

Influencia de las cubiertas seminales en la germinación de semillas de citrange Troyer

por GRACIA ZABALA y J. L. GUARDIOLA

Cátedra de Fisiología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Valencia.
I.N.I.A. Centro de Levante. Burjasot (Valencia)

Recibido el 10 - X - 74

A B S T R A C T

ZABALA, G. AND J. L. GUARDIOLA, 1974. — The influence of the seed coats in the germination of Troyer citrange seeds. *An. Aula Dei*, **12** (3/4): 188-201.

The germination of Troyer citrange seeds is inhibited by the inner seed coat, which is impermeable to water and hence interferes with embryo hydration, the embryo itself being not dormant. This inhibition is overcome by piercing the coat, the location of the puncture either at the micropylar or the chalazal end of the seed being irrelevant.

Presoaking the seeds with water at 50°C for 24 hours or with a 1 to 2,5 p.p.m. solution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, accelerates germination. Gibberellic acid on the other hand has no effect on germination, but influences greatly the growth of the seedlings.

INTRODUCCION

La germinación de las semillas de citrange Troyer (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington navel × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), como la de otros agrios, es un proceso lento y escalonado notablemente en el tiempo. La emergencia de la radícula, primer síntoma visible de la misma, tiene lugar en algunas semillas pocos días después de la siembra, mientras que en otras, por el contrario, tarda más de un mes. Ello origina una desigualdad en el semillero y, como consecuencia, una disminución en el número de plantas

aprovechables. La velocidad de germinación puede aumentarse notablemente manteniendo las semillas durante varias semanas a 4 °C en atmósfera húmeda (BUTTON, BORNMAN y HACKLAND, 1971), lo que sugiere la existencia de un fenómeno de latencia (VILLIERS, 1972). En este trabajo se estudia la naturaleza de esta latencia y la posibilidad de su eliminación con anterioridad a la siembra.

MATERIAL Y METODOS

Las semillas utilizadas en estas experiencias se extrajeron del fruto maduro de un árbol de citrange Troyer, se lavaron con agua y se trataron con un fungicida, conservándose a baja temperatura (4-8 °C) hasta su utilización. Los tratamientos y la conservación no afectaron la viabilidad de las semillas pero sí su velocidad de germinación, ligeramente superior a la de las semillas recién extraídas.

Inmediatamente antes de su uso las semillas se desinfectaron en superficie manteniéndolas durante veinte minutos en una solución de hipoclorito cálcico al 2 %, lavándose después con agua. A continuación se pusieron a germinar en una habitación termostatazada a 26 ± 1 °C (MONSELISE, 1959) sobre varias capas de papel de filtro empapadas de agua o de la solución deseada, estimándose que una semilla estaba germinada cuando la longitud de su radícula era de 2 mm. Después de la germinación las plántulas se transplantaron a un recipiente con vermiculita saturada de agua, y se mantuvieron a 26 ± 1 °C, con una iluminación continua de 3.000 luxes. En las experiencias en que se determinó la influencia de las cubiertas seminales en la germinación, aquellas se eliminaron manualmente después de la desinfección, añadiéndose al medio de germinación una mezcla de captan y faltan a partes iguales a una concentración final del 0,4 %.

Todas las experiencias se realizaron al menos dos veces, y los porcentajes de germinación se determinaron sobre un mínimo de 100 semillas. Como las semillas de citrange Troyer son poliembriónicas, normalmente se obtuvo más de una planta por semilla; sólo se tomó en consideración en los conteos un embrión por semilla, aquel de germinación más rápida.

RESULTADOS Y DISCUSION

a) *Influencia de las cubiertas seminales en la germinación*

A excepción de las semillas con embrión poco desarrollado en la madurez, los mecanismos de latencia pertenecen a una de las categorías siguientes (NIKOLAEVA, 1969):

- A) La existencia de una latencia innata del embrión;
- B) Una latencia impuesta por las cubiertas.

Sólo el segundo de los mecanismos citados actúa en las semillas de citrange Troyer (fig. 1). La totalidad de los embriones desnudos iniciaron el crecimiento siete días después de la siembra en todas las experiencias y aun antes, mientras que por el contrario,

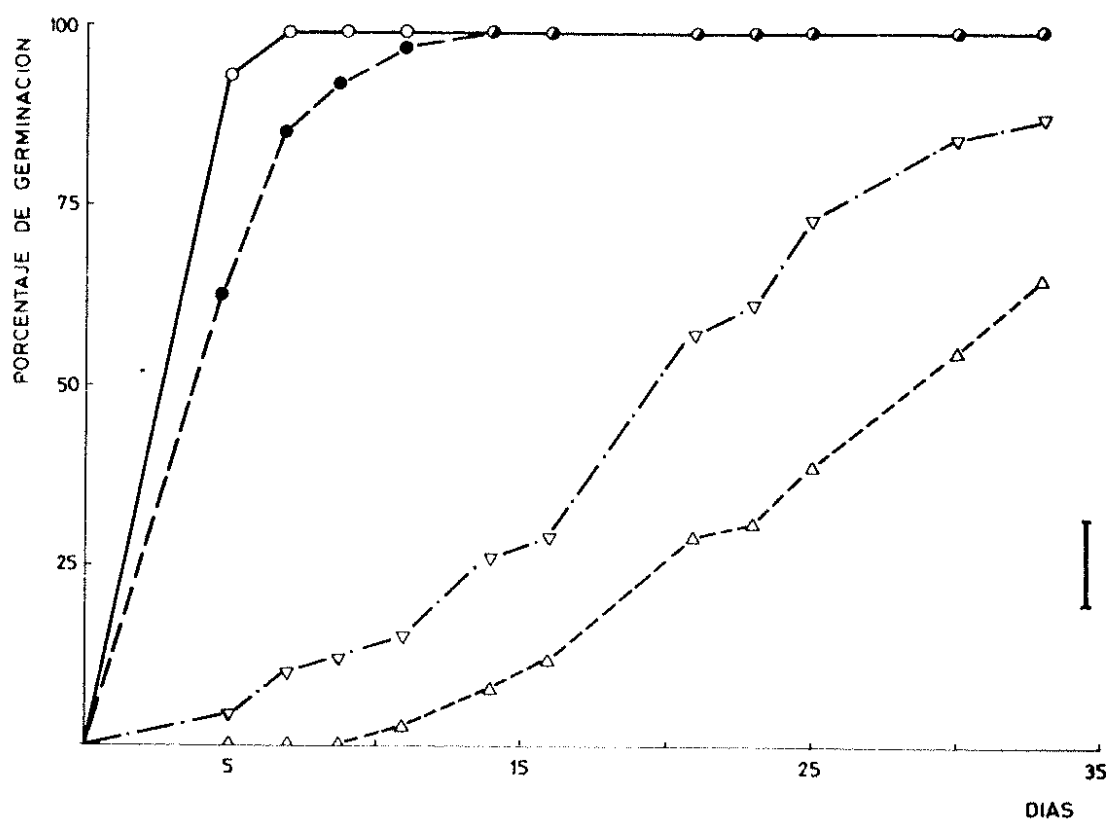


FIG. 1. Velocidad de germinación de semillas de citrange Troyer intactas (Δ — — — Δ), desprovistas del tegumento externo (∇ — — — ∇), desprovistas de ambos tegumentos (O — — — O), y desprovistas del tegumento externo y con el interno roto en la región micropilar (\bullet — — — \bullet).

en las semillas intactas la germinación no se inició hasta diez días después de la siembra, y el día 34 sólo el 65 % de las semillas presentaban síntomas visibles de la misma.

Sólo la cubierta seminal interna (tegmen), fina y membranosa, parece ser efectiva en el mantenimiento de la latencia. La eliminación de la testa sólo tuvo una influencia pequeña, aunque significativa, en la velocidad de germinación, y la posibilidad de que este efecto se deba a que su eliminación haya producido lesiones imperceptibles en el tegmen no puede ser excluida, particularmente habida cuenta la marcada influencia de la integridad del tegumento interno en la velocidad de germinación (ver más adelante).

b) *Mecanismo de latencia*

En algunas semillas, particularmente aquellas en que el pericarpio forma una unidad estructural con las cubiertas seminales, el efecto inhibidor de las cubiertas en la germinación es debido a la presencia de inhibidores que, en ocasiones, se han identificado como ácido abscísico (BLACK y WAREING, 1959; JACKSON y BLUNDELL, 1966). A fin de dilucidar su existencia en las cubiertas de citrange Troyer, éstas se extrajeron en un triturador tipo Virtis con metanol del 70 % y el extracto obtenido se fraccionó del modo indicado en la figura 2. Una parte alícuota de las fracciones obtenidas se añadió sobre una pieza circular de papel de filtro, se secó a temperatura ambiente a fin de eliminar el metanol, y se colocó en una cápsula Petri con 3 ml. de agua, poniéndose a germinar en ella veinte embriones desprovistos de tegumentos.

En ningún caso se encontró una influencia apreciable de los extractos en el crecimiento del embrión, aun cuando la cantidad añadida correspondía en ocasiones a tres cubiertas seminales por embrión, siendo la longitud de la radícula superior a los 3 mm. en todos los embriones al cabo de cinco días. Como por otro lado, la rotura del tegmen por la región micropilar basta para asegurar la germinación inmediata (fig. 1), es evidente por tanto que el efecto de las cubiertas no está relacionado con la presencia de inhibidores en las mismas, siendo debido posiblemente a (1) una constricción mecánica del embrión, o (2) una interferencia con los intercambios entre el embrión y el medio.

Aunque la fuerza necesaria para romper el tegmen membranoso de muchas semillas no es muy grande, en algunos casos puede

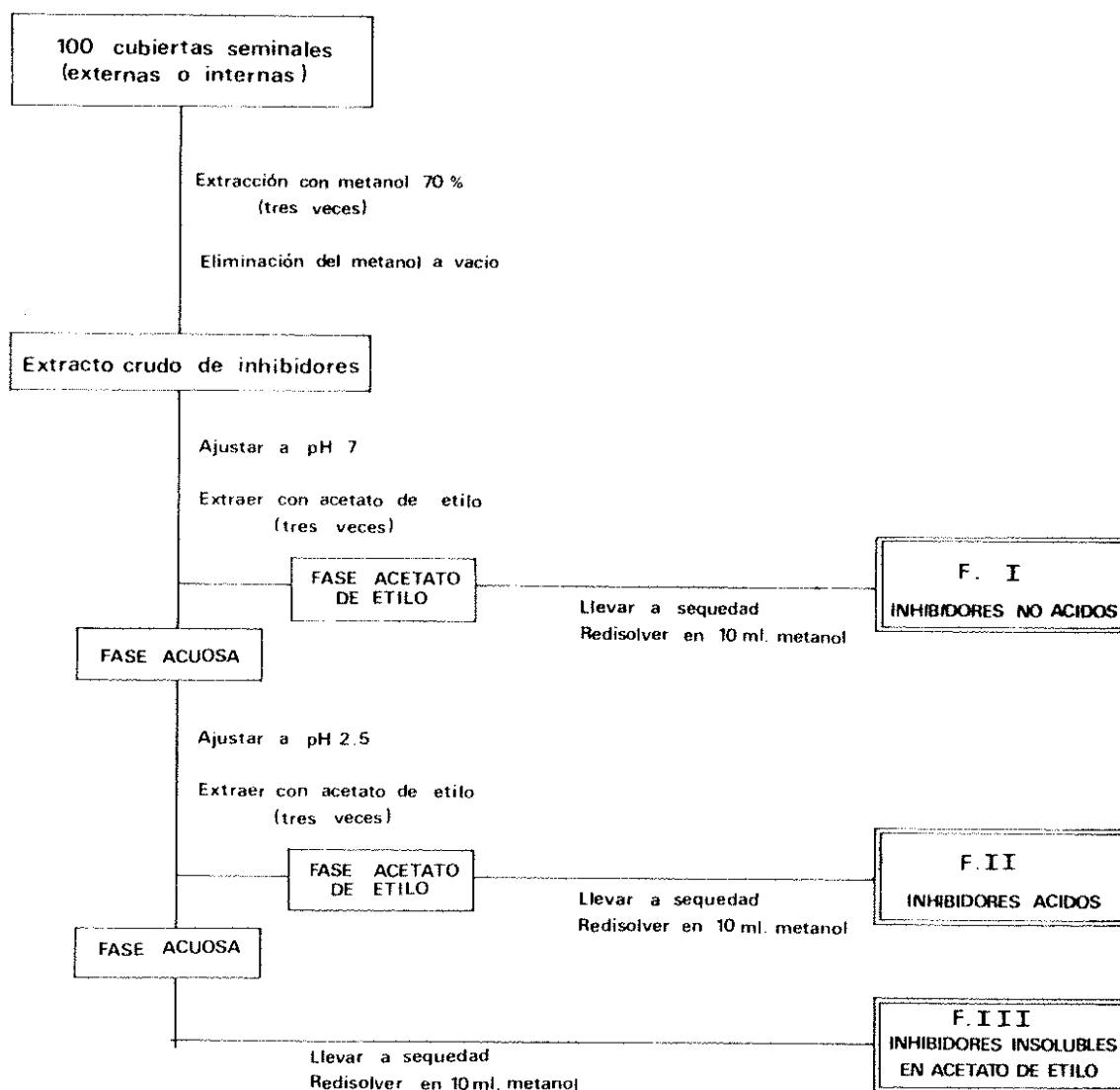


FIG. 2. Esquema del fraccionamiento del extracto de cubiertas.

superar la presión ejercida por la semilla durante la imbibición y, de este modo, impedir la germinación (ESASHI y LEOPOLD, 1968). Sin embargo, los resultados presentados en la figura 3 excluyen la posibilidad de este mecanismo en las semillas objeto de este estudio. Una perforación de un diámetro inferior a 2 mm. basta para provocar la germinación inmediata con independencia de su localización y, si bien la perforación en la región micropilar elimina toda resistencia mecánica a la expansión de la radícula, la perforación en la región calazal se considera que no tiene influencia alguna al respecto (WEBB y WAREING, 1972). La influencia pequeña pero sig-

nificativa de la posición de la perforación en la velocidad inicial de germinación, puede ser debida al criterio de germinación utilizado, ya que la presencia del tegumento interno puede interferir con su detección en los primeros estadios. Las determinaciones de peso fresco y peso seco del eje embrionario (plúmula + radícula) no señala diferencias entre ambos tratamientos (tabla 1).

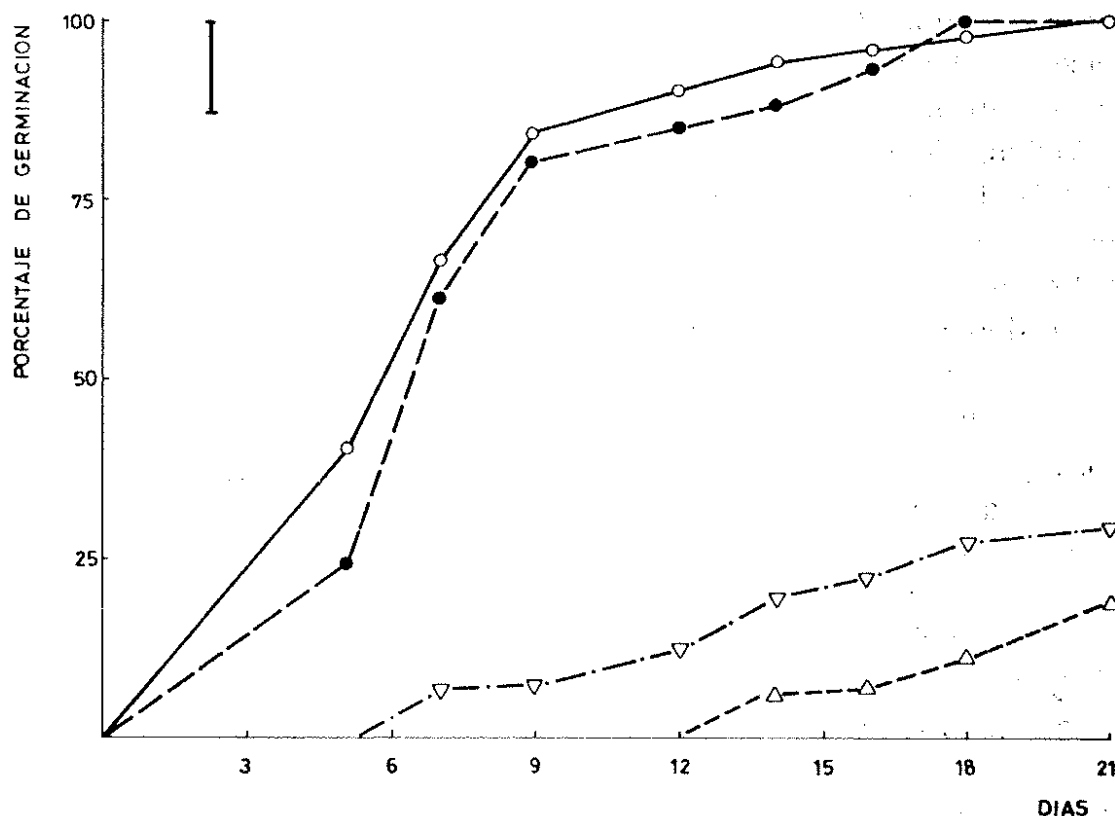


FIG. 3. Velocidad de germinación de semillas de citrange Troyer intactas (Δ — — — Δ) y desprovistas del tegumento externo y con el tegumento interno intacto (∇ — — — ∇), con un orificio en la zona micropilar (O— — — O), y con un orificio en la zona calazal (\bullet — — — \bullet).

TABLA 1.—Peso del eje embrionario en semillas desprovistas de tegumento externo y con el interno perforado, durante varias fases de la germinación.

	Peso fresco (mg.)		Peso seco (mg.)	
Semillas sin germinar (Día 0)	0,54 \pm 0,03		0,28 \pm 0,03	
Día 1	Perforación en el micropilo	0,66	0,28	
	Perforación en la calaza	0,66	0,29	
	Sin perforar	0,55	0,25	
Día 3	Perforación en el micropilo	4,6 \emptyset	0,80	
	Perforación en la calaza	4,5 \emptyset	0,78	
	Sin perforar	0,66	0,22	

Los datos presentados en la figura 4 muestran la interferencia de las cubiertas seminales en la penetración del agua. En las semillas intactas el contenido en agua del embrión aumentó linealmente con el tiempo, pasando del 71 % en la semilla original al 94 % el día 7. Por el contrario, en los embriones desprovistos de tegumentos se observó una fase inicial rápida de absorción de agua que duró dos días aproximadamente, al cabo de los que el contenido de agua del embrión era de 102 %, seguido de una segunda fase de absorción más lenta y lineal con el tiempo, pero con una pendiente sensiblemente superior a la encontrada para las semillas intactas, alcanzándose al final del día 7 un contenido en agua de 122 %. Las determinaciones del contenido en agua de los embriones indican que la germinación no tiene lugar hasta que éste alcanza un valor próximo al 100 %, por lo que la restricción en la velocidad de absorción de agua por las semillas originada por las cubiertas debe tener una influencia marcada en aquel proceso.

En algunas semillas, la estimulación de la germinación producida por la eliminación o la rotura de las cubiertas seminales es debida a la difusión de inhibidores de la germinación presentes en el embrión más que a su efecto en los intercambios hídricos (WAREING y FODA, 1957; WEBB y WAREING, 1972). La posibilidad de que una situación similar pudiera darse en las semillas de citrange Troyer se examinó en una serie de experiencias, toda vez que un mecanismo de este tipo explicaría de modo satisfactorio las observaciones descritas hasta el momento. Semillas desprovistas de tegumento externo y con el interno perforado en la región micropilar se colocaron a germinar en cápsulas Petri tapadas, con un lecho de vermiculita recubierto por una capa de papel de filtro y empapado de agua. Las semillas se dividieron en dos grupos: uno de los grupos se colocó de tal modo que el embrión estaba en contacto directo con la capa acuosa del lecho, lo que asegura la difusión libre de sustancias con el medio (semillas tumbadas), mientras que las semillas del otro grupo se colocaron de tal modo que la discontinuidad de la testa no estaba en contacto con el papel de filtro (semillas erguidas), por lo que los intercambios hídricos se realizan fundamentalmente con la atmósfera saturada de humedad y no hubo difusión de sustancias con el medio. Semillas intactas y embriones desnudos se colocaron asimismo como controles.

Los resultados de estas experiencias se recogen en la tabla 2.

Las semillas tumbadas no difirieron de los embriones desnudos ni en velocidad de germinación ni en contenido en agua, mientras que las semillas erguidas germinaron un día más tarde, en correspondencia estrecha con el estado de imbibición. En cuanto a las semillas intactas no se produjo ninguna germinación durante los cuatro días que se mantuvo la experiencia, y el contenido en agua de los embriones se encontraba alrededor del 90 %, valor similar al presentado en la figura 4. Estos resultados excluyen la posibilidad de que las observaciones realizadas sean debidas a la existencia de un inhibidor de germinación difusible en los embriones y muestran una vez más la relación existente entre el grado de hidratación del embrión y la velocidad de germinación. Las diferencias encontradas en velocidad de germinación entre los embriones desnudos y las semillas con el tegmen perforado en la región micropilar (fig. 1) son debidas a que en aquella experiencia las semillas se colocaron al azar en el lecho húmedo, por lo que sólo parte de las mismas presentarían la perforación en contacto con la capa acuosa, y la velocidad de germinación observada sería un valor intermedio entre las de estas semillas y aquellas con la perforación al aire; como por otro lado en esta experiencia la atmósfera no se encontraba saturada de humedad, la absorción de agua por estas semillas, y por tanto su germinación, debió ser más lenta que en la experiencia recogida en la tabla 2.

c) *Influencia de algunos reguladores de crecimiento en la germinación*

El tratamiento de las semillas con ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4, D) (HAAS y BRUSCA, 1954) y con ácido giberélico (GÓMEZ DE

TABLA 2.— *Velocidad de germinación y contenido en agua en semillas intactas, embriones desnudos y semillas desprovistas del tegumento externo y con el tegumento interno perforado en la región micropilar, con la perforación en contacto con el lecho húmedo (semillas tumbadas) o en la parte opuesta (semillas erguidas).*

	Día 3		Día 4	
	Germinación %	Contenido en agua %	Germinación %	Contenido en agua %
Semillas intactas	0	91	0	90
Semillas erguidas	44	99	96	104
Semillas tumbadas	78	111	100	112
Embriones desnudos	83	110	98	115

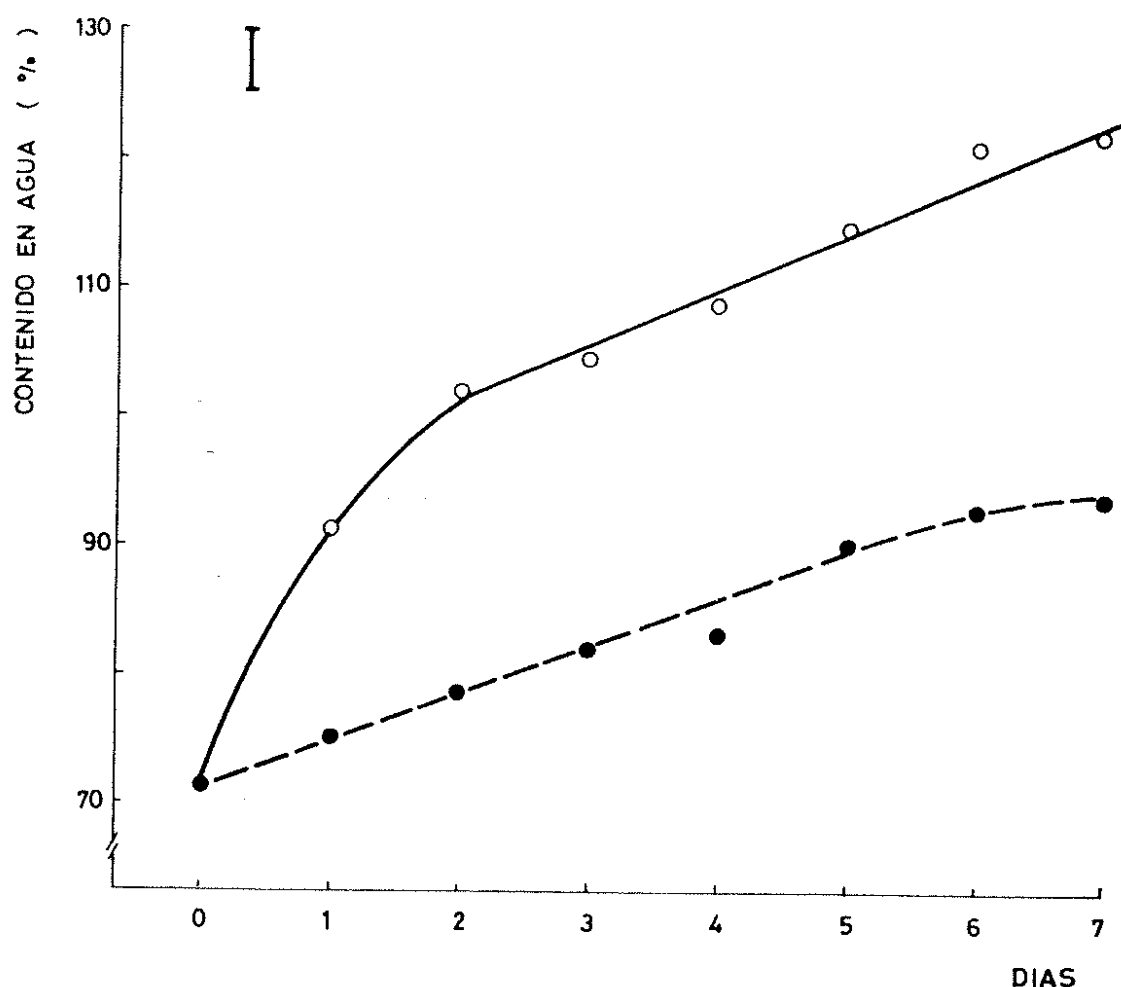


FIG. 4. Contenido en agua, expresado como porcentaje del peso seco, de embriones de citrange Troyer durante la germinación. (●) Embriones de semillas intactas; (○) Embriones desnudos.

BARREDA, MEDINA y GIL, 1973) se ha utilizado a fin de acelerar la germinación de las semillas de diferentes especies de agrinos en el campo. En una serie de experiencias se ha determinado la influencia de estos reguladores de crecimiento en la germinación y su mecanismo de acción.

El pretratamiento de las semillas con 2-4, D manteniéndolas durante 48 horas en una solución de este regulador de crecimiento, estimuló apreciablemente la germinación, siendo esta estimulación máxima para una concentración de este regulador de crecimiento de 2,5 ppm (fig. 5). Concentraciones más elevadas mostraron un efecto depresivo y la velocidad de germinación de las semillas pretratadas con una solución de 10 ppm no difirió de los controles de modo apreciable, lo que puede estar relacionado con el bien cono-

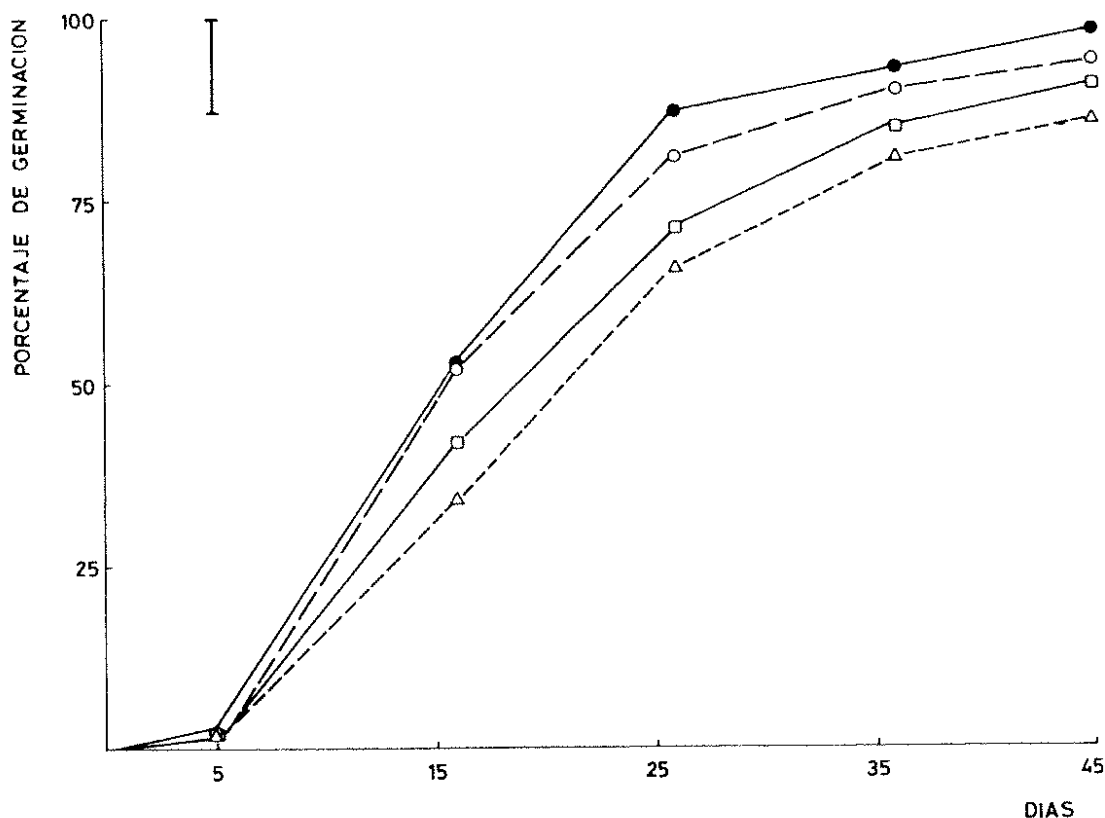


FIG. 5. Velocidad de germinación de semillas de citrange Troyer intactas, sin tratar (Δ — — — Δ), y tratadas con 2-4, D (sal sódica) a una concentración de 1 ppm. (O — — — O), 2,5 ppm. (● — — — ●) y 5 ppm. (□ — — — □).

cido efecto inhibitor de las auxinas en el crecimiento de la raíz (THIMANN, 1972).

Por el contrario, el ácido giberélico no afectó la velocidad de germinación (fig. 6), aunque sí el crecimiento ulterior de las plantas. En la figura 7 se recogen los datos de longitud del tallo y peso seco del tallo y la raíz de plantas tratadas con este regulador de crecimiento, habiéndose considerado la edad de las mismas desde el comienzo visible de la germinación, a fin de compensar las diferencias originadas por la irregularidad de ésta. Diecinueve días después de la germinación la longitud del tallo en las plantas tratadas era más del doble que las plantas testigo, aumentando las diferencias hasta el día 28, cuando la experiencia se dio por terminada; este aumento en longitud debe provocar una emergencia más rápida de las plantas en el semillero, criterio utilizado por GÓMEZ DE BARRERA et al. (1973) como medida de la germinación y que explica los resultados de estos autores, y está acompañada por un mayor

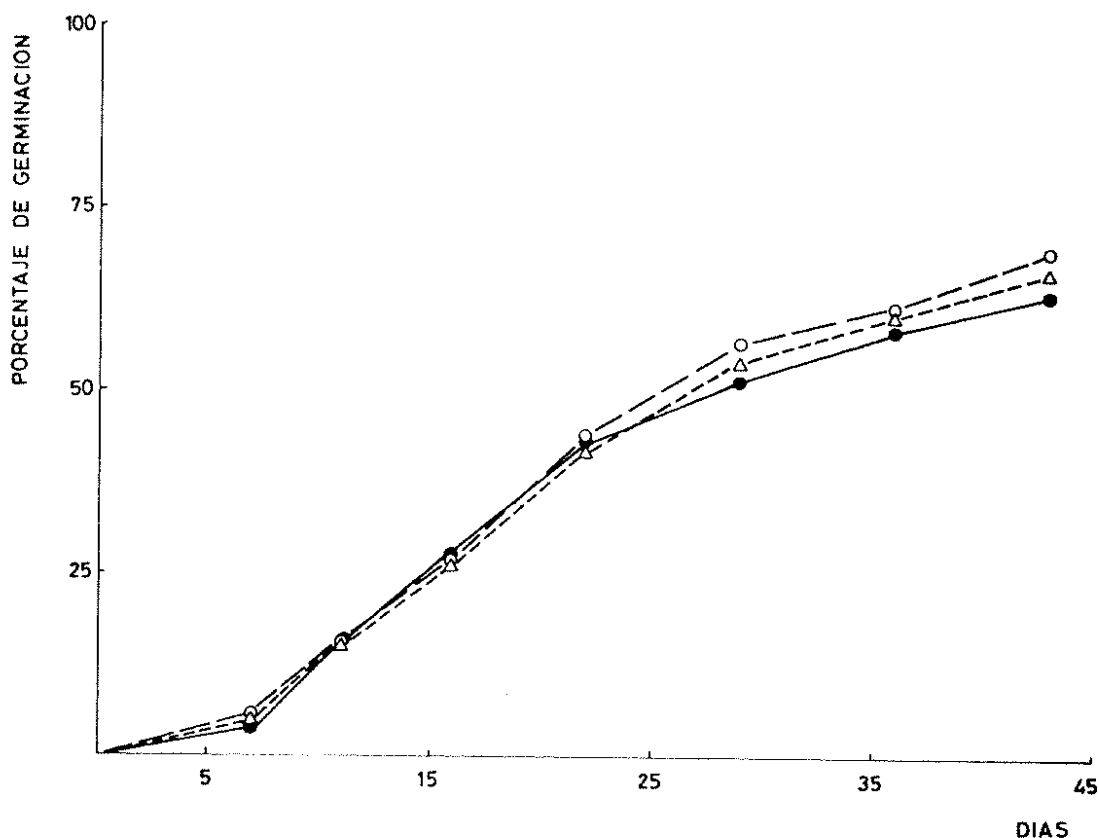


FIG. 6. Velocidad de germinación de semillas de citrange Troyer intactas, sin tratar (Δ - - - Δ) y tratadas con ácido giberélico a una concentración de 10 ppm. (O - - - O) y 25 ppm. (● - - - ●)

transporte de metabolitos al tallo, efecto particularmente notable durante los nueve primeros días de crecimiento de la planta.

La estimulación de transporte al tallo, que es una respuesta casi general a las aplicaciones de giberelinas en las plantas (BRIAN, 1959), está acompañada por una aceleración de la exportación desde los cotiledones, como se pone de manifiesto por los valores de peso seco del eje (tallo y raíz, fig. 7), y un descenso en el transporte a la raíz, efecto repetidamente señalado en la literatura (COGGINS y HIELD, 1968). Este efecto en el transporte a la raíz es particularmente marcado a partir del día nueve, momento en el que cesa el crecimiento de este órgano en las plantas tratadas, mientras que por el contrario, en las plantas testigo, el crecimiento de la raíz continúa, aunque a un ritmo inferior, hasta el día 28.

El tratamiento con ácido giberélico no afectó el número de hojas por planta de modo significativo, pero sí el contenido en clorofila

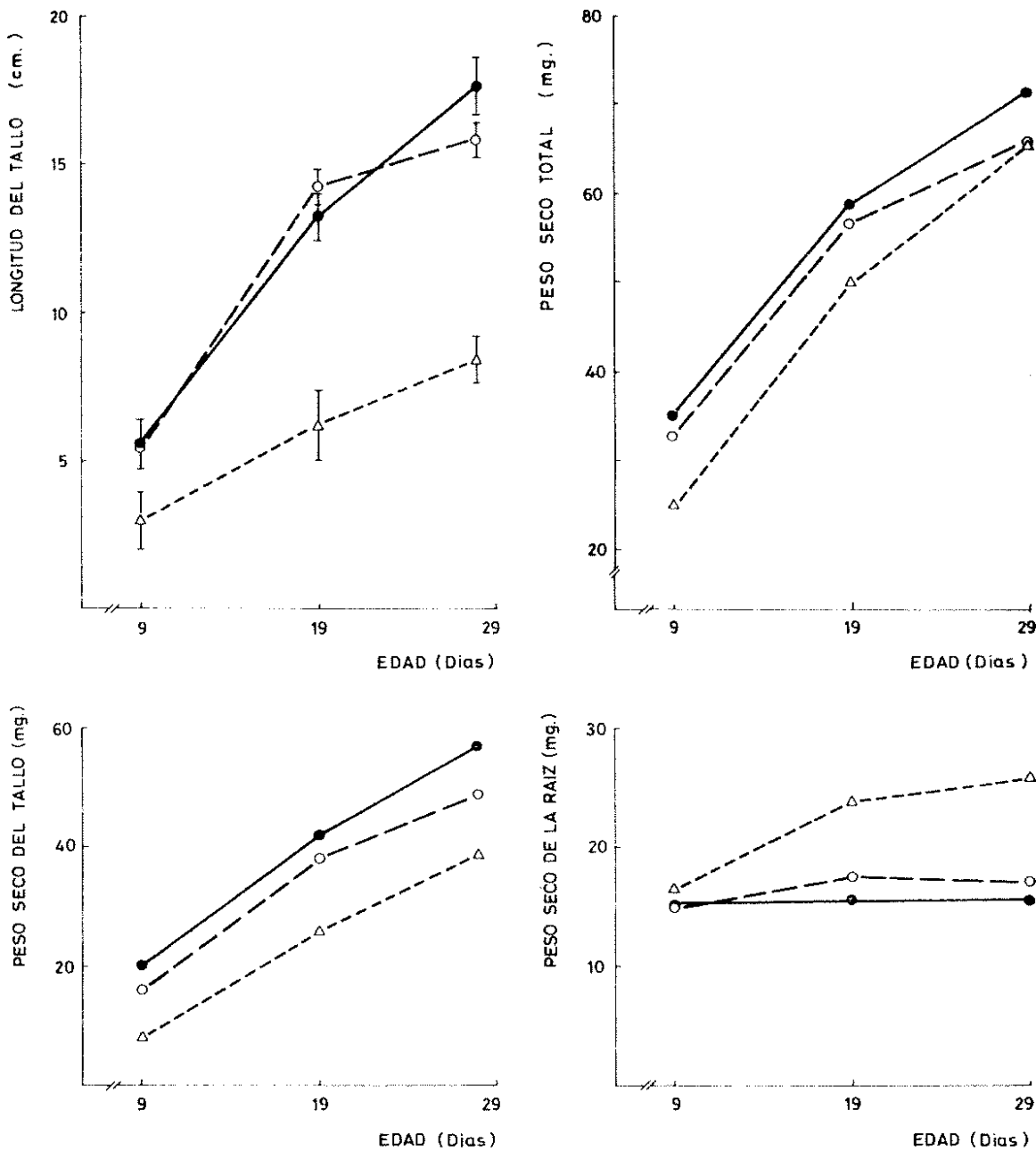


FIG. 7. Longitud del tallo, peso seco del tallo, peso seco de la raíz y peso seco total (tallo + raíz) de plantas de citrange Troyer procedentes de semillas sin tratar (Δ — — — Δ) y tratadas con ácido giberélico a 10 ppm. (O — — — O) y 25 ppm. (● — — — ●). La edad de las plantas se ha contado desde el inicio visible de la germinación.

de éstas, inferior en un 20 % al de las plantas testigo en las plantas tratadas con 10 ppm de ácido giberélico, y en un 30 % en las plantas tratadas con 25 ppm.

CONCLUSIONES

La interferencia de las cubiertas seminales en la absorción de agua parece ser el mecanismo que controla la germinación en las semillas de citrange Troyer. Aunque las experiencias realizadas no permiten excluir la posibilidad de un segundo mecanismo de control debido a la baja permeabilidad de las cubiertas seminales a los gases, en todos los casos se observó una correlación muy estrecha entre la germinación y el grado de hidratación de los embriones, por lo que si este segundo mecanismo existe desaparece con anterioridad al primero y su importancia práctica es dudosa. No se encontraron diferencias significativas en la germinación a la luz o la oscuridad, lo que excluye la posibilidad de un sistema fotosensible.

Por tanto, todo tratamiento que aumente la permeabilidad de las cubiertas al agua debe tener una influencia positiva en la velocidad de germinación. La ruptura de las cubiertas por procedimientos mecánicos es altamente efectiva, pero no es utilizable en la práctica cuando se ha de tratar un elevado número de semillas, debido a la lentitud de esta operación. Los tratamientos químicos ensayados hasta el momento (ácido sulfúrico al 5 %; acetona al 80 %; acetato de etilo) no han producido resultados satisfactorios, ya que las condiciones que afectan la permeabilidad de las cubiertas afecta de modo desfavorable la viabilidad de las semillas. Los resultados más prometedores se han obtenido mediante el tratamiento con agua a 50 °C durante 24 ó 48 horas, que prácticamente dobla la velocidad de germinación durante los primeros veinte días, alcanzándose un porcentaje de germinación entre el 40 y el 60 % frente a unos valores entre el 20 y el 35 % en los testigos, pero la utilidad práctica de este tratamiento ha de ser evaluada. El tratamiento de las semillas a 50 °C durante más tiempo, o a temperaturas superiores, tiene un efecto depresivo marcado en la viabilidad de las semillas.

El efecto del 2-4, D en la velocidad de germinación no es fácilmente explicable como un efecto directo en la permeabilidad de las cubiertas. La posibilidad de un efecto indirecto similar al señalado por Ikuma y Thimann (1963) en la influencia de la kinetina en la germinación de semillas de lechuga es la explicación más posible de los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

- BLACK, M. y P. F. WAREING
1959 The role of germination inhibitors and oxygen in the dormancy of the light sensitive seed of *Betula* spp. *J. exp. Bot.*, **10**: 134-45.
- BRIAN, P. W.
1959 Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol. Rev.*, **34**: 37-84.
- BUTTON, J., C. H. BORNMAN y B. A. HACKLAND
1971 Effect of some pre-sowing treatments on the germination of *Poncirus trifoliata* and Troyer citrange seeds. *The Citrus and Subtropical Fruit J.*, **26**: 9-11.
- COGGINS, C. W. y H. Z. HIELD
1968 Plant growth regulators. En W. Reuther, L. D. Batchelor y H. J. Webber «The Citrus Industry» vol. 2, cap. 6, pp. 371-89. University of California. Div. Agric. Sci.
- ESASHI, Y. y A. C. LEOPOLD
1968 Physical forces in dormancy and germination of *Xanthium* seeds. *Plant Physiol.*, **43**: 871-6.
- GÓMEZ DE BARREDA, D., F. MEDINA y J. GIL
1973 Prácticas de vivero en España. *Proc. 1st. Intern. Citrus Congress* (en prensa).
- HAAS, A. R. C. y J. N. BRUSCA
1954 2,4-D treatment of citrus seed. *Calif. Agric.*, **8/2**: 8 y 12.
- IKUMA, H. y K. V. THIMANN
1963 Action of Kinetin on photosensitive germination of lettuce seed as compared with that of gibberellic acid. *Plant Cell Physiol.*, **4**: 113-28.
- JACKSON, G. A. D. y J. B. BLUNDELL
1966 Effects of dormin on fruit set in *Rosa*. *Nature* (London), **212**: 1470-1.
- MONSELISE, S. P.
1959 Citrus germination and emergence as influenced by temperature and seed treatments. *Bull. Research Council Israel*, **7D**: 29-34.
- NIKOLAEVA, M. G.
1969 Physiology of deep dormancy in seeds. Nat. Sci. Fund. Washington D.C.
- THIMANN, K. V.
1972 The natural plant hormones. En F. C. Steward. «Plant Physiology». vol VI-B, cap. 5, pp. 3-332. Academic Press.
- VILLIERS, T. A.
1972 Seed dormancy. En T. T. Kozlowski «Seed Biology». Vol. II cap. 3, pp. 219-81. Academic Press.
- WAREING, P. F. y H. A. FODA
1957 Growth inhibitors and dormancy in *Xanthium* seeds. *Physiol. Plant.* **10**: 266-80.
- WEBB, D. P. y P. F. WAREING
1972 Seed dormancy in *Acer pseudoplatanus* L.: the role of the covering structures. *J. exp. Bot.*, **23**: 813-29.