiente también participa en el proceso de dormición. Sin embargo, parece que el **ABA solamente inhibe el «ablandamiento» del endospermo, y no el de la cubierta seminal.**

3. LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

La germinación es el proceso que se inicia con la toma de agua por la semilla seca (**imbibición**) y termina cuando una parte de ésta (eje embrionario en dicotiledóneas o radícula en monocotiledóneas y gimnospermas) atraviesa las estructuras envolventes que la rodean (**emergencia**). En el caso de las semillas endospermicas (como las de las gramíneas), la resistencia que oponen estas estructuras (testa y endospermo) al embrión es tan grande, que para que se produzca la emergencia es necesaria la degradación enzimática de varias zonas de dichas estructuras.

3.1. El agua de imbibición reactiva inmediatamente la actividad metabólica

La **toma de agua** por una semilla madura es trifásica: toma rápida inicial, fase de meseta (ψ entre 1 a 1.5 MPa) y nuevo

incremento en la absorción de agua, que se corresponde con el período de elongación del embrión o de la radícula. La duración de cada fase dependerá de las características de la semilla (tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de O_2 , etc.) y de las condiciones externas en las que se produce la imbibición (temperatura, composición del sustrato del suelo, contenido de humedad). Por razones no aclaradas todavía, las semillas que están en estado de dormición sólo atraviesan las dos primeras fases. Una semilla seca (5-10% de contenido en agua) tiene un ψ muy negativo (aproximadamente, 100 MPa), por lo que tiende a imbibirse muy deprisa (fase inicial), independientemente de que la semilla esté durmiente o sea viable. Esta fase tan rápida de absorción de agua provoca alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas de la semilla y, por consiguiente, una pérdida al medio circundante de solutos y diferentes metabolitos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos, péptidos, etc.). La pérdida de inhibidores de germinación (como los fenoles) y ABA también tiene lugar en esta fase de hidratación. Estas pérdidas pasivas de compuestos son un reflejo de la transformación de los componentes fosfolipídicos de las membranas desde una fase de gel (adquirida en la última etapa de la embriogénesis) a una fase de cristal-líquido hidratado provocada por el agua de imbibición. Esa transición puede ser retrasada o inhibida por la presencia de azúcares (sacarosa, oligosacáridos de la serie rafinosa y estaquiosa) o proteínas (como, por ejemplo, proteínas LEA). El hecho demuestra que, durante el proceso

embriogénico de la semilla, los azúcares y proteínas LEA implicados en la preservación de las membranas durante la masiva pérdida de agua se sintetizan antes de que se inicie la desecación. Concluida la fase inicial de la imbibición, las membranas recobran su configuración más estable y se reduce la pérdida de solutos. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual las membranas son reparadas una vez finalizada esta toma de agua tan brusca.

A los pocos instantes de iniciarse la imbibición de la semilla viable, se reanuda su **actividad metabólica**. Se asume que las estructuras y enzimas necesarias para tal fin deben estar presentes en la semilla seca; por consiguiente, han permanecido protegidas a lo largo de la desecación de ésta. Uno de los aspectos más importantes del metabolismo al inicio de la imbibición es la producción de ATP y la actividad respiratoria, la cual se detecta en pocos minutos. Algunas semillas producen etanol en esta fase, a causa del déficit de O_2 ocasionado por la falta de acceso de éste desde el exterior, debido a la impermeabilidad de la cubierta seminal al O_2 . Esta deficiencia interna de O_2 puede provocar más síntesis que utilización de piruvato. Asimismo, en esta fase de imbibición tiene gran importancia el ciclo de las pentosas-fosfato y la glicólisis. Las mitocondrias de las semillas secas están muy poco diferenciadas debido al proceso de desecación, pero contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs, así como oxidasas terminales, para producir ATP. Las semillas que almacenan almidón en sus cotiledones son capaces de reparar y activar las mitocondrias existentes en la semilla seca. En cambio, las semillas que almacenan lípidos producen nuevas mitocondrias. Así pues, la respiración de la semilla es fundamentalmente anaerobia durante los primeros instantes de la imbibición y se transforma en aerobia a medida que la radícula o el eje embrionario atraviesan los tejidos envolventes y la cubierta seminal. Algunas semillas son capaces de germinar en ambientes encharcados con escasez de O_2 (por ejemplo, la delarroz). En estas semillas es muy intensa la actividad del alcohol deshidrogenasa y del lactato deshidrogenasa, enzimas implicadas en la fermentación del piruvato producido durante la glicólisis del etanol o lactato, respectivamente. El crecimiento de la plántula en condiciones anaeróbicas se lleva a cabo mediante el aporte de O_2 desde la parte aérea a través de tejidos especiales (como el **aerénquima**).

La síntesis de DNA, preferentemente mitocondrial, tiene lugar durante el período de imbibición. También se han descrito procesos de reparación del DNA dañado a consecuencia de la desecación y rehidratación de la semilla. Por otra parte, todos los componentes (excepto los polisomas, necesarios para la iniciación de la síntesis de proteínas que se produce al iniciarse la toma de agua) están presentes en la semilla seca viable. A los pocos minutos de comenzar la imbibición, empieza la desaparición de ribosomas libres, porque éstos se integran en el complejo ternario de iniciación de la síntesis proteica. Ello significa que la proteínosíntesis inicial se efectúa sobre ribosomas «almacenados» en la semilla seca. Pasado un tiempo, se reanuda la síntesis de nuevos ribosomas. Por otra parte, la formación de polisomas en los primeros

instantes de la imbibición no es inhibida por inhibidores de la transcripción. Quiere ello decir que existe una población de mRNA «almacenados» en la semilla seca (p. ej., mRNA de la actina, tubulina y calmodulina) capacitados para formar polisomas. Estos mRNA, en forma de ribonucleoproteínas en el citoplasma o protegidos en el núcleo, permanecen en la semilla seca desde la última fase de la embriogénesis. Algunos mRNA «almacenados» y no protegidos (como los LEA y los *heat shock proteins*) son rápidamente degradados al inicio de la imbibición. Otros sirven para codificar proteínas cuya función en el proceso germinativo, si la tienen, está todavía por aclarar. Sea como fuere, la transcripción del mRNA se produce bastante rápidamente en el proceso de imbibición. Resumiendo, podemos dividir en dos grupos los genes expresados en el período de imbibición de las semillas viables: 1) los que codifican enzimas y otras proteínas necesarias para la actividad metabólica celular básica (p. ej., respiración, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, síntesis de membranas) y que están incluidas como proteínas de *housekeeping*, y 2) los que pueden estar implicados en procesos específicos de la germinación. Finalmente, la hidratación de la semilla provoca la hidrólisis de algunas formas «conjugadas» de fitohormonas y su transformación en «libres». Con éstas y con las de nueva síntesis se inicia la acción hormonal del programa de desarrollo que conduce a la germinación de la semilla.

3.2. Con la emergencia radicular finaliza la germinación y se inicia el crecimiento de la plántula

Se conoce como **emergencia radicular** el proceso por el cual la radícula o el eje embrionario atraviesan los tejidos envolventes y pasan de un metabolismo preferentemente anaerobio a otro típicamente aerobio. La emergencia marca el fin de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula. Este proceso lo conduce básicamente la elongación celular, y puede estar acompañado por actividad mitótica. A excepción de los embriones inmaduros, la división celular no parece relacionada con la emergencia ni es necesaria para que se produzca. Al igual que el crecimiento por elongación en otros tejidos, el crecimiento radicular (proceso que provoca la emergencia) deberá estar desencadenado por un **«ablandamiento» de la pared celular** y la acción posterior de la **presión de turgencia** de las células localizadas en la región subapical (zona de elongación). La señal que induce el inicio de la elongación y el mecanismo íntimo de ésta no se conoce. Sin embargo, existen tres posibilidades: 1) acumulación de solutos osmóticos para provocar el incremento de la presión de turgencia; 2) aumento en la extensibilidad de las paredes celulares, previo al inicio de la elongación, y 3) acción conjunta de los procesos de elongación de la radícula y relajación de los tejidos que la rodean (hidrólisis de los componentes polisacarídicos de la pared celular). En cuanto a la primera posibilidad, todavía no hay pruebas generalizables de la existencia de una variación en el potencial

osmótico de la zona subapical durante la germinación. En relación con el incremento en la extensibilidad de la pared celular, y en función de lo que se conoce sobre la bioquímica de su extensión, pueden estar implicados el xiloglucano (y, por ende, la actividad xiloglucano endotransglucosilasa, XET), así como las expansinas (que rompen los puentes hidrógeno que unen ciertos polímeros de la pared). Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado ninguna de estas dos proteínas en las semillas en germinación. Además, ambas están estimuladas por AIA, fitohormona que no está implicada en la promoción de la germinación. Por último, la tercera posibilidad está directamente relacionada con aquellas semillas que tienen la radícula comprimida por los tejidos que la rodean (endospermo, perispermo o megagametofito de las gimnospermas). Existen varias enzimas relacionadas con esta relajación: **endo-β-mananasa**, **β-manosidasa**, **celulasa** y **β_{1,3}-glucanasa**. La emergencia radicular es inhibida por ABA y otros compuestos (como los ácidos cumárico y *trans*-cinámico, entre otros compuestos fenólicos). Aunque el mecanismo inhibitorio del ABA es desconocido, se barajan dos posibilidades: 1) que dificulte el «ablandamiento» de la pared celular de la radícula, y 2) que altere el gradiente de ψ entre el medio y la propia semilla.

3.3. En la degradación de las sustancias de reserva están implicadas amilasas, peptidasas, lipasas, fitasas y fosfatasa

Tal como se describió en el apartado 1.2, durante el desarrollo de las semillas tiene lugar el almacenamiento de una serie de materiales de reserva en los cotiledones y el endospermo. Estas sustancias tienen la misión de alimentar a la plántula hasta que ésta adquiera competencia fotosintética y se convierta en un organismo autótrofo. Para que las sustancias de reserva puedan entrar a formar parte de este metabolismo heterotrófico de la plántula, es necesaria una **hidrólisis previa** de las mismas; de este modo dichas sus-

tancias podrán ser conducidas desde los órganos de reserva a estos órganos en crecimiento activo, a través de las rutas celulares correspondientes.

La mayor parte de los trabajos sobre movilización de las sustancias de reserva se ha llevado a cabo en monocotiledóneas, y en particular en gramíneas. En estas semillas el proceso está controlado por el embrión, ya que su ausencia impide la degradación del endospermo. Sin embargo, en ausencia del embrión podemos inducir la hidrólisis añadiendo GA₃ al medio, lo que demuestra que las GAs sintetizadas en el escutelo de ese órgano son las encargadas de inducir y controlar hormonalmente la hidrólisis (véase Capítulo 20). No es necesaria la síntesis *de novo* de GAs a partir del *ent*-kaureno. La actividad hidrolítica comienza en el **escutelo** (origen embrionario), el cual está rodeado por células aleuronares como el endospermo, y continúa después en el propio endospermo. Las «**células diana**» de las GAs son las células aleuronares (origen endospermico) a las que accede esta fitohormona procedente del embrión. En las células de los tejidos aleuronares existen los llamados **granos de aleurona** (cuerpos proteicos que contienen fitato cálcico y magnésico), gotas de lípidos y poco almidón. Tanto el escutelo como las células aleuronares pueden sintetizar enzimas hidrolíticas para degradar el almidón, pero su contribución a esta degradación no se conoce. Es posible que el escutelo realice su función al inicio del proceso germinativo. Las GAs inducen la síntesis y posterior secreción hacia el endospermo de la α-amilasa para iniciar la degradación del almidón; esta acción es inhibida por ABA. Además de la α-amilasa, las GAs están implicadas en la síntesis de otras enzimas hidrolíticas (Cuadro 27-2). Se puede decir que todos **los genes activados por GAs son susceptibles de ser inhibidos por ABA**. Por el contrario, genes inhibidos por GAs (p.ej., alcohol deshidrogenasa o el inhibidor de la α-amilasa) son activados por ABA. La α-amilasa (1 Ca²⁺/molécula) constituye aproximadamente el 70% de las proteínas aleuronares y su mRNA, el 15% de los «mensajeros» presentes. Esta enzima es sintetizada *de novo* en su totalidad, y su mecanismo de

CUADRO 27-2. Algunas enzimas inducidas por GAs en células aleuronales

Función	Enzima	Síntesis	Secretada
Hidrólisis del almidón	a-amilasas	de novo	sí
	b-amilasas	-	-
	a-glucosidasas	de novo	sí
Hidrólisis de lípidos	malato sintetasa	-	no
	isocitrato liasa	-	no
Hidrólisis de proteínas	carboxipeptidasas	-	sí
	cisteína proteinasas	de novo	sí
Hidrólisis de ácidos nucleicos Degradación de la pared celular	RNasas	de novo	sí
	xilanasas	de novo	sí
	arabinasas	-	sí
	(1-3, 1,4)-b-glucanasa	de novo	sí
Metabolismo delfósforo	fosfatasa	-	sí

secreción está muy conservado en la escala evolutiva. Las GAs están implicadas en el mantenimiento de la maquinaria de secreción enzimática de las células aleuronares mediante una elevación de los niveles de Ca^{2+} «libre» intracelular, que es necesario para el proceso de exocitosis. Este proceso también es impedido por ABA mediante un mecanismo desconocido. Por otra parte, la mayor parte de las enzimas que hidrolizan el almidón y las proteínas en el endospermo de los cereales tienen un pH ácido. El pH del endospermo también es ácido durante la imbibición de la semilla, debido a la alta concentración de **ácido málico**. Sin embargo, aunque el contenido de ácido málico desciende con la germinación, el pH se mantiene ácido porque las GAs provocan la entrada de ácido fosfórico y cítrico desde las capas aleuronares.

La movilización de **reservas de fosfato** tiene gran trascendencia en algunas semillas, ya que la fitina o el fitato es una fuente importante no sólo de fosfato, sino también de macronutrientes. La **fitasa**, abundante en las células aleuronares de semillas secas en cantidad suficiente como para hidrolizar la totalidad de reserva de fitina o fitato, produce cationes, fosfato y mioinositol, un precursor de algunos componentes estructurales de la pared celular primaria. En algunas gramíneas la fitina, localizada fundamentalmente en las capas de aleurona, almacena más del 50% del fósforo total de la semilla. Este sustrato es hidrolizado de forma paralela al crecimiento del embrión, al que es transportado el fosfato producido. No se ha demostrado la presencia de fitina en el embrión. En semillas de leguminosas se produce un patrón de comportamiento similar al de las semillas de cereales, aunque en aquéllas la **actividad fosfatasa** colabora con la fitasa (que es muy escasa en la semilla seca) para producir fosfato a partir de compuestos fosforilados. Tanto en las monocotiledóneas como en las dicotiledóneas, es muy probable que el embrión y el eje embrionario desencadenen la hidrólisis de las reservas fosforiladas.

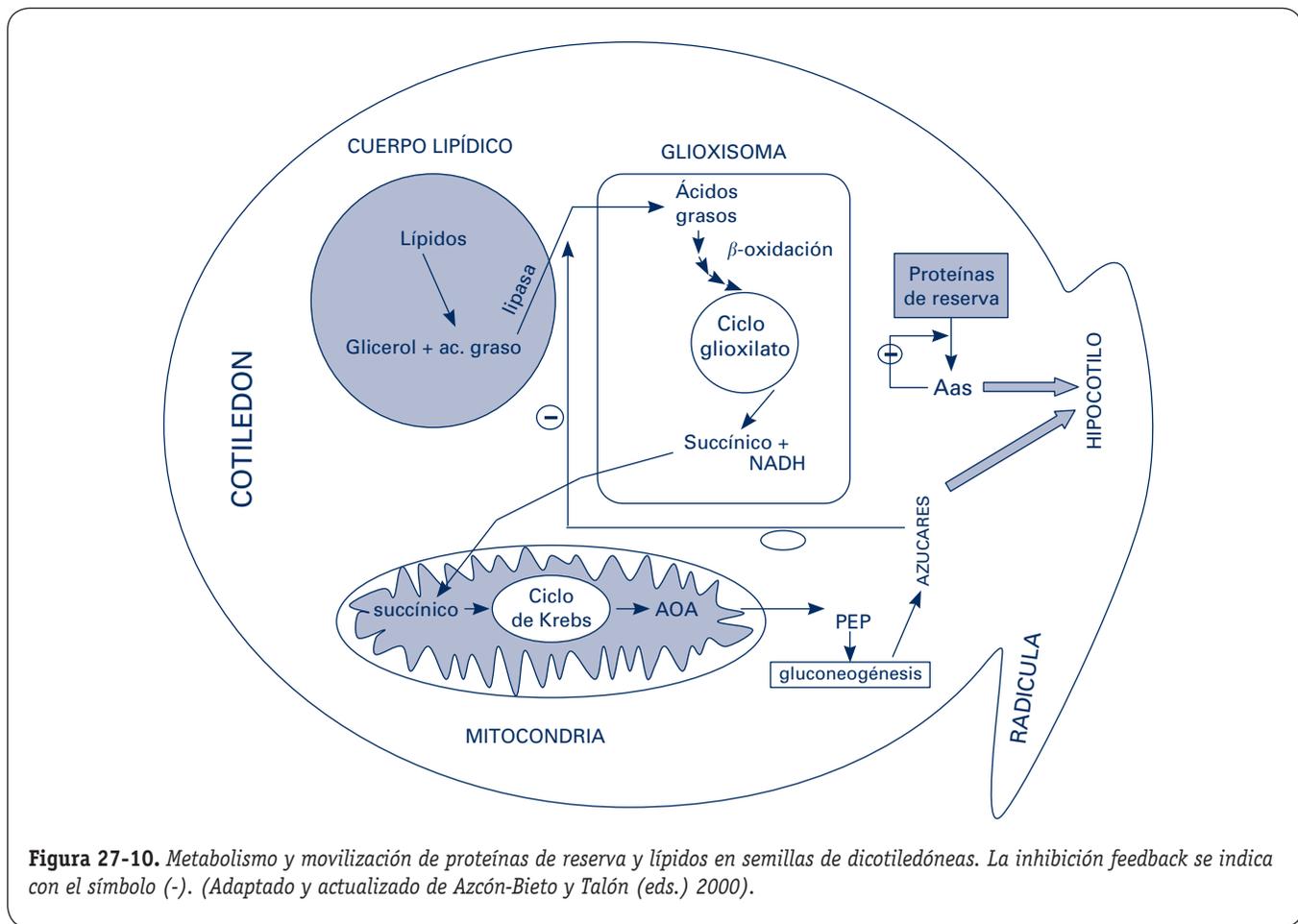
En cuanto a las proteínas de reserva, en las semillas de monocotiledóneas también se inicia la **proteólisis** por las células aleuronares. Estas células pueden liberar enzimas proteolíticas (endo y exopeptidasas) al endospermo, alguna de las cuales es inducida por GAs (Cuadro 27-2). Sin embargo, otras son enzimas sintetizadas en la embriogénesis y almacenadas en la semilla seca de forma que no se produzca la degradación de las proteínas solubles, sus más que probables sustratos. Estas enzimas no son inducidas por GAs. En semillas no endospérmicas, las enzimas que degradan las reservas son producidas por las células en las que se localizan las reservas (p. ej., los cotiledones). La actividad enzimática de las **endopeptidasas y exopeptidasas** (carboxi y aminopeptidasas, preferentemente) aumenta a medida que progresa la imbibición. En algunos casos, todavía se incrementan una vez finalizada la germinación. Sin embargo, no está claro por qué la actividad de alguna de estas enzimas disminuye a las pocas horas de iniciarse la imbibición, cuando todavía existe una gran concentración de proteínas de reserva en los cotiledones. Tal vez los aminoácidos producidos provoquen un *feedback* (retroalimentación) negativo, lo que explicaría ese comportamiento. Este *feedback* negativo sobre el control de

la expresión de genes pertenecientes a enzimas hidrolíticas se ha demostrado en la sacarosa y la glucosa (Fig. 27-10). Existe actividad proteolítica generada por la síntesis *de novo* y la activación de proteasas almacenadas en semillas secas. En algunos casos, la movilización de las sustancias de reserva es controlada por el eje embrionario, de manera similar a lo que ocurre en las gramíneas, pero existen semillas en las que el cotiledón es un órgano autónomo en el control de su degradación. Tal es el caso de los cotiledones ricos en almidón, el cual se degrada por la α -amilasa controlada por el propio órgano de reserva.

Respecto a la **degradación de sustancias de reserva** lipídicas (que se almacenan en forma de gotas en el interior de orgánulos próximos a los glioxisomas), se producen ácidos grasos y glicerol a partir de triacilglicérols durante la germinación de semillas de Angiospermas (Fig. 27-10). Los ácidos grasos se transportan al glioxisoma para ser hidrolizados, mediante β -oxidación, a acetil-CoA, el cual ingresa en el ciclo del glioxilato (la malato sintetasa y la isocitrato liasa son las enzimas más importantes implicadas en la transformación del glioxilato) y, posteriormente, se producen azúcares en el citoplasma. De forma similar se degradan los lípidos de reserva en las Gimnospermas, en donde también se han detectado lipasas y glioxisomas. El control de la degradación de los lípidos de reserva por el eje embrionario o por el embrión no se ha demostrado.

3.4. GAs, ABA y etileno tienen un papel activo en la regulación hormonal de la germinación

Las GAs desempeñan un papel muy importante en la germinación de semillas de cereales mediante la inducción de la síntesis de α -amilasa y su posterior secreción desde las capas aleuronares al endospermo (véase el apartado 3.3). Este proceso es inhibido por ABA (véase Capítulo 22). El balance entre GAs y ABA, así como la sensibilidad a ambas fitohormonas, son dos aspectos que hemos de tener muy presentes al estudiar el control de la germinación. Algunas pruebas experimentales provienen del empleo de mutantes. Así, 1) las mutaciones *sitiens*, *aba* y *rdo* (que tienen disminuida la síntesis de ABA en las semillas) necesitan niveles de GAs más bajos para germinar que las semillas «salvajes»; 2) las mutaciones *ga1* o *gib1* (con síntesis de GAs disminuida en la semilla) necesitan estas fitohormonas para germinar; 3) las semillas con mutaciones que las insensibilizan al ABA necesitan niveles altos de ABA y apenas necesitan GAs para germinar; y 4) las mutaciones insensibles a GAs (como las *gay* y *spy* en *Arabidopsis*) precisan niveles de ABA menores que las semillas «salvajes» para que se inhiba la germinación. No obstante, estos experimentos solamente se han llevado a cabo con semillas de tomate y *Arabidopsis*. Las GAs también pueden controlar la germinación induciendo la síntesis de enzimas que hidrolizan los galactomananos (β -endo-mananasas), componentes estructurales de la pared celular de los tejidos envolventes del embrión (zona



del endospermo que rodea el extremo de la radícula). En semillas de tomates deficientes en GAs, solamente se induce el aumento de esta enzima después de un aporte exógeno de GAs; esta inducción se inhibe con ABA. Estudios recientes han demostrado que una isoforma de β -endo-mananasa inducida por GAs no es inhibida por el ABA, mientras que otros miembros de esta familia de enzimas se expresan en el endospermo en fases posteriores a la emergencia radicular. Todo ello apunta nuevamente a un control muy estricto de la acción hormonal por parte del programa de desarrollo de la especie en cuestión.

En la última década se han estudiado en profundidad las implicaciones del etileno en el proceso germinativo de las semillas (Matilla, *Seed Science Research*, 10:111-126, 2000).

En muchas de ellas el etileno estimuló la germinación, tanto en semillas durmientes como en no durmientes. En cambio, en otras semillas el etileno no tuvo efectos sobre la emergencia radicular o fue un inhibidor. También se ha observado la capacidad del etileno para revertir la inhibición de la germinación provocada por ABA y ciertos tipos de estrés (como el osmótico y el térmico). La retirada del etileno de la atmósfera que rodea a alguna semilla inmersa en un medio apto para germinar provoca la inhibición de la emergencia radicular, lo que parece indicar que este gas es

un estimulador endógeno de la germinación. En semillas de *Cicer arietinum* (leguminosa) y *Brassica rapa* (crucifera) se ha demostrado que la producción de etileno y la expresión y actividad de la ACC-oxidasa están reguladas espacial y temporalmente durante el desarrollo y la germinación (Fig. 27.11). Sin embargo, algunos autores siguen opinando que el etileno es una consecuencia del proceso germinativo, más que una condición necesaria para que éste tenga lugar. Pese a que los conocimientos sobre el papel del etileno durante el desarrollo y germinación de semillas son todavía muy fragmentarios, la existencia de mutantes ha permitido empezar a comprenderlo. La mutación *etr1-1* insensibiliza las semillas de *Arabidopsis* al etileno e incrementa su sensibilidad al ABA, mientras que la mutación *ein2* produce semillas con gran sensibilidad al ABA y muy poca al ET. Consecuentemente, las rutas de señalización del etileno y el ABA parecen muy relacionadas. Los resultados con éstas y otras mutaciones indican que la dormición de semillas en *Arabidopsis* está regulada negativamente por el etileno endógeno, hecho éste que se suponía, pero que no pudo ser demostrado hasta que se obtuvieron los mutantes adecuados. En definitiva, el etileno contrarresta el efecto del ABA mediante una disminución de la sensibilidad de la semilla al ABA endógeno. Los escasos datos existentes hasta la fecha indican que el etileno, por sí solo, no es capaz de regular positivamente la germinación

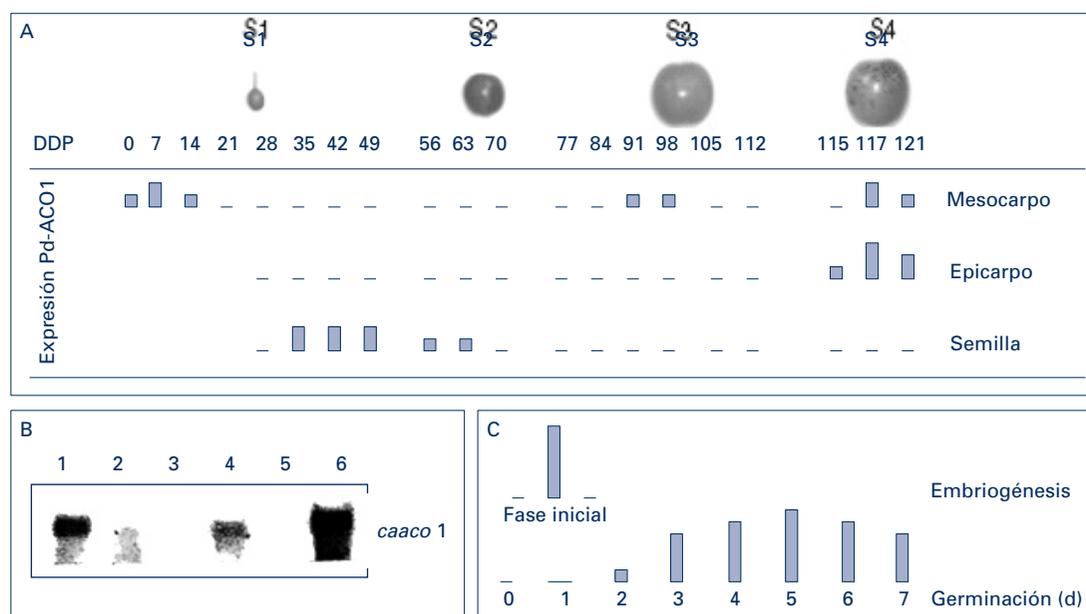


Figura 27-11. Expresión génica de la ACC-oxidasa (ACO1) durante la embriogénesis y germinación de semillas de *Prunus domestica* (rosácea) (A), *Cicer arietinum* (leguminosa) (B) y *Brassica rapa* (crucífera) (C). El panel A refleja el estudio comparativo durante la embriogénesis de la expresión ACO1 entre las semillas y otros órganos del fruto. El panel B indica la expresión de ACO1 durante la embriogénesis (1,2), la desecación (3,4) y la germinación (5,6) de semillas de garbanzo (los números impares corresponden al cotiledón y los pares, al eje embrionario). En el panel C se indica la expresión durante la embriogénesis y germinación de semillas de nabiza. DDP: días después de la polinización.

de semillas, y que en algún momento del proceso inductor parece necesaria una interacción entre las rutas de señalización de ABA y etileno. Recientemente se han conocido una serie de datos que sugieren que la señalización del etileno regula el metabolismo de otras fitohormonas o está muy relacionada con dicho metabolismo. Así, las variaciones en

los niveles hormonales durante la germinación de semillas de *Arabidopsis* obtenidas del mutante *etr1-2* (dominante insensible al etileno con un alto nivel de dormición) sugieren que estas semillas requieren niveles mayores de GAs que las semillas «salvajes» para promover la emergencia radicular en ausencia de señalización de etileno.



RESUMEN

La semilla es el órgano que permite la dispersión, propagación y perpetuación de las plantas espermatofitas. Se admite que aproximadamente el 97% de las plantas que pueblan la superficie terrestre son espermatofitas. La estructura de la semilla y su fisiología están adaptadas para actuar como unidad de dispersión. La semilla posee reservas que alimentarán a la nueva plántula hasta que ésta pueda establecerse como un organismo fotosintéticamente competente, autótrofo. La aparición de la semilla en el ciclo vital de las plantas superiores constituyó un proceso de adaptación único, ya que mediante ella se asegura que la planta madre sobreviva en la generación siguiente, aun en condiciones ambientales adversas. En la semilla se reflejan, por tanto, todos los procesos adaptativos de la planta progenitora.

Una vez que la semilla se ha formado mediante la embriogénesis, paraliza su desarrollo durante un período de tiempo, acumula sustancias nutritivas en los órganos de reserva y, finalmente, se deseca, dispersa y, cuando las condiciones del medio son favorables para germinar, inicia la regeneración de la planta madre. En este estado de desecación, la semilla puede adquirir diferentes formas de dormición, un proceso de enorme importancia en la supervivencia. Durante este período de dormición, la semilla mantiene su viabilidad a costa de una actividad metabólica basal. El ABA es el factor hormonal inductor de la dormición. Sin embargo, las características genéticas de la semilla, el programa de desarrollo y una serie de factores medioambientales inducen el grado y la intensidad de la dormición. Hasta ahora no se ha logrado aislar y caracterizar a nivel fisiológico y molecular ningún gen que tenga una relación directa con la dormición. Las GAs,

RESUMEN



las temperaturas bajas o la absorción de luz roja «*vía fitocromo*» son algunos de los factores implicados, individual o conjuntamente, en la pérdida de la dormición primaria. Es posible que la interacción de la señalización del ABA y GAs sea un mecanismo importante en la ruptura de la dormición.

Las etapas que constituyen la germinación de una semilla implican una regulación temporal y espacial del crecimiento y desarrollo de las células y de los tejidos que la forman. Durante la germinación se reactiva la proteinosíntesis y otros procesos metabólicos, las membranas vuelven a adquirir su permeabilidad diferencial y el DNA es reparado para reanudar sus funciones génicas. La emergencia de la radícula es una consecuencia de la elongación, y no de la mitosis, y se lleva a cabo porque los tejidos que la rodean sufren un proceso de «ablandamiento» provocado por el desmantelamiento de la estructura de la pared celular. Los niveles, la sensibilidad tisular y la señalización de varias fitohormonas cambian drásticamente durante estos procesos secuenciales, de lo que se deduce que están relacionadas con ellos. Dos de ellas, GAs y ABA, y probablemente el etileno, tienen funciones clave en el inicio y mantenimiento de la germinación. Sin embargo, el mecanismo por el que las fitohormonas controlan la germinación está lejos de conocerse en detalle. En este capítulo se ofrece una visión fisiológica y molecular de las características y funcionamiento de la semilla, así como de los acontecimientos que tienen lugar durante su desarrollo y de las alteraciones que necesita para adquirir el estado de dormición y para prepararse y completar la germinación.

AGRADECIMIENTOS



Agradezco al Ministerio de Educación y Cultura [DGICYT (CGL20004-01996)] y a la Xunta de Galicia (PGIDITO-4RAG203010PR) su subvención a la Investigación. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a todos los integrantes del Grupo de Investigación que dirijo por su colaboración en la confección de varias de las figuras que aparecen en este capítulo.

PROBLEMAS Y CUESTIONES



- | | | | |
|---|--|----|--|
| 1 | ¿Cómo puede inhibir la cubierta seminal el proceso germinativo? | 7 | ¿En qué consiste la estratificación de una semilla? |
| 2 | ¿Puede realizar la imbibición una semilla no viable? | 8 | ¿Por qué en especies salvajes las semillas no maduran todas al mismo tiempo? |
| 3 | ¿Cuáles son los principales efectos del agua de imbibición en la germinación de una semilla? | 9 | ¿Cuál es la ruta de «descarga» de fotoasimilados en una semilla? |
| 4 | Diferencias entre quiescencia y dormición. | 10 | ¿Cómo demostraría que el ABA y el etileno contribuyen al proceso de germinación de semillas? |
| 5 | ¿Cuál es la función de las proteínas LEA en el proceso de desecación de la semilla? | 11 | ¿Qué es un banco de semillas? |
| 6 | ¿Hay alguna semilla que se comporte de manera vivípara en la planta madre? | | |



RESPUESTAS A LOS PROBLEMAS Y CUESTIONES

- 1 Limitando la absorción de agua y el intercambio de gases entre el embrión y el medio que rodea la semilla; puede también impedir la pérdida de compuestos inhibidores de la germinación (p. ej., ABA); si la cubierta seminal es dura, impide la emergencia a modo de barrera física.
- 2 El proceso de imbibición es físico y, por consiguiente, va a depender de la conductancia hidráulica entre la semilla en cuestión y el medio. Evidentemente, esta imbibición no provocará nunca procesos relacionados con la germinación.
- 3 Reactivar el metabolismo que estaba a un nivel basal en la semilla seca, provocar crecimiento por elongación celular y desencadenar la emergencia radicular.
- 4 A diferencia de una semilla durmiente, la semilla quiescente puede germinar si se dan las condiciones óptimas para ello.
- 5 Proteger y estabilizar proteínas enzimáticas y estructurales, otras macromoléculas y sistemas de membrana durante la desecación de la semilla. Así, todo este material biológico permanece preservado y dispuesto para reactivarse una vez que se inicie el proceso de imbibición.
- 6 Sí; las producidas por plantas mutantes deficitarias en ABA. También, ciertas semillas recalcitrantes que no poseen período de desecación durante su embriogénesis y, por tanto, no tienen un mecanismo de separación entre el período de formación de la semilla y su germinación.
- 7 Una semilla sometida a regímenes de frío, bien en el medio natural o en el laboratorio, durante períodos más o menos largos, se dice que está estratificada. Este tratamiento puede, en algunos casos, romper la dormición. A veces, el frío puede ser simulado con tratamientos de GA.
- 8 Para que la perpetuación de la especie esté asegurada. La aparición de un cambio brusco en un parámetro ambiental esencial para la germinación haría peligrar la especie que dispersó todas sus semillas maduras al unísono.
- 9 No hay conexiones vasculares entre los tejidos vegetativos de una planta y los órganos de reserva de sus semillas. Quizá las haya con las cubiertas seminales. Por tanto, los fotoasimilados deben ser «descargados» en el apoplasto de la semilla sin que se produzca una hidrólisis previa. No obstante, algunas semillas eligen las «vías» convencionales existentes en las relaciones «fuente-sumidero».
- 10 Mediante el empleo de mutantes de la síntesis o señalización de estas fitohormonas.
- 11 El conjunto de semillas de diferentes especies y variedades enterradas en mayor o menor grado en un determinado suelo.



BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Azcón Bieto J, Talón M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Madrid, McGraw-Hill, Interamericana, 2000.
2. Bewley JD. Breaking down the walls: A role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy. *Trends in Plant Science*, 1997; 2: 464-469.
3. Bewley JD. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 1997; 9: 1055-1066.
4. Davies P J. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Kluwer Academic Publishers, 2004.
5. Hilshorst H W M. The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research*; 1998, 8: 77-90.
6. Hilshorst H W M. A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. *Seed Science Research*; 1995, 5:61-74.
7. Kigel, J, Galili G. *Seed Development and Germination*. New York, Marcel Dekker, 1995.
8. Marion-Poll A. ABA and Seed Development. *Trends in Plant Scienc*, 1997; 2: 447-448.
9. Matilla A.J..Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 2000;10:111-126.
10. Misra S. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: Biochemical and molecular advances. *Seed Science Researc*, 1994: 4: 357-384.
11. Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosíntesis and catabolism. *Annual Review Plant Biology* 2005; 56: 165-185.
12. Yamaguchi S, Nambara E. Seed development and germination. En: Hedden P. Thomas SG (eds). *Annual Plant Reviews*, Blackwell Publishing, 2006; 24: 310- 338.