

UCH-FC
DOC-B
M 414
C.1

**EFECTO DEL FRIO SOBRE LA GERMINACION DE DOS VARIEDADES DE
AVENA (*Avena sativa* L.)**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Cristina E. Francisca Massardo Vega

Septiembre, 1997

Director de Tesis : Dr. Luis Corcuera Pérez

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

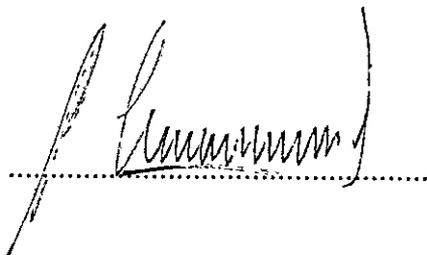
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

CRISTINA E. FRANCISCA MASSARDO VEGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de Agosto de 1997.

Director de Tesis

Dr. Luis Corcuera

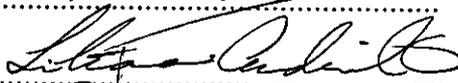


Comisión de Evaluación de Tesis

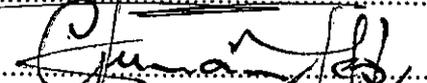
Dra. Miren Alberdi



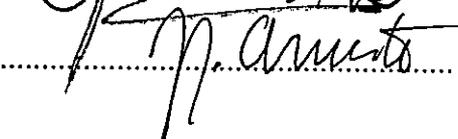
Dra. Liliana Cardemil



Mag. Gladys Fernández



Dr. Juan Armesto



AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de mi postgrado he recibido la colaboración de muchas personas. Agradezco a mi director de tesis la posibilidad de realizar este trabajo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de esta Facultad. Quiero dar las gracias a la Dra. Miren Alberdi por el apoyo y orientación recibidos durante este período. Al mismo tiempo, agradezco al Dr. Eduardo Lissi el espacio brindado en su laboratorio y su generosa disposición a la discusión y crítica de este trabajo. Especialmente valiosa ha sido para mi la amistad y colaboración de los doctores Juan Armesto y Patricio Arce.

Hago llegar mi reconocimiento a la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, que me apoyara durante el desarrollo de mi postgrado.

Agradezco también las facilidades otorgadas por el Departamento de Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Connecticut para realizar la revisión bibliográfica de esta tesis.

Quiero agradecer, además, a todos los profesores de mi postgrado, a mis colegas de la Universidad de Santiago de Chile, a mis compañeros del postgrado y a mis amigos Cristina, Exequiel y muchos otros que me acompañaron en este proceso. Por último, agradezco particularmente a Ricardo Rozzi por su generosidad, cariño y por esa tremenda energía que transmite a su alrededor.

INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Temperatura y germinación	2
1.2 Tolerancia al frío	4
1.3 Mecanismos de tolerancia al frío	7
1.4 Determinación de variedades tolerantes y susceptibles	10
1.5 Antecedentes sobre la tolerancia al frío durante la germinación	11
1.6 Objetivos e hipótesis de trabajo	14
2 MATERIALES Y METODOS	18
2.1 Material vegetal	18
2.2 Ensayo de germinación	18
2.3 Tratamiento de temperaturas	19
2.4 Criterios de germinación y etapas del proceso	19
2.5 Caracterización de las semillas utilizadas	21
2.6 Germinación de las semillas a distintas temperaturas	21
2.7 Criterios para la selección de tolerancia al frío durante la germinación	21
2.8 Determinación de tolerancia al congelamiento (TL ₅₀)	22
2.9 Cosecha del tejido para los análisis	23
2.10 Determinación de los solutos compatibles	24
2.10.1 Prolina	24
2.10.2 Sacarosa	24
2.10.3 Azúcares solubles totales	25
2.10.4 Fructanos totales	26
2.11 Determinación de lípidos	26
2.11.1 Lípidos polares	26
2.11.2 Determinación de ácidos grasos	27
2.12 Determinación de la fluidez de las membranas microsomaes	28
2.12.1 Aislamiento de la membrana microsomal	29
2.12.2 Determinación de la polarización	29

2.13 Determinación de proteínas	30
2.13.1 Proteínas solubles	30
2.13.2 Actividad enzimática	30
2.13.2.1 Actividad amilasa	31
2.13.2.2 Actividad catalasa	32
2.14 Efecto del ácido giberélico	32
2.15 Determinación de estrés oxidativo	32
2.15.1 Determinación de malonaldehído (MDA)	32
2.15.2 Determinación del estrés oxidativo en embriones intactos	33
2.16 Determinación de parámetros hídricos	33
2.16.1 Absorción de agua	33
2.16.2 Potencial hídrico	34
2.16.3 Contenido Relativo de Agua (CRA)	34
2.17 Determinación de la actividad respiratoria	34
2.18 Medida de la Conductividad Eléctrica (CE)	35
2.19 Análisis estadístico	35
3 RESULTADOS	37
3.1 Caracterización de las variedades de avena	37
3.1.1 Caracterización de la semilla	37
3.1.2 Porcentaje de germinación	37
3.1.3 Termodormancia	40
3.1.4 Criterios de tolerancia al frío durante la germinación	44
3.2 Caracterización de las variedades seleccionadas	47
3.2.1 Viabilidad y características morfológicas	47
3.2.2 Evaluación de los criterios de tolerancia en las var. seleccionadas	47
3.2.3 Cinética de la germinación	53
3.2.4 Tasa de germinación	56
3.2.5 Daño por frío durante la imbibición	57
3.2.6 Relaciones hídricas	61
3.2.7 Actividad amilasa	65
3.3. Estrés oxidativo	70
3.3.1 Oxidación del DCFDA	70
3.3.2 Lipoperoxidación	74
3.3.3 Actividad catalasa	74
3.4 Tolerancia al congelamiento medida por el TL ₅₀	77
3.5 Acumulación de solutos compatibles	81
3.5.1 Prolina	81
3.5.2 Sacarosa	84
3.5.3 Azúcares solubles totales	84
3.5.4 Fructanos totales	87
3.6 Fluidez de las membranas microsomales	87
3.7 Determinación de lípidos	91

3.7.1 Acidos grasos de la fracción de lípidos polares	91
3.7.2 Proteínas de la membrana	95
3.8 Consumo de oxígeno	97
4 DISCUSION	103
4.1 Caracterización de la germinación de la <i>Avena sativa</i>	103
4.1.1 Criterios de tolerancia al frío durante la germinación	104
4.2 Caracterización de la germinación de las variedades seleccionadas	104
4.2.1 Relaciones hídricas	104
4.2.2 Actividad amilasa total	108
4.3 Respuesta al congelamiento	110
4.4 Estrés oxidativo y capacidad antioxidante	115
4.5 Solutos compatibles	119
4.5.1 Prolina	119
4.5.2 Hidratos de carbono	122
4.6 Membranas celulares	128
4.7 Consumo de oxígeno	135
4.8 Discusión general	140
5 CONCLUSIONES	149
6 BIBLIOGRAFIA	151

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Caracterización de las semillas de 7 variedades de avena (*Avena sativa*) según la viabilidad y el contenido de humedad. 38
- Tabla 2.** Efecto del ácido giberélico (GA_3) sobre el porcentaje de germinación de tres variedades de avena. 42
- Tabla 3.** Porcentaje de germinación *in vitro* para semillas y embriones de las variedades de avena OT220xOMIHI y América. 43
- Tabla 4.** Tiempo en días en que se alcanza el 50% de la germinación de una muestra de semillas (T50) para 7 variedades de avena. 45
- Tabla 5.** Caracterización de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) según la viabilidad y relaciones de masa del grano seco. 49
- Tabla 6.** Efecto de la temperatura sobre la liberación de iones y de proteínas desde la semillas luego de la imbibición completa. 60
- Tabla 7.** Efecto de la temperatura de imbibición sobre el porcentaje de germinación de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América). 62
- Tabla 8.** Potencial hídrico del embrión (Ψ_h) para las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) durante la germinación. 66
- Tabla 9.** Oxidación del diacetato de fluoresceína (DCFDA) como Ufluorescencia/min x mg PF. 73
- Tabla 10.** Actividad catalasa en el endosperma de las semillas de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) en el Estado 4. 78
- Tabla 11.** Ecuaciones de regresión lineal obtenidas para la determinación del TL_{50} en el Estado 1 de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América). 80
- Tabla 12.** Valores de polarización (p) para fracciones microsomales de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) expresados como porcentaje. 92
- Tabla 13.** Distribución porcentual de ácidos grasos de la fracción polar del embrión en el Estado 3 de la germinación. 93

Tabla 14. Distribución porcentual de ácidos grasos de la fracción polar del embrión en el Estado 4 de la germinación. 94

Tabla 15. Contenido de proteínas de la fracción microsomal de las variedades Tolerante y Susceptible en el Estado 4. 96

Tabla 16. Consumo de oxígeno a 3°C expresado por embrión y por peso de tejido embrionario para las variedades Tolerante y Susceptible. 99

Tabla 17. Consumo de oxígeno a 3°C de las vías sensible a cianuro y alternativa para las variedades Tolerante y Susceptible en tres estados de la germinación. 101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de progreso de la germinación. 20
- Figura 2.** Germinación de 7 variedades de Avena sativa en un rango de temperatura. 39
- Figura 3.** Germinación de la avena variedad América en un rango de temperatura en distintos períodos de ensayo. 41
- Figura 4.** Fotografía de rayos X de las semillas de las variedades Tolerante y Susceptible. 48
- Figura 5.** Criterios de tolerancia al frío durante la germinación de las variedades Tolerante y Susceptible. 51
- Figura 6.** Criterios de tolerancia al frío durante la germinación de las variedades Tolerante y Susceptible. 52
- Figura 7.** Germinación acumulada de la variedad Tolerante. 54
- Figura 8.** Germinación acumulada de la variedad Susceptible. 55
- Figura 9.** Tasa de germinación de las variedades Tolerante y Susceptible. 58
- Figura 10.** Conductividad eléctrica del agua de imbibición de las semillas de las variedades Tolerante y Susceptible. 59
- Figura 11.** Absorción de agua por las semillas de las variedades Tolerante y Susceptible a las 48 h de la imbibición. 63
- Figura 12.** Absorción de agua por las semillas de las variedades Tolerante y Susceptible a los 12 días de la imbibición. 64
- Figura 13.** Relación entre el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el potencial hídrico (Ψ_h) para los embriones intactos de las variedades Tolerante y Susceptible. 67
- Figura 14.** Actividad específica de la amilasa total en semillas desembrionadas en las variedades Tolerante y Susceptible. 68
- Figura 15.** Relación entre la emisión de fluorescencia por la oxidación del DCFDA y tejido embrionario de avena. 71

Figura 16. Relación entre la emisión de fluorescencia por la oxidación del DCFDA y tiempo de incubación.	72
Figura 17. Producción de MDA por los embriones en el Estado 4 de la germinación.	75
Figura 18. Actividad específica de la catalasa de los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible.	76
Figura 19. Germinación de las semillas de la variedad América embebidas a distintas temperaturas sometidas a temperaturas congelantes.	79
Figura 20. Temperatura letal para el 50% de la población para las variedades Tolerante y Susceptible.	82
Figura 21. Contenido de prolina de los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible.	83
Figura 22. Contenido de sacarosa de los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible.	85
Figura 23. Contenido de azúcares solubles totales de los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible.	86
Figura 24. Contenido de fructanos totales de los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible.	88
Figura 25. Tasa de polarización (p) del DPH inmerso en la membrana microsomal de embriones de avena.	90
Figura 26. Consumo de oxígeno a 3°C en embriones intactos.	98
Figura 27. Consumo relativo de oxígeno a 3°C en embriones intactos.	102

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

BSA - seroalbúmina de bovino
BTH - hidroxitolueno butilado
-CE - Conductividad Eléctrica
CRA - Contenido Relativo de Agua CV - Coeficiente de Velocidad
DCFDA - diacetato de 2'7'-diclorofluoresceín
DPH -di-fenil-hexatrieno
GA₃ . Acido giberélico
GI - Grado de insaturación
GP - grado de polimerización
IG - Índice de Germinación
MDA - malonaldehido
MPa - megapascal
PF - Peso fresco
PS - Peso seco
 Ψ - potencial hídrico
SHAM - Acido salicilhidroxámico
TBA - Acido tiobarbitúrico
Ti - Tiempo para el inicio de la germinación
T50 - Tiempo para la germinación del 50% de la población
TL₅₀ - Temperatura letal para el 50% de la población en °C
TTC - test del cloruro de trifeniltetrazolio

RESUMEN

El frío retarda la germinación de numerosas especies cultivadas. Dentro de una misma especie, se han descrito variedades con tolerancia diferencial al frío durante la fase de germinación. Existe escasa información sobre la fisiología de la respuesta al frío durante este estado de la ontogenia. En esta tesis se propuso, como una primera aproximación experimental, que las variedades tolerantes presentarían durante la germinación mecanismos de tolerancia similares a los documentados para otros estados del ciclo de vida de la planta. Los mecanismos fisiológicos asociados a la tolerancia al frío en el estado de plántula y planta adulta son la acumulación de solutos compatibles, el cambio de propiedades y características de las membranas celulares, la aparición de nuevas proteínas, menor daño por estrés oxidativo y mayor tasa metabólica. Esta hipótesis se puso a prueba utilizando como modelo experimental a la *Avena sativa* (Graminae), debido al conocimiento de su comportamiento frente al frío en el estado de plántula.

A partir de un grupo de siete variedades de *A. sativa*, se seleccionaron dos que germinaron en forma contrastante según indicadores que consideran el tiempo de germinación y se clasificaron como Tolerante y Susceptible. Las dos variedades seleccionadas no presentaron daño por frío durante la fase de imbibición y tuvieron una prolongación de la fase de pre-germinación con temperaturas inferiores a 17°C. No hubo correlación entre la tolerancia al frío medida por los indicadores de tolerancia al frío y la tolerancia al congelamiento en los estados de aparición de coleorriza (1-2 mm) y de

radícula (1 cm). La actividad amilasa total se redujo con el frío en la variedad Tolerante (30%) y en la Susceptible (50%) en los dos estados de desarrollo considerados.

Ambas variedades tuvieron el mismo patrón de acumulación de solutos compatibles en el embrión: en la etapa de coleorriza se acumularon azúcares solubles y en la etapa de radícula se acumularon prolina y fructanos (GP>6) en respuesta a los tratamientos de 10 y 3°C. La variedad Tolerante acumuló más fructanos (30%) y más sacarosa (50%) que la Susceptible. Al mismo tiempo, la tasa metabólica medida como consumo de oxígeno durante la pre-germinación fue el doble en la Tolerante (1,640 nmolO₂/min x embrión) respecto a la variedad Susceptible (0,820 nmolO₂/min x embrión), diferencia que se mantuvo hasta la elongación de la radícula. Esto implica mayor producción de calor en la variedad Tolerante. La respiración por la vía alternativa alcanzó entre el 10 y el 20%. Ambas variedades sufrieron estrés oxidativo, pero la variedad Tolerante mostró menos lipoperoxidación (<20% a 3°C) y mayor capacidad antioxidante (200% a 3°C) que la Susceptible en el período de la elongación de la radícula. No se detectaron cambios en la fluidez de las membranas microsomales y composición porcentual y grado de insaturación de los ácidos grasos de la fracción polar de los embriones en ninguna de las dos variedades.

Se concluye que la mayor tolerancia de los embriones de avena se asocia con la mayor tasa respiratoria desde la pre-germinación y con menor daño por estrés oxidativo en una fase tardía de la germinación. Los solutos compatibles no se asociaron claramente con la tolerancia al frío en esta etapa. La ausencia de cambios en las propiedades dinámicas de la membrana y en su composición, sugiere que algunas respuestas de

tolerancia al frío son comunes en distintas fases del ciclo de vida de la planta, mientras que otros pueden ser diferentes. Los indicadores agronómicos de tolerancia al frío durante la germinación consideran la variable temporal, no obstante, no existe correlación con algunos parámetros fisiológicos de tolerancia al frío.

Effect of Low Temperature on Germination of Two Oat Cultivars (*Avena sativa* L.)

ABSTRACT

Cold stress reduces seed germination of many cultivated plants. For a given crop species there are some genotypes may show greater tolerance to low temperature during germination than others. Physiological responses that could explain this difference have not been explored during this ontogenetic phase. As a first experimental approach to this problem, in this work I proposed to investigate whether the same tolerance mechanisms found in later phased of the life cycle operate during the germination phase. The mechanisms linked with cold stress tolerance in seedling or adult phases are solute accumulation, increased membrane fluidity associated with a higher insaturation index, newly synthesized proteins, higher metabolic rate and lower damage from oxidative stress. We studied these mechanisms in germinating seeds of *Avena sativa*, because this species has known responses to cold stress during seedling and adult phases.

From a group of seven cultivars of *A. sativa*, two cultivars with contrasting cold tolerance during germination were selected for study (Tolerant and Sensitive). Neither of these cultivars showed damage during imbibition. Cold stress induced the extension of phase II of the germination process. Cold tolerance during germination was not correlated with freezing tolerance at coleorhiza (1-2 mm) or at radicle (1 cm) stages. Total amilase activity was reduced to lesser degree in the Tolerant cultivar in both developmental stages.

The accumulation of compatible solutes in the embryo was the same for both cultivars. During coleorhiza stage total soluble sugars accumulated at low temperature and in the radicle stage proline and fructans accumulated with cold. Tolerant cultivar had more fructans (DP>6) (30%) and sucrose (50%) than Sensitive cultivar. Metabolic rate measured as oxygen consumption was twice higher for Tolerant cultivar than in the Sensitive type from the pre-coleorhiza stage until radicle emergence. This implies more heat production in the Tolerant than in the Sensitive cultivar. Alternative pathway was 10 to 20%. The Tolerant cultivar was less injured by oxidative stress due to lipoperoxidation (<20% at 3°C) and more catalase activity (200% at 3°C) than the Sensitive cultivar during radicle emergence. No changes were detected between cultivars in membrane fluidity, composition and insaturation degree of fatty acids of the membrane.

According to these results, tolerance to cold stress during germination may be a result of a higher oxygen consumption and higher resistance to oxidative stress. Compatible solutes were not obviously associated with cold tolerance during germination. The absence of changes in properties and structure of membranes suggests that some responses relevant in other phases of plant development may not be present during germination.

El estudio de los efectos de la temperatura sobre la fisiología de las especies vegetales silvestres y cultivadas es un tema de interés creciente en la investigación fisiológica, que tiene además relevancia para la ecología y la agronomía (Nilsen y Orcutt 1996). La investigación en esta área busca comprender los mecanismos celulares que explican las respuestas de las diferentes especies en ambientes extremos (Osmond y col. 1987, Larcher 1995, Nilsen y Orcutt 1996). Los modelos fisiológicos de respuesta de las plantas frente a los cambios térmicos, cobran especial importancia frente a la necesidad de aumentar el rendimiento potencial de los cultivos en condiciones subóptimas (Boyer 1982, Nishida y Murata 1996) y frente a la inminencia del cambio global (Nilsen y Orcutt 1996). Las bajas temperaturas constituyen según Sakai y Larcher (1987), uno de los factores de estrés de mayor incidencia en el mundo, definiendo un factor de estrés como aquel que induce cambios fisiológicos en la planta (Nilsen y Orcutt 1996). La respuesta frente a un factor de estrés como el frío puede ser de tolerancia, es decir, la planta presenta los mecanismos que le permiten mantener su actividad metabólica cercana a la del control (Osmond y col. 1987).

Según Nilsen y Orcutt (1996), el estudio de los cambios fisiológicos frente a un estrés de frío, debería considerar la fase del ciclo de vida en que éste se presenta. Estos autores proponen el concepto de *ventanas de sensibilidad* para indicar los estados de desarrollo específicos y la edad del órgano afectado en que existe una susceptibilidad especial al factor de estrés. En la respuesta al frío, se han estudiado los cambios

fisiológicos y los mecanismos de tolerancia en etapas avanzadas del ciclo de vida investigando diversos órganos de una planta (Sakai y Larcher 1987, Alberdi y Corcuera 1991, Larcher 1995, Nilsen y Orcutt 1996). Sin embargo, los cambios fisiológicos que dan cuenta de las distintas respuestas asociadas a la tolerancia al frío durante las fases más tempranas del ciclo de vida, como la germinación, son menos conocidas no obstante su importancia ecológica y productiva (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Hallgreen y Öquist 1990). El estudio del efecto del frío durante la germinación es el foco de estudio de este trabajo, tomando como modelo el caso de la germinación de la avena cultivada.

1.1 Temperatura y germinación

Cuando una semilla deshidratada y viable se embebe en agua se inicia una cadena de reacciones que termina con la emergencia de la radícula o germinación (Koller 1972, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Bewley y Black 1994). La transición desde un estado deshidratado con una tasa metabólica extraordinariamente baja a uno de activo metabolismo como la germinación, involucra una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que han sido extensamente tratados en la literatura (Labouriau 1983, Bradbeer 1988, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Kermode 1990, Bewley y Black 1994, ver Kigel y Galili 1995).

La germinación comienza con la hidratación de las membranas celulares y el metabolismo se reinicia activándose la respiración, la actividad enzimática y la actividad de los organelos, la síntesis de RNA y de proteínas y los procesos de mitosis y de elongación celular. Todo esto implica cambios químicos en las reservas de la semilla y en

el embrión asociados a actividades de degradación, transporte y síntesis (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Bewley y Black 1994). El proceso de germinación, así como la absorción de agua y la respiración embrionaria, sigue un modelo de tres fases sucesivas: un incremento rápido inicial o fase I de sólo algunas horas de duración, una fase II o germinación *sensu stricto* que corresponde a un "plateau" donde ocurre la activación del embrión sin cambios morfológicos aparentes y, por último, un aumento rápido coincidente con la emergencia de la radícula o fase III que involucra un cambio significativo en el estado fisiológico del embrión (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Côme y Corbineau 1989, Bewley y Black 1994, Bradford 1995).

Una semilla deshidratada puede soportar temperaturas extremas de hasta -196°C sin afectar su viabilidad (Ovcharov 1977, Labouriau 1983, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989), pero una vez que ocurre hidratación, las semillas de la mayor parte de las especies estudiadas muestra elevada sensibilidad a la temperatura (Koller 1972, Labouriau 1983, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). Si no existe latencia (imposibilidad de germinar por razones físicas o fisiológicas), y tanto para semillas ortodoxas (menos del 20% de humedad) como recalcitrantes (20 a 50% de humedad), la germinación es una función dependiente de la temperatura en presencia de condiciones adecuadas de agua y de oxígeno en el medio (Labouriau 1983, Roberts 1988, Bewley y Black 1994). Por lo general, esta función describe una curva normal con zonas letales y subóptimas en los rangos bajo y alto de temperatura y con una zona óptima de temperatura donde la germinación es máxima (Labouriau 1983). También se definen temperaturas mínima y

máxima que son la menor y la mayor temperatura donde puede ocurrir germinación (Koller 1972, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989).

Según Roberts (1988), son dos los parámetros que expresan el efecto de la temperatura sobre la germinación: 1) el número de semillas germinadas o porcentaje final y 2) la velocidad de germinación definida a partir del porcentaje acumulado de germinación en el tiempo. En consecuencia, Mayer y Poljakoff-Mayber (1989) señalan que el porcentaje final de germinación en una población de semillas depende del intervalo de tiempo considerado para el ensayo, especialmente si se trata de temperaturas bajas.

1.2 Tolerancia al frío

Las plantas son organismos poikilotérmicos, es decir, reflejan la temperatura del ambiente donde viven (Nilsen y Orcutt 1996). El frío limita la distribución latitudinal y altitudinal de un número importante de especies silvestres y cultivadas, algunas de las cuales crecen en o cerca del límite genéticamente determinado de su capacidad fisiológica de sobrevivencia (Osmond y col. 1987, Sakai y Larcher 1989, Larcher 1995, Nilsen y Orcutt 1996). Esto se debe a que el frío puede afectar la fisiología de cada una de las fases del ciclo de vida de una planta (Osmond y col. 1987, Nilsen y Orcutt 1996), desde la germinación hasta la adultez (Sakai y Larcher 1987, Hallgreen y Öquist 1990, Larcher 1995).

En esta tesis se considera al frío como condición de estrés a toda temperatura inferior al rango en que se encuentra el óptimo de germinación, definiendo el óptimo como aquella temperatura o rango de temperaturas donde la germinación es máxima en el

tiempo más corto para una población de semillas, cuando el resto de las condiciones permanece constante. Considerando el criterio de velocidad de germinación, se definió como temperatura óptima aquella en que se completa más rápidamente el 50% de la germinación, considerando el tiempo transcurrido desde el inicio de la imbibición.

El frío disminuye la energía metabólica en una célula y por ende en la planta entera, restringe la absorción de agua y nutrientes, reduce la tasa metabólica y la asimilación y por lo general frena el crecimiento (Larcher 1995). El retardo descrito por Roberts (1988) tanto en la velocidad de germinación como en el porcentaje final de semillas germinadas, se debería en parte a un efecto cinético del frío no letal sobre el metabolismo (Roberts 1988, Bewley y Black 1994, Larcher 1995) y en parte, al efecto diferencial del frío sobre la tasa de los procesos bioquímicos. Este segundo efecto influye de manera diferencial algunas reacciones parciales de las vías metabólicas (Lyons 1973, Hallgreen y Öquist 1990), ya que no todas las funciones celulares son igualmente sensibles al frío (Larcher 1995).

También a nivel de individuos o de especies vegetales se encuentran respuestas diferenciales al frío, definiéndose plantas sensibles y tolerantes al frío durante la germinación (Ovcharov 1977, Patterson y col. 1979, Simon 1979, Graham 1983, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). Se consideran especies sensibles al frío aquellas que no pueden germinar entre 0 y 15 o 20°C (maíz, arroz, sorgo, tomate, etc.) y se consideran tolerantes aquellas especies capaces de germinar a temperaturas cercanas a los 0°C (trigo, avena, cebada, centeno, etc.). En las especies sensibles, la exposición al frío produce un daño la mayoría de las veces irreversible (Ovcharov 1977, Patterson y col. 1979, Simon 1979).

En las especies tolerantes, en cambio, ocurren modificaciones fisiológicas que permiten la sobrevivencia (Patterson y col. 1979, Simon 1979). Estas modificaciones pueden ser el resultado de adaptación evolutiva, o pueden corresponder a un proceso de aclimatación al frío que ocurre en el individuo. La capacidad de aclimatación de un individuo, y por lo tanto el efecto del frío sobre la germinación, dependerá de su plasticidad fenotípica frente a temperaturas bajas.

De especial interés para la comprensión de los mecanismos de tolerancia al frío, son las diferencias en la capacidad de tolerar el frío durante la germinación entre las variedades de una misma especie (Ovcharov 1977, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). Debido a que las temperaturas bajas provocan un efecto adverso sobre la germinación, en las especies agrícolas existe una búsqueda permanente de variedades capaces de tolerar el frío durante este período del ciclo de vida. Entre las especies cultivadas existen variedades que presentan respuestas fenotípicas diversas al frío durante la germinación (Scott y Jones 1985, Dahal y col. 1996), y en una misma especie se han descrito variedades tolerantes y susceptibles a rangos térmicos determinados. Análogamente, los criterios para la selección de variedades tolerantes al frío durante la germinación consideran el porcentaje de semillas que germina en un tiempo dado (Cannon y col. 1973, McConnell y Gardner 1979, Maluf y Tigchelaar 1980, Berrie y Taylor 1981, Scott y Jones 1982, Scott y col. 1984, Scott y Jones 1985, Bacon y col. 1983, Hoard y Crosbie 1985, Wolf y col. 1986, Martin y col. 1988). Existe entonces, una selección empírica de variedades tolerantes y susceptibles al frío durante la germinación para diferentes especies, una serie de criterios de selección (Scott y col. 1984, Ellis y col. 1986) y

algunos métodos para aumentar la tolerancia al frío en terreno (Bradford 1986, Basra y col. 1988). Pero los cambios fisiológicos que ocurren en una semilla en respuesta al frío durante la fase de la germinación, son poco conocidos todavía.

1.3 Mecanismos de tolerancia al frío

Las diferencias en la respuesta de germinación entre variedades con distinto grado de tolerancia al frío constituyen un caso ideal para estudiar los mecanismos de tolerancia asociados al frío, porque detecta las diferencias fisiológicas sutiles entre genotipos similares. En fases avanzadas del ciclo de vida de una planta, se han descrito diferencias en una serie de parámetros fisiológicos entre especies tolerantes y susceptibles al frío (ref. Larcher 1995, ref. Nilsen y Orcutt 1996) y entre variedades tolerantes y susceptibles a las bajas temperaturas (Alberdi y col. 1993, Murelli y col. 1995, Bravo 1997). Estos trabajos han mostrado cómo genotipos similares, variedades de una especie, se comportan de manera diferente cuando son expuestos a temperaturas bajas.

La respuesta al frío involucra la modificación de diversos rasgos fisiológicos y bioquímicos de la planta que confieren tolerancia a esta condición (Alberdi y Corcuera 1991). Estos rasgos se expresarían durante la germinación en las semillas tolerantes expuestas a temperaturas bajas, pero no en semillas expuestas a la temperatura óptima de germinación. Al mismo tiempo, si dentro de una especie se comparan dos variedades que difieren en su tolerancia, se esperaría que la magnitud de los cambios asociados al frío sea distinta según se trate de una variedad tolerante o susceptible. Por lo tanto, la comparación de variedades con distinto grado de tolerancia al frío constituye un sistema

ideal para investigar los mecanismos fisiológicos responsables de esta tolerancia. Una primera aproximación planteada en esta tesis, corresponde a la detección de mecanismos fisiológicos que otorgarían distintos grados de tolerancia al frío durante la germinación a variedades de una misma especie. La comparación cuantitativa de la expresión de los mecanismos entre variedades con grados de tolerancia contrastante, permitiría evaluar la participación de estos mecanismos en la respuesta de tolerancia diferencial.

Los antecedentes sobre los mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío durante la germinación son escasos (Hallgreen y Öquist 1990, Larcher 1995). Frente a esta carencia de antecedentes, se propone evaluar la expresión durante la germinación de mecanismos de tolerancia al frío descritos para etapas avanzadas del desarrollo de una planta. Al revisar los abundantes antecedentes descritos para el estado de plántula o de planta adulta, en distintos tejidos y en diferentes especies, es posible agrupar los mecanismos de tolerancia al frío en tres tipos de respuestas fisiológicas: 1) la síntesis de solutos compatibles, 2) la alteración del metabolismo de las membranas celulares y de lípidos y 3) la acumulación de proteínas crioprotectoras (Hallgreen y Öquist 1990, Guy 1991, Alberdi y Corcuera 1991, ref. Nilsen y Occurt 1996).

Solutos compatibles. Los solutos compatibles son aquellos cuya acumulación no provoca daño celular (Taiz y Zeiger 1991) y su acción está fundamentalmente asociada a la crioprotección. La acumulación de sacarosa, oligosacáridos y fructanos en plantas tolerantes aclimatadas al frío ha sido ampliamente informado en la literatura (ref. Alberdi y Corcuera 1991, Chatterton y col. 1990, Bonicel Vercosa 1990, Alberdi 1996). La

prolina es otro metabolito ligado al metabolismo en condiciones de baja temperatura (Alberdi y Corcuera 1991).

Metabolismo de lípidos. La alteración ultraestructural y bioquímica de las biomembranas es una respuesta asociada con la aclimatación al frío en plántulas y plantas adultas, dado que la sobrevivencia celular es una función de su integridad y fluidez (Alberdi y Corcuera, 1991). El aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados a bajas temperaturas se ha relacionado en la mayoría de los casos con la mantención de la fluidez de la membrana (ref. Hallgreen y Öquist 1990, Larcher 1995, ref. Nilsen y Orcutt 1996, Nishida y Murata 1996). Dado que el aumento de la concentración de lípidos, de fosfolípidos y esteroides libres y de la proporción de ácidos grasos insaturados de la fracción polar tienden a preservar la fluidez, la funcionalidad y la compartimentación membranosa (ref. Hallgreen y Öquist 1990, ref. Alberdi y Corcuera 1991, ref. Nilsen y Orcutt 1996), la tolerancia al frío se identifica con la mantención de las propiedades de permeabilidad y fluidez de las membranas celulares (Nilsen y Orcutt 1996).

Proteínas de estrés. La acumulación de proteínas de estrés y la alteración de algunas actividades enzimáticas en respuesta al frío se conoce en una serie de especies mono y dicotiledóneas (ref. Guy 1990). En particular, se han descrito las vías de síntesis de metabolitos crioprotectores (Crespi y col. 1991, Guy y col. 1992) y de actividades relacionadas con las proteínas de membrana (Kader 1996, Nishida y Murata 1996).

Además de los cambios fisiológicos recién descritos, el frío provoca un estrés oxidativo (Purvis y Shewfelt 1993, Purvis y col. 1995). Por lo tanto, existe un aumento de las especies activadas de oxígeno de manera que una célula debe protegerse

aumentando la capacidad antioxidante y elevando la capacidad para reducir los productos de la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge 1989). Además del oxígeno reducido a H_2O por la citocromo oxidasa mitocondrial, también es parcialmente reducido a O_2^- y H_2O_2 por otros componentes mitocondriales y celulares (Boveris y col. 1978). En consecuencia, estos metabolitos son normales en las células vegetales (Puntarulo y col. 1988) y se mantienen a bajo nivel por la acción de enzimas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge 1989). La actividad enzimática antioxidante de la catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa aumenta significativamente en las plantas tolerantes al frío, reduciéndose los productos de la lipoperoxidación (Zhang y col. 1995).

1.4 Determinación de variedades tolerantes y susceptibles

Uno de los objetivos del estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés es establecer las condiciones estándares de tolerancia para una especie o variedad a esa condición en particular. De acuerdo a estos parámetros, se han identificado especies más o menos tolerantes al frío en una serie de estados fisiológicos y se ha propuesto que una planta tolerante debe presentar una o más de las modificaciones que le permitirían mantener la integridad celular (Webb y col. 1994, Alberdi y col. 1993, Murelli y col. 1995, Zhang y col. 1995). Cuando se trata de una misma especie, se pueden establecer gradientes de tolerancia dentro de un grupo de variedades o genotipos. Es así que se han propuesto parámetros de tolerancia al frío para los distintos genotipos de algunas especies importantes en agricultura, considerando como variedades tolerantes aquellas que

presentan un determinado valor para cada parámetro evaluado (Rizza y col. 1994, Murelli y col. 1995, Zhang y col. 1995). En efecto, la capacidad de acumulación de hidratos de carbono y de prolina y el aumento de algunos ácidos grasos insaturados es superior en las variedades tolerantes al frío que en las susceptibles (Barrientos y col. 1993). La fluidez de la membranas es mayor en las células de variedades tolerantes que en las de variedades susceptibles frente al mismo grado de frío (Leborgne y col. 1992). En variedades de cebada aclimatadas al frío, Murelli y col. (1995) informaron que los ácidos grasos libres y el grado de insaturación fueron superiores en la variedad tolerante, mientras que la prolina y los azúcares solubles fueron muy similares en variedades tolerantes y susceptibles al frío. Zhang y col. (1995) analizaron la respuesta de variedades de maíz tolerantes y susceptibles al frío frente al estrés oxidativo provocado por la exposición al frío, encontrando que en la variedad tolerante las enzimas antioxidantes aumentaron y se produjo menor daño por lipoperoxidación.

1.5 Antecedentes sobre la tolerancia al frío durante la germinación

No obstante el gran volumen de información que existe en relación a los mecanismos de tolerancia al frío en estados avanzados del desarrollo, los antecedentes específicos durante la fase de germinación son escasos, aunque existe alguna información sobre la respuesta al congelamiento en etapas tempranas en especies anuales (Andrews y col. 1960, Roberts y Grant 1968, Cary 1975, ref. Ovcharov 1977, Fuller y Eagles 1978, ref. Sakai y Larcher 1987) y leñosas (Alberdi y Ríos 1983).

La presencia de solutos crioprotectores como los hidratos de carbono se considera importante en la respuesta de tolerancia al frío (ref. Alberdi y Corcuera 1991). Amuti y Pollard (1977) analizaron la presencia de azúcares solubles en las semillas de 31 especies pertenecientes a 10 familias de angiospermas. Los azúcares detectados en semillas secas son sacarosa y los oligosacáridos estaquiosa, rafinosa y verbascosa, junto con ajugosa y pinitol en algunas especies (Ganter y col. 1991). Se ha descrito la importancia de estos hidratos de carbono en la protección frente a la deshidratación natural que sufren las semillas en la maduración (Kermode 1990) y la pérdida de la protección que ocurre durante la germinación, cuando estos azúcares se metabolizan (Koster y Leopold 1988). Es en este sentido de protección frente al ambiente que se ha sugerido que la presencia de sacarosa en el embrión de granos maduros de trigo podría cumplir alguna función en la tolerancia al frío durante el desarrollo del proceso germinativo (Duffus y Binnie 1990). Son escasas las referencias respecto al contenido de aminoácidos como solutos compatibles en semillas en respuesta al frío, no obstante, las semillas secas contienen muy pocos aminoácidos libres que incrementan durante la germinación. Ovcharov (1977) menciona referencias sobre aumento del contenido de hidratos de carbono y aminoácidos, entre ellos prolina, en embriones de trigo y centeno en respuesta a tratamientos de baja temperatura.

Respecto al metabolismo de lípidos, algunos datos sugieren que si el desarrollo y la maduración de las semillas durante la embriogénesis ocurre a bajas temperaturas, los ácidos grasos insaturados aumentan junto con el incremento del grado de insaturación de los ácidos grasos en el grano maduro en avena (Young 1986), en variedades de invierno

de cebada (De Man 1985) y en variedades de arroz tolerantes al frío (Majumder y col. 1989). La exposición al frío y el metabolismo de lípidos durante el proceso de germinación es un tema escasamente tratado en la literatura. Di Nola y Mayer (1985, 1986a,b) estudiaron el metabolismo de fosfolípidos de membrana en ejes embrionarios de arveja durante las primeras 48 horas desde la imbibición tratados a 5 y 25°C. Los resultados mostraron que la tasa de incorporación de colina (Me-¹⁴C) y glicerol (U-¹⁴C) se redujo significativamente a 5°C, aunque el contenido total de fosfolípidos aumentó sobre la base de peso seco en igual magnitud que en el control. La síntesis de ácidos grasos se redujo a 5°C pero varió la distribución porcentual de los ácidos grasos a las 24 horas de la imbibición, disminuyendo la proporción de las especies insaturadas con el frío con la excepción del ácido oleico, que aumentó a 5°C en ambas fracciones. El grado de insaturación no se alteró con el tratamiento frío. En los trabajos citados queda en evidencia que sólo se han estudiado los cambios que ocurren durante las primeras horas desde la imbibición. En consecuencia, es interesante investigar las modificaciones que suceden en el largo plazo hasta la emergencia de la radícula.

Durante el proceso de germinación se ha descrito que el frío afecta la actividad de algunas enzimas, como las que participan en la respiración (Stewart y col. 1990a) y en la degradación amilolítica (ref. Ovcharov 1977, Moraru y Atimoshoae 1985), ambas relacionadas con la generación de energía para el metabolismo embrionario durante y una vez completa la germinación. También se han detectado cambios en el patrón electroforético luego de la aplicación de frío (Zaiter y col. 1994).

De los antecedentes revisados, se deduce que la semilla en germinación es una estructura que puede mostrar tolerancia al frío (Di Nola y Mayer 1985, 1986a,b, Moraru y Atimoshoae 1985, Stewart y col. 1990a, Zaiter y col. 1994), así como frente a otros tipos de estrés (Bradford 1986, Basra y col. 1988, Dell'Aquila y Bewley 1989, Kermodé 1990, Dell'Aquila y Spada 1993, Poljakoff-Mayber y col. 1994, Dell'Aquila y Spada 1994, Bray 1995).

1.6 Objetivos e hipótesis de trabajo

En esta tesis se investigó si los embriones presentan los mismos mecanismos de tolerancia al frío descritos en la literatura para otros estados de desarrollo. El problema de la respuesta al frío durante la germinación se abordó de esta manera debido a que los mecanismos de tolerancia en la fase de la germinación son muy poco conocidos (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989, Hallgreen y Öquist 1990), y el investigar la presencia de mecanismos de tolerancia al frío análogos a los descritos para otros estados del desarrollo de la planta, es una primera aproximación experimental.

La hipótesis que se propone en este trabajo, es que las respuestas de tolerancia al frío en los embriones son iguales a las que operan en las fases más tardías del desarrollo de la planta. Esta proposición se fundamenta en que existe evidencia que los mismos mecanismos de respuesta al estrés se expresan frente a distintos tipos de estrés, en diversos órganos y en diferentes estados de desarrollo de las plantas. En particular:

1) Se ha constatado una conservación de los mecanismos de respuesta que confieren tolerancia a distintos tipos de estrés (Taiz y Zeiger 1991). Así por ejemplo, se ha descrito

aumento de solutos compatibles, cambios en la composición de lípidos de membrana y aparición de péptidos específicos frente a estrés salino e hídrico durante la germinación (Basra y col. 1988, Dell'Aquila y Spada 1993, Dell'Aquila y Spada 1994, Poljakoff-Mayber y col. 1994, Misra y Dwivedi 1995) y en etapas avanzadas del desarrollo (Nilsen y Orcutt 1996).

2) Se ha constatado una conservación de los mecanismos fisiológicos que confieren tolerancia al frío en los distintos órganos de una planta. Así, por ejemplo, se ha descrito aumento de solutos compatibles, cambios en la composición de lípidos de membrana y aparición de proteínas de estrés frente al frío en hojas, raíces y tallos (ref. Hallgreen y Öquist 1990, ref. Alberdi y Corcuera 1991, Livingsgton 1991, Alberdi y col. 1993, ref. Nilsen y Orcutt 1996, Alberdi 1996, Nishida y Murata 1996).

3) Se ha constatado una conservación de los mecanismos fisiológicos que confieren tolerancia al frío en diversas etapas avanzadas del ciclo de vida de la planta. Así por ejemplo, se ha descrito aumento de solutos compatibles, cambios en la composición de lípidos de membrana y aparición de proteínas de estrés frente a las bajas temperaturas durante el estado de plántula (Alberdi y col. 1993, Murelli y col. 1995, Bravo 1997), y estado adulto (Hallgreen y Öquist 1990, Alberdi y Corcuera 1991, Nilsen y Ocurtt 1996, Alberdi 1996).

Para poner a prueba esta hipótesis es necesario trabajar con una especie para la cual se conocieran los cambios fisiológicos asociados con diversos tipos de estrés en distintos órganos y etapas del desarrollo. En el caso de *Avena sativa*, se han estudiado los cambios fisiológicos en la respuesta al frío en hojas, raíces y tallos en las plántulas y

en plantas adultas en variedades con tolerancia diferencial al frío en cuanto a su tolerancia al congelamiento (Cloutier y Andrews 1984, Alberdi y col. 1993), acumulación de solutos compatibles con acción crioprotectora (Alberdi y col. 1993, Livingston 1991) y composición de membranas (Alberdi y col. 1993, Uemura y Steponkus 1994).

Avena sativa es una especie ortodoxa (semillas con 10 a 20% de agua) (Roberts 1973) que puede crecer a temperaturas cercanas a 0°C y, por lo tanto, considerada tolerante al frío (Nilsen y Orcutt 1996), aunque es la más susceptible respecto a los otros cereales de clima frío (centeno, trigo y cebada) (Livingston 1991, Webb y col. 1994). Se clasifica como tolerante (Graham 1983) y moderadamente tolerante (IREN 1982) al frío, dado que las temperaturas mínimas de germinación están entre los 3 y 5°C (IREN 1982, Graham 1983, Mayer y Poljajoff-Mayber 1989). Así, se decidió comparar los cambios asociados a la respuesta al frío en variedades de *A. sativa* con distinto grado de tolerancia al frío durante la germinación.

El objetivo general de esta tesis fue comparar cuantitativamente variedades de *Avena sativa* tolerantes y susceptibles al frío durante la germinación, investigando los parámetros fisiológicos que caracterizan la tolerancia al frío en otros órganos y estados de desarrollo de la planta. El contraste de los resultados obtenidos para la germinación con los descritos para otras etapas del desarrollo, permitirán evaluar la hipótesis que propone que los mecanismos de respuesta al estrés en distintas fases del desarrollo y órganos de la planta son análogos.

Para abordar este objetivo general, se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) caracterizar el proceso de germinación a bajas temperaturas de siete variedades de avena y seleccionar las dos variedades con mayor contraste de tolerancia al frío durante la germinación.
- 2) Caracterizar la respuesta a las bajas temperaturas de las dos variedades seleccionadas en cuanto a sus parámetros hídricos, daño por enfriamiento, tolerancia al congelamiento, incidencia y protección frente al estrés oxidativo asociado al frío y la respuesta de amilasa total durante la germinación, esto es, entre la imbibición de las semillas y la emergencia de la radícula.
- 3) Evaluar los siguientes parámetros fisiológicos en respuesta al frío en los embriones de las dos variedades: a) acumulación de solutos compatibles y b) cambio del patrón lipídico. Estos cambios fisiológicos son los mecanismos de tolerancia al frío mejor conocidos en etapas más avanzadas del desarrollo en avena y otras especies. Recientemente, ha cobrado importancia otro aspecto asociado a la tolerancia al frío, la tasa de respiración. Se ha propuesto que una mayor tasa metabólica confiere mayor tolerancia al frío (Dahal y col. 1996). Este criterio ha sido particularmente utilizado para la discriminación de tolerancia al frío entre variedades. Por esto, otro parámetro fisiológico evaluado en esta tesis fue el consumo de oxígeno en respuesta al frío de los embriones de ambas variedades de avena.

MATERIALES Y METODOS

2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de siete variedades de *Avena sativa* provenientes del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Estación Experimental Carillanca, Temuco, IX Región. Se utilizó semilla de la cosecha de 1992 y 1994 y las condiciones de siembra y manejo fueron similares para todas las variedades (INIA, comunicación personal). Las semillas se mantuvieron en almacenaje seco a 15-20°C desde la cosecha hasta su utilización.

2.2 Ensayo de germinación

Las semillas se lavaron con agua corriente durante 10 minutos para eliminar la contaminación superficial. Las semillas lavadas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio comercial disuelto en agua destilada al 20% durante 10 minutos, enjuagando con agua destilada durante 3 minutos. La siembra se realizó disponiendo 30 semillas en placas de Petri entre dos capas de papel absorbente para homogeneizar la hidratación. Para la imbibición de las semillas se agregaron 8 ml de agua destilada a cada placa y luego de 24 horas se eliminó el exceso de agua manteniendo una humedad adecuada del papel absorbente.

2.3 Tratamiento de temperaturas

Desde el inicio de la imbibición o tiempo cero hasta que las semillas se consideraron germinadas o alcanzaron algún estado de desarrollo predeterminado, las semillas se mantuvieron en cámaras de siembra en oscuridad. Las temperaturas de tratamiento fueron $3 \pm 2^\circ\text{C}$, $6 \pm 2^\circ\text{C}$, $10 \pm 2^\circ\text{C}$, $17 \pm 3^\circ\text{C}$, $20 \pm 3^\circ\text{C}$ y $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Los tratamientos se mantuvieron a una sola temperatura constante. Por razones de infraestructura, en la determinación de los parámetros descritos en las secciones 2.10 a 2.18, los tratamientos de 17°C y 20°C se fundieron en sólo uno a $20^\circ\text{C} \pm 1$.

2.4 Criterios de germinación y etapas del proceso

La germinación tiene un patrón de progreso trifásico: fase I es de aumento rápido, fase II que es estacionaria y fase III que involucra un segundo aumento rápido coincidente con la elongación del embrión (Figura 1). En esta tesis se definieron cuatro fases dentro de esta misma curva de progreso: Estado 1 luego de las 24 a 48 h luego del inicio de la imbibición, Estado 2 de 24 a 48 h antes de la aparición de la coleorriza, Estado 3 coincidente con la emergencia de la coleorriza y Estado 4 coincidente con la emergencia de la radícula (Figura 1). Los Estados 3 y 4 corresponden a estado de desarrollo, por lo que tomaron distintos tiempos según la variedad y la temperatura de tratamiento.

Una semilla se consideró germinada cuando la coleorriza era visible (entre 1 y 2 mm).

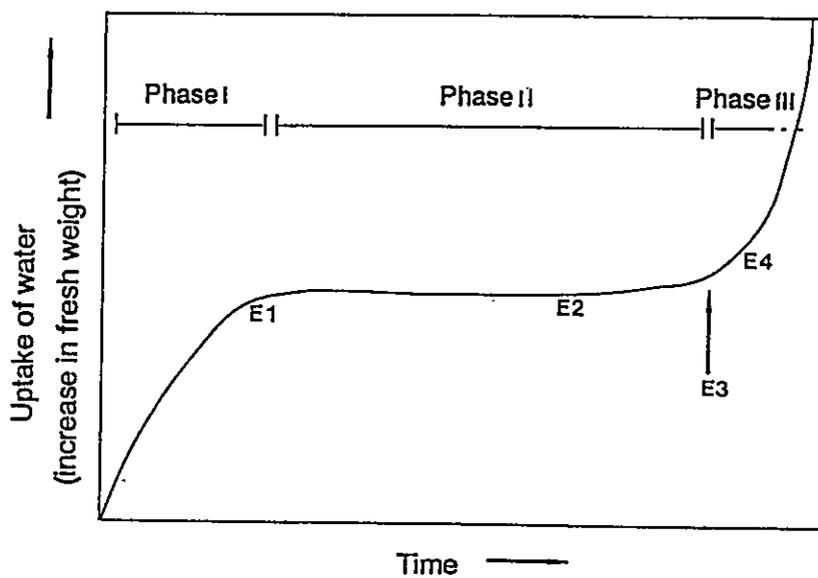


Figura 1. Curva de progreso de la germinación con las Fases I, II y III. Los números 1-4 indican los Estados de la germinación definidos en este trabajo. E1= Estado 1, imbibición; E2 = Estado 2, pre-germinación; E3 = Estado 3, aparición de coleorriza y E4 = Estado 4, radícula de 1 cm de longitud.

2.5 Caracterización de las semillas utilizadas

Se determinó el porcentaje de humedad del grano en estufa de secado (105°C durante 24 horas) y la viabilidad con el test del cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC en amortiguador fosfato pH 7.0) al 1% (ISTA 1987). La viabilidad utilizando rayos X (40 kvp durante 2 minutos) (ISTA 1987) se determinó para las variedades América y OT220xOMIHI.

2.6 Germinación de las semillas a distintas temperaturas

Las semillas de las distintas variedades se mantuvieron a las temperaturas de tratamiento y se registró la germinación desde la aparición de la coleorriza. El registro se realizó durante 20 días. Al final de este período se determinó el número de semillas que no germinaron y su viabilidad con la prueba del TTC.

2.7 Criterios para selección de tolerancia al frío durante la germinación

Para seleccionar la variedad más tolerante al frío durante la germinación se usaron cuatro indicadores comúnmente utilizados para este fin (Scott y col. 1984). Estos indicadores son: Tiempo al Inicio de la Germinación (Ti), Tiempo para la Germinación del 50% de la población (T50), Índice de Germinación (IG) y Coeficiente de Velocidad (CV) (Scott y col. 1984). El T50 se consideró para la selección de las 2 variedades más contrastantes a partir de las 7 variedades iniciales. El Ti, IG y CV se aplicaron sólo a las dos variedades seleccionadas.

El Ti se definió como el número de días comprendido desde el inicio de la imbibición hasta que la primera semilla presentó la coleorriza entre 1 y 2 mm. El T50 se

definió como el número de días transcurrido entre el inicio de la imbibición y la aparición de coleorriza para el 50% de la población. Mientras menores son el T_i y el T_{50} a temperaturas subóptimas, es mayor la tolerancia al frío durante la germinación. Los criterios IG y el CV se aplicaron según la fórmula de Scott y col. (1984) modificadas para la germinación del 50% de la población como: $IG = (\sum T_i \times N_i) / S$ y $CV = 100 \times (\sum N_i / \sum N_i \times T_i)$, donde N_i = semillas germinadas al tiempo i , T_i = tiempo transcurrido desde la siembra y S = número total de semillas.

2.8 Determinación de tolerancia al congelamiento (TL_{50})

La respuesta de las variedades tolerante y susceptible al frío durante la germinación se evaluó como su tolerancia al congelamiento definiendo la temperatura letal para el 50% de la población (TL_{50}). El TL_{50} se determinó para las semillas completas en los cuatro estados descritos (sección 2.4).

El ensayo consistió en exponer grupos de 30 semillas tratadas (20, 10, 6 y 3°C) en los Estados 1 y 2 a temperaturas de 0, -5, -10, -15 o -20°C durante 2 horas en un baño termoregulado Haake. Las semillas se sumergieron en el anticongelante en cápsulas plásticas selladas. Luego de la exposición, las semillas se mantuvieron a 6°C durante una hora para el descongelamiento y se determinó la viabilidad. Inicialmente la viabilidad se midió con el TTC según el ISTA (1987), recuperando el compuesto coloreado con 24 h de extracción en etanol 90%, pero debido a la escasa repetibilidad y a la subjetividad de la superficie expuesta por el corte con este método, se decidió determinar la viabilidad a través del porcentaje de germinación. Para esto, luego del descongelamiento las semillas

tratadas se incubaron en oscuridad a 17°C, la temperatura óptima, durante 10 días. La germinación se registró diariamente. Se realizaron 5 repeticiones por cada temperatura congelante. El valor del TL₅₀ se determinó a partir de una regresión lineal entre las variables porcentaje de germinación y temperatura. Para los estados de coleorriza y radícula (Estados 3 y 4) se aplicó el mismo ensayo pero a temperaturas de 0, -2, -4, -6, -10°C.

2.9 Cosecha del tejido para los análisis

Cuando correspondió, se obtuvo el tejido necesario para los análisis pertinentes. Para ello se eliminó la cubierta de la semilla y el embrión completo se disectó con pinzas finas de punta curva obteniendo el eje embrionario y el escutelo lo más intactos posible y libres de tejido de endosperma. Una vez disectados, los embriones se mantuvieron en hielo hasta registrar el peso fresco del total del tejido obtenido. Cuando fue necesario el endosperma aislado se mantuvo en las mismas condiciones. El tejido se mantuvo congelado a -20°C hasta su utilización. La única excepción se realizó al obtener extracto inmediatamente después de la disección de los embriones para medir actividad enzimática y analizar el patrón electroforético de las proteínas.

Las semillas de la variedad América son más pequeñas que las de OT220xOMIHI y por lo tanto su peso fresco también. En la variedad América 1 g de peso fresco de embriones en el estado de coleorriza correspondió a 262 ± 9 embriones y en la variedad OT220xOMIHI a 194 ± 10 embriones. En el estado de radícula, para América 1 g de

peso fresco correspondió a 121 ± 9 embriones y para OT220xOMIHI a 111 ± 5 embriones.

2.10 Determinación de los solutos compatibles

Los solutos compatibles se determinaron en dos etapas de la germinación: estado del embrión con la coleorriza entre 1 y 2 mm (Estado 3) y estado del embrión con la radícula de 1 cm (Estado 4).

2.10.1 Prolina

El contenido del aminoácido prolina se determinó en embriones aislados según el método de Bates y col. (1973) modificado. Se maceraron 0,25 g de tejido fresco en 5 ml de ácido sulfosalicílico 3%, el extracto se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 10 minutos, se agregó 1 ml de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina en 30 ml de ácido acético y 20 ml de ácido fosfórico 6M) y 1 ml de ácido acético. La mezcla se incubó a 100°C durante 1 h y la reacción se detuvo en hielo. La mezcla se extrajo con 5 ml de tolueno y se midió la absorbancia a 520 nm. La curva de calibración se realizó con L-prolina (SIGMA). Se realizaron tres repeticiones por temperatura.

2.10.2 Sacarosa

Los embriones aislados se extrajeron en etanol 85% 1:3 tejido fresco:etanol (p/v), macerando durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para lograr una mejor extracción

el macerado se mantuvo 24 h a temperatura ambiente en oscuridad. El extracto se centrifugó a 10.000g x 12 minutos en frío y se congeló a -20°C.

El contenido de sacarosa de la muestra se determinó utilizando el método de la antrona según Guy y col. (1992). Una alícuota de 50 µl de la muestra se incubó con 50 µl de KOH 30% a 100°C durante 10 minutos, con el objeto de destruir los monosacáridos (Riazi y col. 1985). Se agregaron 2 ml del reactivo de antrona (1,5 g de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico 70%) y se incubaron a 40°C por 20 minutos. Luego se leyó la A_{620} . Se realizaron 3 repeticiones por punto utilizando una curva de calibración para sacarosa. Aunque este método se supone específico para la determinación de la sacarosa presente en el extracto (Riazi y col. 1985), es posible que ocurra una sobrestimación debido a la posible hidrólisis de oligosacáridos y polisacáridos solubles como los fructanos. En todo caso, determinaciones de calibración con HPLC (Zúñiga, comunicación personal) y con el kit glucosa oxidasa (Boehringer), demostraron que el método de la antrona sobreestima la sacarosa en alrededor de un 5%.

2.10.3 Azúcares solubles totales

En los extractos etanólicos 1:3, los azúcares reductores se determinaron por el método de antrona según Riazi y col. (1985). A 50 µl de muestra se le agregó 1 ml de reactivo de antrona. La mezcla se llevó a 100°C por 10 minutos, se enfrió en hielo y se determinó la absorbancia a 625 nm. Se realizaron tres repeticiones por temperatura expresando la concentración en equivalentes de glucosa.

2.10.4 Fructanos

La determinación de fructanos totales se realizó según el método utilizado por Livingston (1990) y por Vieira y Figueiredo-Ribeiro (1993). El tejido (entre 100 y 300 mg de embrión) se extrajo en etanol 85% en proporción 1:3 peso fresco:etanol y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 12 minutos. Una alícuota de 200 μ l se precipitó con 400 μ l de etanol absoluto. La precipitación se realizó en hielo y luego de una hora se centrifugó durante 12 minutos en una microcentrífuga. El precipitado se resuspendió en 50 μ l de etanol 80%, se agregó 1 ml de reactivo de antrona, se incubó a 37°C durante 45 minutos y se leyó la absorbancia a 618 nm. Este método determina fructanos con grado de polimerización mayor a 6 (GP>6) sin discriminar el grado de polimerización exacto de los fructanos obtenidos. Cada muestra tuvo tres repeticiones y la concentración de fructanos totales se expresó como equivalentes de inulina.

2.11 Determinación de lípidos

2.11.1 Lípidos polares

Se determinaron los lípidos polares a partir de aproximadamente 1 g de tejido de embrión en los Estados 3 y 4 de la germinación. Al tejido recién extraído se le inhibieron las lipasas con isopropanol hirviendo durante 2 minutos. Se eliminó el solvente con una corriente de nitrógeno (g) y los embriones se guardaron secos en ambiente saturado con N_2 a -4°C en oscuridad. Para el aislamiento de lípidos el tejido se maceró 3 veces con 12 ml de mezcla cloroformo:metanol 2:1 en presencia de 0,05% de BTH. Cada vez el tejido se dejó extrayendo durante 30 minutos y filtrando cada extracto por papel Whatman N°1.

Todo el producto de los filtrados se reunió y se agregaron 4 ml de agua destilada, se agitó y se centrifugó a 5.000 rpm (SS-34) durante 5 minutos. Se eliminó la fase superior acuosa. La fase orgánica restante se evaporó en un rotavapor a 40°C, aproximadamente. Los lípidos totales se resuspendieron en 2 ml de cloroformo y se traspasaron a un tubo donde se evaporó el solvente con N₂. El tubo saturado se llevó a oscuridad a -4°C. La muestra se resuspendió en una mezcla cloroformo:ácido acético 10:1 y los lípidos polares se separaron a través del paso por una columna de silica-gel, eluida con 20 ml de metanol. Los lípidos polares disueltos en el metanol se concentraron a sequedad en un rotavapor, se resuspendieron en cloroformo y se trasvasijaron a un tubo de 40 ml con tapa rosca, se desecó con N₂ (g) y se guardaron en oscuridad a -4°C. Cada muestra se hizo con tres repeticiones.

2.11.2 Determinación de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en las muestras de lípidos polares embrionarios se hidrolizaron resuspendiendo en 5 ml de KOH 0,5 N en metanol y se calentaron a 85°C en baño maría. Luego, se ajustó el pH a 3 con HCl y se procedió a metilar según el protocolo de la AOAC (1984). Se agregaron 5 ml de BF₃ en metanol al 12,5% en peso. La mezcla se calentó al baño maría hirviendo por 2 minutos enfriando en hielo para frenar la reacción. Se agregaron 10 ml de solución saturada de NaCl y 2 ml de éter de petróleo. Se extrajo la capa etérea con una pipeta y se lavó con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro. Los ésteres metílicos se disolvieron en éter de petróleo y se analizaron por CG.

La cromatografía de gases se realizó inyectando 0,5 µl de muestra en un cromatógrafo gas-líquido Perkin Elmer Autosystem 9000 equipado con una columna semicapilar RTX-2330 de 30 m, 0,53 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de resina. Los parámetros para la determinación fueron: velocidad de transporte del He de 30 cm/s, detector FID de 250°C con inyector split/splitless 1/100 y temperatura del horno ajustada a un gradiente lineal de 6°C por minuto desde 70 a 210°C. Se utilizó un estándar de ácidos grasos esterificados SIGMA para 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3. También se contrastó con una mezcla de estándares conteniendo 22 ácidos grasos de origen animal y vegetal. Del total de picos detectados, se obtuvo el área que correspondía a los 5 ácidos mencionados y se calculó la relación porcentual entre ellos. El grado de insaturación se calculó de acuerdo a De Man (1985) como:

$$GI = [\%18:1 \times 1 + (\%18:2 \times 2) + (\%18:3 \times 3)] / 100$$

2.12 Determinación de la fluidez de las membranas microsomaes

La fluidez se determinó en fracciones de membrana microsomal utilizando el método de la despolarización de fluorescencia. Para ello se utilizó la sonda fluorescente hidrofóbica di-fenil-hexatrieno (DPH) que se inserta en la parte interna de una membrana. Cuando el DPH se excita con luz polarizada, su emisión es polarizada al máximo si durante su tiempo de vida excitado no cambia su orientación. Si no está rígidamente sujeta entonces cambia de orientación y disminuye la polarización de la luz emitida (Kalyanasundaram 1991). Este cambio dependerá de la microviscosidad del microambiente y es una medida de su fluidez.

2.12.1 Aislamiento de la membrana microsomal

Las fracciones de membrana microsomal se obtuvieron de embriones completos aislados y sumergidos en amortiguador de extracción (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 7,3) en la proporción 1:3. La metodología de aislamiento correspondió al protocolo de Rojas (1991) modificado. El tejido se maceró o se picó en el amortiguador de extracción durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000g por 12 minutos. El sobrenadante se llevó a una ultracentrífuga Sorvall Combi con rotor T880 a 105.000 g durante 1 hora a 4°C. La pella se redisolvió en amortiguador (sacarosa 250 mM, KCl 5 mM, K₂HPO₄ 5 mM pH 7,8) y se congeló a -20°C hasta la lectura. El peso de la fracción microsomal se determinó pesando los tubos de ultracentrífuga secos antes de la centrifugación y con la pella obtenida una vez eliminado el sobrenadante luego de centrifugar. Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra microsomal incubando con Tritón X-100 0,01% y leyendo a 595 nm utilizando el método de Bradford.

2.12.2 Determinación de la polarización

5 ml de las preparaciones de membrana microsomal estandarizadas a A_{520} de 0,1 se incubaron con 2,5 μ l de una solución saturada de DPH en metanol absoluto durante una hora a 30°C. Luego de la incubación, se determinó la despolarización de la fluorescencia en estado estacionario a 4, 20 y 35°C en un espectrofotómetro de fluorescencia GREG 200 formato L del Laboratorio de Fotofísica y Espectroscopía Molecular del Instituto de Química de la Universidad Católica de Valparaíso. La sonda se excitó a 360 nm y la

emisión se registró a 399 nm. Se determinó la polarización de muestras microsomales sin sonda y este valor se restó automáticamente al valor de la muestra con DPH. Con el objeto de conocer la dependencia de la lectura de la concentración de membrana, el mismo protocolo se repitió con preparaciones diluidas hasta 18 veces. Se realizaron 3 repeticiones por punto.

2.13 Determinación de proteínas

2.13.1 Proteínas solubles

Se determinaron según el método de Bradford (1976). Una alícuota de la muestra mas agua destilada hasta completar 100 μ l se agregaron a 1 ml de reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie R disueltos en 50 ml de etanol 95% y se agregan 100 ml de ácido fosfórico 85% p/v llevando posteriormente a 1 litro con agua bidestilada). Las muestras se leyeron a una absorbancia de 595 nm usando como estándar BSA 1 mg ml⁻¹.

2.13.2 Actividad enzimática

Con el fin de evitar contaminaciones de hongos y bacterias para la detección de actividad amilasa y catalasa se utilizó un sistema esterilizado con manejo de la esterilización y siembra de las semillas en una cámara de flujo laminar. Las semillas se esterilizaron 2 veces con hipoclorito de sodio comercial 20% que contenía 4 gotas de Tween-20 por 100 ml de solución. Las semillas se mantuvieron durante 10 minutos en esta solución y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. La siembra se realizó en placas

esterilizadas y se adicionó agua destilada estéril con cloranfenicol 10 µg/ml (García-Maya y col. 1990).

El tejido embrionario se maceró en amortiguador esterilizado en presencia de 5 inhibidores de proteasas (SIGMA) en concentraciones de 5 µg/ml cada uno: PMSF (100 mM en isopropanol absoluto), Antipain (10 mg/ml en metanol absoluto), Leupeptin (10 mg/ml en metanol absoluto), Pepstatin A (1 mg/ml en metanol absoluto) y Chymostatin (10 mg/ml en metanol absoluto). Los inhibidores se agregaron en el momento de la extracción suponiendo que la actividad inhibitoria de la mezcla dura hasta 1 hora.

2.13.2.1 Actividad amilasa

Las semillas sin embrión se maceraron en amortiguador acetato de sodio 1 mM pH 4,8 y CaCl₂ 10 mM (Acevedo 1991). El macerado se centrifugó a 12.000 x g durante 12 minutos a 4°C. El sobrenadante se congeló a -20°C. La actividad amilasa se determinó según el protocolo descrito por Acevedo (1991) modificado. A 850 µl de amortiguador de actividad (acetato de sodio 50 mM pH 4,8, CaCl₂ 20 mM, NaCl 60 mM y almidón 0,03% p/v) incubados a 30°C se agregaron 10 µl de muestra. La mezcla se mantuvo durante 20 minutos y se frenó la reacción agregando 1 ml de reactivo de yodo (6 g de KI y 0,6 g de I₂ se llevan a 100 ml de agua destilada, preparando el reactivo 1% v/v en agua destilada). El blanco se frenó inmediatamente con el reactivo y se mantuvo en hielo. La absorbancia se leyó a 585 nm. La curva de calibración se realizó con concentraciones conocidas de almidón (0 a 240 µg).

2.13.2.2 Actividad catalasa

El tejido embrionario se maceró en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0, EDTA 0,1 mM (Fadzillah y col. 1996). El extracto se centrifugó en frío a 12.000 rpm durante 12 minutos. La actividad se determinó como la desaparición del H_2O_2 a 240 nm (Worthington 1988). A 1 ml de amortiguador fosfato pH 7,0 más 0,15% de H_2O_2 . Se calculó el dA en 1 minuto y se consideró que 0,05 dA/min es igual a 3,4 Unidades. Se calculó la actividad en Unidades mg de proteína⁻¹.

2.14 Efecto del ácido giberélico

Los experimentos de germinación con ácido giberélico se realizaron utilizando soluciones entre 0 y 10^{-5} M. El ácido se disolvió en un etanol concentrado diluido posteriormente en agua destilada.

2.15 Determinación de estrés oxidativo

2.15.1 Determinación de malonaldehido (MDA)

La producción del MDA se detectó por el método del ácido tiobarbitúrico según el método descrito por Zhang y col. (1995) modificado. 0,25 g de peso fresco se maceraron con TCA 10% y el extracto se centrifugó a 12.000 x g por 5 minutos. 1 ml del sobrenadante se mezcló con 1 ml de TBA 1% agregando 200 μ l de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se calentó a 95°C durante 30 minutos, se enfrió en hielo y se leyó la A_{532} restando el valor de la absorbancia no específica (A_{600}). La concentración del

MDA se calculó utilizando un coeficiente de extinción de 150.000. Se realizaron 3 repeticiones por muestra.

2.15.2 Determinación del estrés oxidativo en embriones intactos

El estrés *in vivo* se evaluó midiendo la oxidación del sustrato diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína DCFDA (Molecular Probes) según el método de Caro y Puntarulo (1996) modificado. El método se basa sobre la detección de los compuestos oxidantes exudados por el tejido a través del sustrato que a su vez se oxida y emite fluorescencia. Para ello 2 a 3 embriones intactos se incubaron en 10 ml de un amortiguador Tris-HCl 40 mM pH 7,0 en presencia de 5 μ M del DCFDA. Luego de 30 minutos se obtuvo el sobrenadante y se monitoreó la fluorescencia en un espectrofluorímetro con excitación a 488 nm y emisión a 525 nm. Para el análisis del efecto de la respiración sobre la oxidación del DCFDA las muestras se incubaron en el mismo medio en presencia de KCN 0,5 mM. Las correcciones se hicieron con un blanco sin embriones en presencia o ausencia de KCN 0,5 mM. Cada muestra tuvo 3 repeticiones.

2.16 Determinación de parámetros hídricos

2.16.1 Absorción de agua

La absorción de agua se registró gravimétricamente como aumento del peso fresco en mg de agua. Se expresó como porcentaje de aumento respecto al tiempo cero de imbibición.

2.16.2 Potencial hídrico

Los potenciales hídricos del embrión se determinaron utilizando el método descrito por Pritchard y col. (1995), que utiliza soluciones de polietilenglicol (PEG) 8.000 según la ecuación desarrollada por Michel y Kaufmann (1973):

$$\Psi_{\text{solute}} = -(1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})CT + (8,39 \times 10^{-7})C^2T,$$

donde C es la concentración de PEG en g/k agua y T es la temperatura en °C. Para esta determinación se aislaron embriones intactos, se registró el peso fresco lo más rápidamente posible y se sumergieron en soluciones de PEG de potencial de solutos conocido. El tejido se mantuvo en las soluciones a 20°C hasta lograr el equilibrio de potenciales, es decir, hasta que el peso fresco se hiciera constante, lo que tomó entre 24 y 72 horas. Las soluciones se renovaron diariamente para evitar contaminaciones.

2.16.3 Contenido Relativo de Agua (CRA)

El CRA de los embriones se determinó según la fórmula desarrollada por Kramer (1974):

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS} / \text{P Turgente} - \text{PS}) \times 100.$$

donde PF, PS y P turgente son los pesos fresco, seco y a turgencia máxima, respectivamente. El peso a turgencia máxima se obtuvo manteniendo el tejido en agua destilada a 20°C hasta lograr valores de peso constante.

2.17 Determinación de la actividad respiratoria

La respiración en embriones intactos se determinó como el consumo de oxígeno en un sistema cerrado utilizando un electrodo tipo Clark (oxígrafo YSI modelo 5300) a 20°C.

Se disectaron entre 10 a 15 embriones intactos en Estado II y III o 10 a 12 en Estado IV e inmediatamente se transfirieron a 6 ml de una solución completamente aireada de MES-KOH 10 mM pH 6,9 (Leprince y col. 1992). Se agregó KCN 0,5 mM como inhibidor y la vía alternativa de la respiración se inhibió con SHAM 15 mM (Leprince y col. 1992). Cada determinación se realizó entre 0 y 20 minutos con tres repeticiones. De acuerdo a las indicaciones del equipo, se consideró que en los 6 ml había 1,422 μ moles de O_2 valor al lo que se le asignó un 100%.

2.18 Medida de la conductividad eléctrica (CE)

La CE de las semillas se determinó con el fin de evaluar el posible daño por imbibición en frío. Grupos de 60 semillas se sumergieron en 30 ml agua desionizada. Las semillas se embebieron a 20, 10 y 3°C y se determinó la CE del extracto entre 0 y 60 minutos a intervalos de 5 minutos y a las 24 horas. Antes de cada lectura las semillas se agitaron para homogeneizar el extracto y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 minuto.

2.19 Análisis estadístico

Se utilizaron preferentemente métodos estadísticos no paramétricos. Este tipo de análisis estadístico se denomina también método de distribución libre, debido a que no es dependiente de un tipo determinado de distribución de los datos, como en el caso de la estadística paramétrica (e.g. test de Student, ANOVA) que exige una distribución normal. Esta estadística es efectiva para un gran número de distribuciones y es por lo tanto,

particularmente recomendable para conjuntos de datos con bajo número de muestras (Siegel y Castellan 1988). Para la comparación de grupos pareados de datos correspondientes a dos muestras (e.g. variedad Tolerante y variedad Susceptible) se utilizó el test de Mann-Whitney (U test). Para comparaciones con más de dos muestras se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Para los análisis de correlación entre dos variables cuyos datos no presentaron una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de correlación de Spearman. Para el diseño de estos tests no paramétricos se consultaron principalmente los textos de Sokal y Rohlf (1981) y Siegel y Castellan (1988). Para la realización y evaluación de la significancia estadística se utilizaron las tablas estadísticas publicadas en Rohlf y Sokal (1981). En la ejecución y evaluación de los test se utilizó el programa computacional MINITAB (ver MINITAB for Windows McKenzie y col. 1995).

Las temperaturas letales para el 50% de la población de semillas (TL_{50}) se determinaron a partir de las ecuaciones de regresión lineal entre las temperaturas congelantes y el porcentaje de germinación (Sokal y Rohlf 1981).

3.1 Caracterización de las variedades de avena

3.1.1 Caracterización de la semilla

Las semillas de *Avena sativa* de las siete variedades estudiadas presentaron elevados porcentajes de viabilidad, entre un 90 y un 100%, determinada con el método de la tinción al cloruro de tetrazolio (TTC) (Tabla 1). El porcentaje de humedad del grano fluctuó entre un 7 y un 10%, lo cual está entre las características de esta especie (IREN 1982) que se considera ortodoxa (Tabla 1). Las épocas de siembra recomendadas por el INIA para estas variedades, permiten suponer que todas ellas pueden germinar durante el período invernal (Tabla 1).

3.1.2 Porcentaje de germinación

La germinación medida como porcentaje de semillas con la coleorriza de 2 mm (Estado 3) ocurrió en un rango amplio de temperaturas para las siete variedades estudiadas (Figura 2). Las variedades OT220xOMIHI y América alcanzaron elevados porcentajes de germinación entre los 3 y los 17°C. En este rango de temperaturas sus porcentajes de germinación fueron superiores a los del resto de las variedades analizadas, que en las mismas condiciones experimentales sólo alcanzaron un máximo cercano al 70%. Los porcentajes de germinación más elevados se encontraron entre los 3 y los 10°C, con una marcada disminución sobre los 20°C para todas las variedades muestreadas. En la Figura 2 se observa también que ninguna de las variedades germinó a 0°C. La temperatura

Tabla 1. Caracterización de las semillas de 7 variedades de avena (*Avena sativa* L.) según la viabilidad y el contenido de humedad. Las semillas provenían del INIA, Estación Carillanca, IX Región. La viabilidad se determinó con el método del TTC y la humedad en estufa de secado a 105°C por 24 horas. Las fechas de siembra corresponden a las recomendaciones del INIA para la zona centro-sur (Rivas, comunicación personal).

Variedad	Viabilidad (%)	Humedad (%)	Epoca de Siembra
Nehuen	90	10,0 ± 3,1	mayo-septiembre
OT220xOMIHI	100	9,3 ± 2,3	junio-agosto
Ancafen	97	8,0 ± 2,1	mayo-septiembre
Llaofen	98	10,0 ± 2,2	marzo-septiembre
Urano	96	7,3 ± 2,4	marzo-agosto
Yecufen	94	9,9 ± 2,1	mayo-agosto
América	100	7,0 ± 2,8	junio-agosto

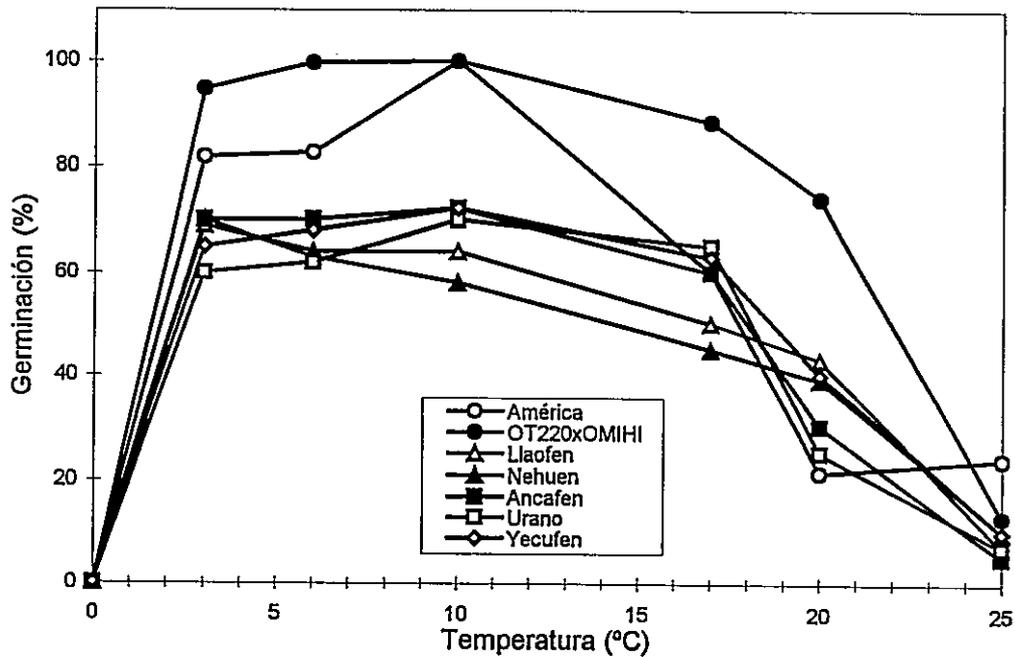


Figura 2. Germinación de siete variedades de *Avena sativa* en un rango de temperatura. Las semillas se germinaron en placas Petri en oscuridad a temperatura constante. Cada punto corresponde al promedio de 5 a 8 repeticiones de 30 semillas cada una. Todas las desviaciones estándar son inferiores al 10% y se omitieron para facilitar la comprensión de la figura.

mínima a la cual se registró germinación fue de 3°C para todas las variedades. De acuerdo a Mayer y Poljakoff-Mayber (1989), para la determinación de la temperatura mínima de germinación es necesario precisar el intervalo de tiempo considerado para el ensayo y el porcentaje final alcanzado. Según el IREN (1982), las variedades chilenas que no germinan dentro de los primeros 15 días después de la siembra se consideran incapacitadas para hacerlo. La determinación de los porcentajes de germinación se realizó a los 15 días de ensayo (Figura 2).

Para evaluar la incidencia del número de días del ensayo en la determinación de la temperatura mínima de germinación y del porcentaje final, se cuantificaron estos parámetros para la variedad América, considerando cinco intervalos de tiempo (Figura 3). Se pudo observar que la temperatura mínima de la germinación se redujo al considerar períodos más largos de ensayo.

3.1.3 Termodormancia

Al aplicar el TTC a las semillas de avena embebidas a temperaturas altas que no habían germinado luego de 15 días desde la imbibición se comprobó viabilidad cercana al 100%, lo que sugirió la presencia de termodormancia. Para comprobarlo, a un grupo de semillas que no había germinado luego de 15 días 25°C se le aplicó GA_3 10^{-5} M y se obtuvo más del 50% de germinación a las 48 horas de la aplicación a la misma temperatura (Tabla 2). Del mismo modo, se realizó cultivo *in vitro* de los embriones aislados provenientes de semillas mantenidas a 25°C durante 15 días (Tabla 3) y se demostró que la termodormancia no es una característica embrionaria, sino que proviene de las estructuras

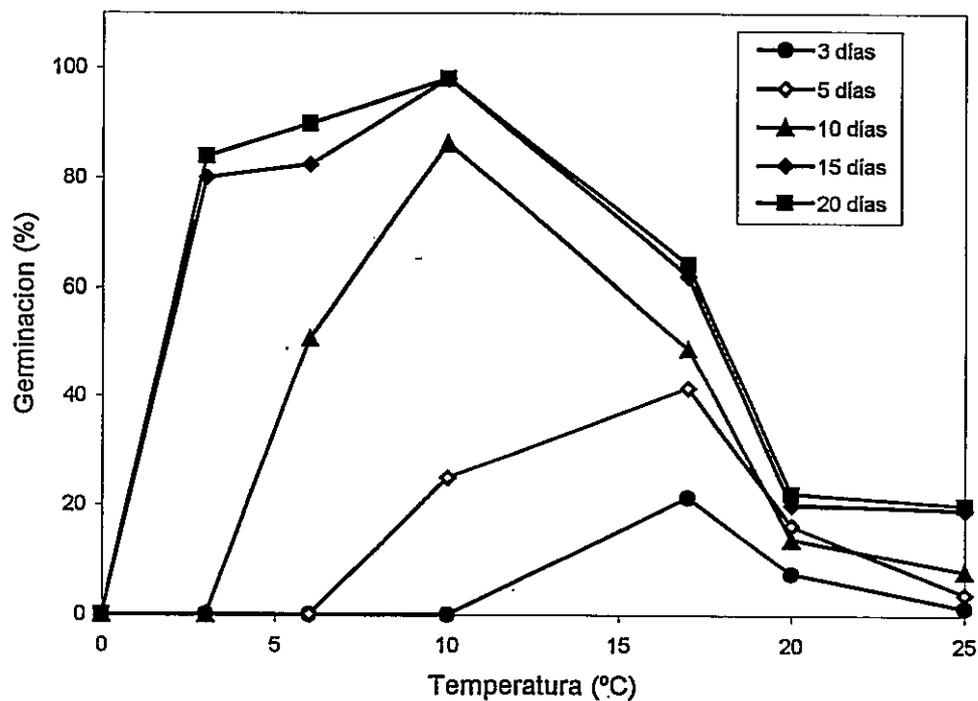


Figura 3. Germinación de la avena variedad América en un rango de temperatura en distintos intervalos de ensayo (3 a 20 días). Las semillas se germinaron en oscuridad a temperatura constante. Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones con 30 semillas cada una. Todas las desviaciones estándar son inferiores al 10% y se omitieron para facilitar la comprensión de la figura.

Tabla 2. Efecto del ácido giberélico (GA_3) sobre el porcentaje de germinación de tres variedades de avena. Las semillas evaluadas se habían mantenido embebidas a $25^\circ C$ durante 10 días sin registrar germinación. Un grupo se incubó en GA_3 y se mantuvo en oscuridad a $25^\circ C$ durante 48 horas. El control corresponde a grupos de semillas sin aplicación de hormona. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones de 30 semillas cada una. \pm desviación estándar.

Variedad	Germinación (%)	
	Control	GA_3 $10^{-5}M$
Nehuen	0	$60,0 \pm 3,0$
América	0	$75,3 \pm 2,8$
OT220xOMIHI	0	$53,0 \pm 3,4$

Tabla 3. Porcentaje de germinación *in vitro* para semillas y embriones de las variedades de avena OT220xOMIHI y América. Las semillas deshidratadas o sus embriones disectados se sembraron en medio de cultivo Murashige-Skoog sin hormonas y se incubaron en oscuridad a temperatura constante. La germinación se registró como aparición de la coleorriza o como elongación del embrión aislado. Los valores entre paréntesis corresponden al número de días en que se alcanzaron los porcentajes de germinación registrados. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones de 5 muestras cada una. La desviación estándar fue inferior al 10%.

Temperatura (°C)	Germinación (%)			
	OT220xOMIHI		América	
	semilla	embrión	semilla	embrión
25	0 (>15)	100 (2)	0 (>15)	100 (1)
3	89 (11)	100 (7)	100 (9)	100 (5)

asociadas como testa, pericarpio y endosperma. En este caso se utilizó la germinación a 3°C como control de la termodormancia.

Para evitar el efecto de la termodormancia y dado el prolongado período de almacenaje requerido para superarla (Corbineau y col. 1991), se planteó en esta tesis utilizar el cultivo *in vitro* de embriones aislados. Sin embargo, debido a la necesidad de mantener los embriones intactos en su relación con el endosperma y debido a la gran cantidad de tejido requerido para realizar los distintos análisis, se prefirió emplear la semilla completa aumentando el número de repeticiones a las temperaturas cercanas a 20°C.

3.1.4 Criterios de tolerancia al frío durante la germinación

En la literatura se menciona una serie de indicadores de tolerancia al frío durante la germinación (Scott y col. 1984). Con el fin de describir la respuesta intravarietal e intervarietal se utilizó el criterio más comunmente citado para contrastar el grado de tolerancia a cada temperatura y en cada variedad, este es el tiempo transcurrido para la germinación del 50 % de la población o T50, donde la tolerancia es inversa al valor de T50 a temperaturas subóptimas (Scott y Jones 1985, Scott y col. 1984).

Las variedades Nehuen y OT220xOMIHI presentaron los valores de T50 más bajos y las variedades Yecufen y América los más altos a las temperaturas de 17°C (control) y a temperaturas bajas (10, 6 y 3°C) (Tabla 4). Los valores altos de T50 indican una mayor susceptibilidad al frío. Así, Nehuen y OT220xOMIHI representan las

Tabla 4. Tiempo en días en que se alcanza el 50% de la germinación de una muestra de semillas (T50) para 7 variedades de avena. Las semillas se incubaron a temperatura constante en oscuridad durante 15 días. Cada valor corresponde al promedio de 5 repeticiones de 30 semillas cada una. \pm desviación estándar.

Variedad	T50 (días)			
	17°C	10°C	6°C	3°C
Nehuen	4,00 \pm 0,33	4,20 \pm 0,03	6,00 \pm 0,50	11,00 \pm 0,24
OT220xOMIHI	4,30 \pm 0,70	4,00 \pm 0,00	7,00 \pm 0,03	11,00 \pm 0,29
Ancafen	4,83 \pm 0,40	4,30 \pm 0,70	8,00 \pm 1,08	11,00 \pm 0,77
Llaofen	4,74 \pm 0,85	3,90 \pm 0,24	8,00 \pm 0,97	12,00 \pm 0,64
Urano	4,27 \pm 0,73	5,80 \pm 0,38	8,00 \pm 0,34	12,00 \pm 0,67
Yecufen	5,10 \pm 0,94	6,30 \pm 0,73	9,00 \pm 0,78	15,00 \pm 0,34
América	5,60 \pm 0,51	6,50 \pm 0,76	10,50 \pm 0,06	14,90 \pm 0,35

variedades con mayor tolerancia al frío, mientras que Yecufen y América corresponden a las más susceptibles al frío.

Como variedad tolerante se decidió trabajar con OT220xOMIHI y como variedad susceptible se decidió trabajar con América, debido a que estas dos variedades, además de poseer T50 contrastantes, presentaron los más altos porcentajes de germinación (Figura 2) y corresponden a las variedades descritas como tolerante y susceptible para los estados de plántula en laboratorio y de planta adulta en terreno por Alberdi y col. (1993). Estos antecedentes permitirán la comparación de los resultados de respuesta al frío en la germinación de semillas con los resultados descritos en la literatura para etapas posteriores del desarrollo de la planta.

La diferencia entre los T50 de las variedades OT220xOMIHI (tolerante) y América (susceptible) se incrementó con la disminución de la temperatura. Así, la diferencia de T50 entre estas variedades fue de 1,3 días a los 17°C, de 2,5 días a los 10°C, de 3,5 días a los 6°C y de 3,9 días a 3°C (Tabla 4). De esta manera, se encuentra que la diferencia en tolerancia al frío entre estas dos variedades es más manifiesta a temperaturas más bajas. Se estableció la temperatura de 17°C como control porque : a) tuvo los menores T50 y b) a temperaturas superiores ocurrió germinación más precoz pero no se alcanzó el 50% de la germinación después de 15 días de incubación.

3.2 Caracterización de las variedades seleccionadas

En los resultados descritos a continuación se denominará Tolerante al frío durante la etapa de germinación a la variedad OT220xOMIHI y Susceptible al frío durante esta misma etapa a la variedad América.

3.2.1 Viabilidad y características morfológicas

Para verificar la viabilidad de las semillas utilizadas en el contraste de tolerancia, se aplicó la metodología no destructiva de rayos X (ISTA 1987). Se encontró un 96,7 y un 92,0% de viabilidad para las variedades Tolerante y Susceptible, respectivamente (Figura 4, Tabla 5), lo que mostró una reducción respecto al método del TTC (Tabla 1). Las características morfológicas generales de las dos variedades seleccionadas muestran que la Tolerante tuvo una cantidad significativamente mayor de biomasa de endosperma (Mann-Whitney $U=9$, $n=3$, $P\leq 0.05$) y cantidad similar de tejido embrionario en el grano seco respecto a la Susceptible (Tabla 5). El índice heterotrófico refleja la relación tejido de reserva versus embrión (Klimov 1983) y fue superior en la variedad Tolerante, pero la diferencia no alcanzó a ser significativa (Tabla 5).

3.2.2 Evaluación de los criterios de tolerancia en las variedades seleccionadas

Con el fin de evaluar cuantitativamente las diferencias en el grado de tolerancia entre OT220xOMIHI y América, ambas variedades se sometieron a cuatro criterios propuestos en la literatura (Scott y Jones 1982, Scott y col. 1984) para estimar la tolerancia al frío

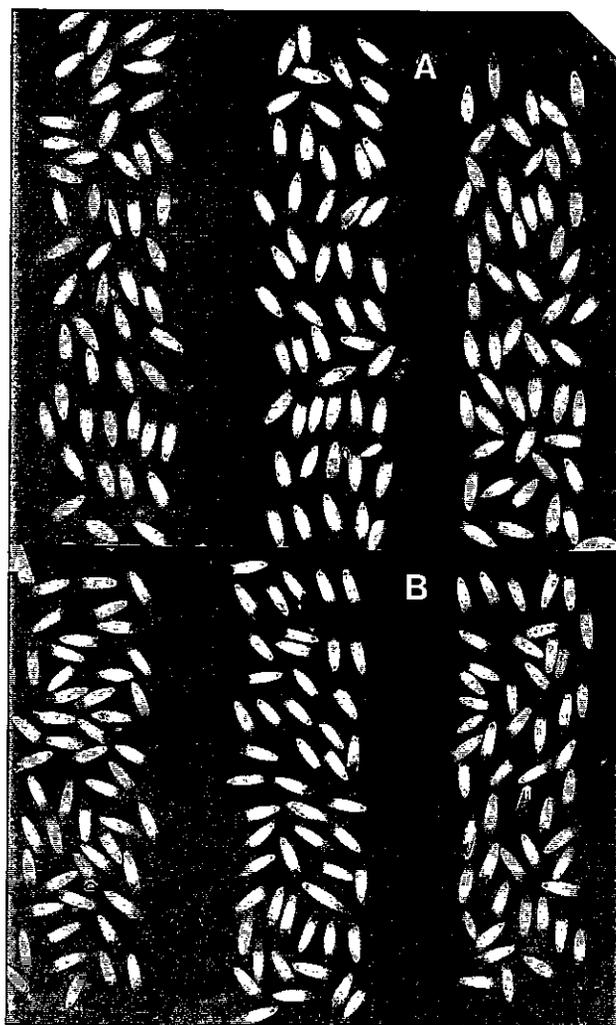


Figura 4. Fotografía de rayos X de las semillas de las variedades A) Tolerante (OT220xOMIHI) y B) Susceptible (América). La viabilidad se calculó como el porcentaje de semillas opacas a la luz. Las determinaciones se realizaron en 3 repeticiones de 50 semillas cada una. Las flechas muestran las semillas no viables.

Tabla 5. Caracterización de las variedades Tolerante (OT220xOMIH) y Susceptible (América) según la viabilidad y relaciones de masa del grano seco. La viabilidad se determinó con el método de rayos X. El Índice Heterotrófico es la razón endosperma/embrión. Cada valor corresponde al promedio de 5 repeticiones. \pm desviación estándar.

Característica	Variedades	
	Tolerante	Susceptible
Viabilidad (%)	96,7 \pm 4,2	92,0 \pm 2,0
Endosperma (mg)	35,63 \pm 1,20	27,55 \pm 2,02
Embrión (mg)	3,68 \pm 0,80	2,41 \pm 0,35
Índice Heterotrófico	11,68 \pm 3,53	9,68 \pm 3,28

durante la germinación: tiempo de inicio de la germinación (T_i), T_{50} , índice de germinación (IG) y coeficiente de velocidad (CV) (Figuras 5 y 6, sección 2.7).

Un T_i menor indica mayor tolerancia. Se determinó diferencia estadística entre las dos variedades (Kruskal-Wallis $H=60,12$, $N=8$, $P\leq 0.001$). Se contrastaron ambas variedades a cada temperatura y no se detectaron diferencias significativas a 17 y 10°C ($U=30$, $n=8$, n.s.) (Figura 5A). Para las temperaturas de 6 y 3°C en cambio, el T_i fue significativamente menor para la variedad Tolerante ($U=100$, $n=8$, $P\leq 0.001$).

Un T_{50} menor también indica mayor tolerancia al frío y en este caso, la variedad Tolerante tuvo valores de T_{50} significativamente inferiores a la Susceptible ($H=54.76$, $N=8$, $P\leq 0.001$). Al contrastar las variedades a cada temperatura se detectaron diferencias significativas entre 10 y 3°C ($U=100$, $n=8$, $P\leq 0.01$) (Figura 5B). A 17°C en cambio, no hubo diferencias entre variedades ($U=30$, $n=5/8$, n.s.).

Tanto el IG como el CV se calcularon a partir de los valores promedio medidos para T_{50} . El IG estima el tiempo que toma la germinación del total de semillas considerando como base el tiempo real para la germinación de la mitad de la población, por lo tanto, mientras menor sea el valor del IG mayor será la tolerancia al frío. El IG calculado para las dos variedades mostró valores inferiores para la variedad Tolerante en todo el rango de temperaturas, particularmente a 3 y 6°C (Figura 6A). El CV describe la relación entre la mitad de la población de semillas y el tiempo que demora su germinación, entonces, mientras menos tiempo tome la germinación mayor será el CV y mayor también la tolerancia. El CV evaluado para el 50% de la población fue superior para la variedad Tolerante en todo el rango de temperaturas muestreado (Figura 6B). De

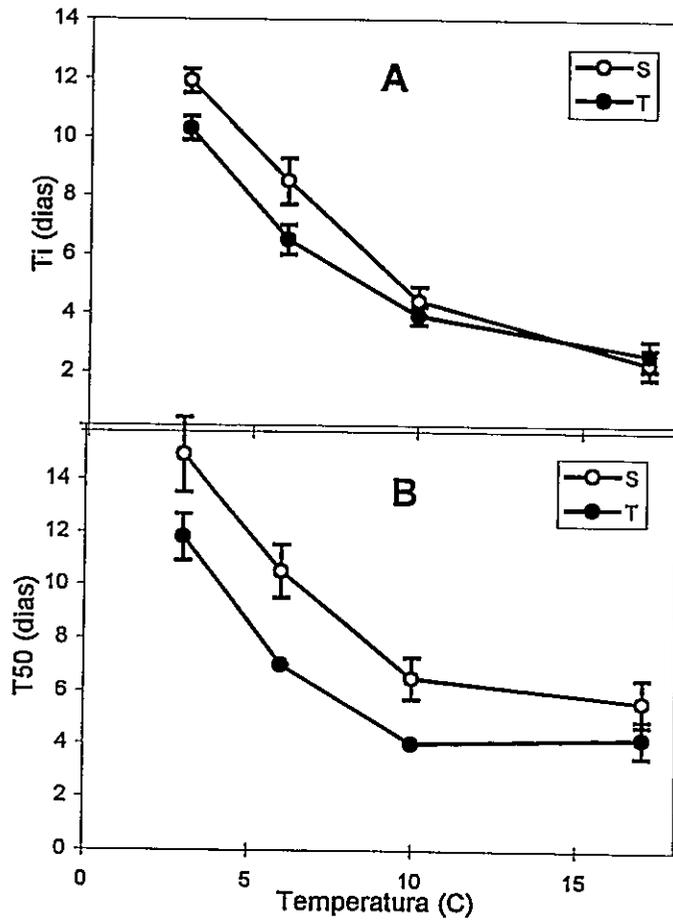


Figura 5. Criterios de tolerancia al frío durante la germinación de las variedades Tolerante (T, OT220xOMIHI) y Susceptible (S, América). A) Tiempo de inicio de la germinación (Ti) y B) Tiempo al 50% de a germinación. Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones. Las barras corresponden a la desviación estándar.

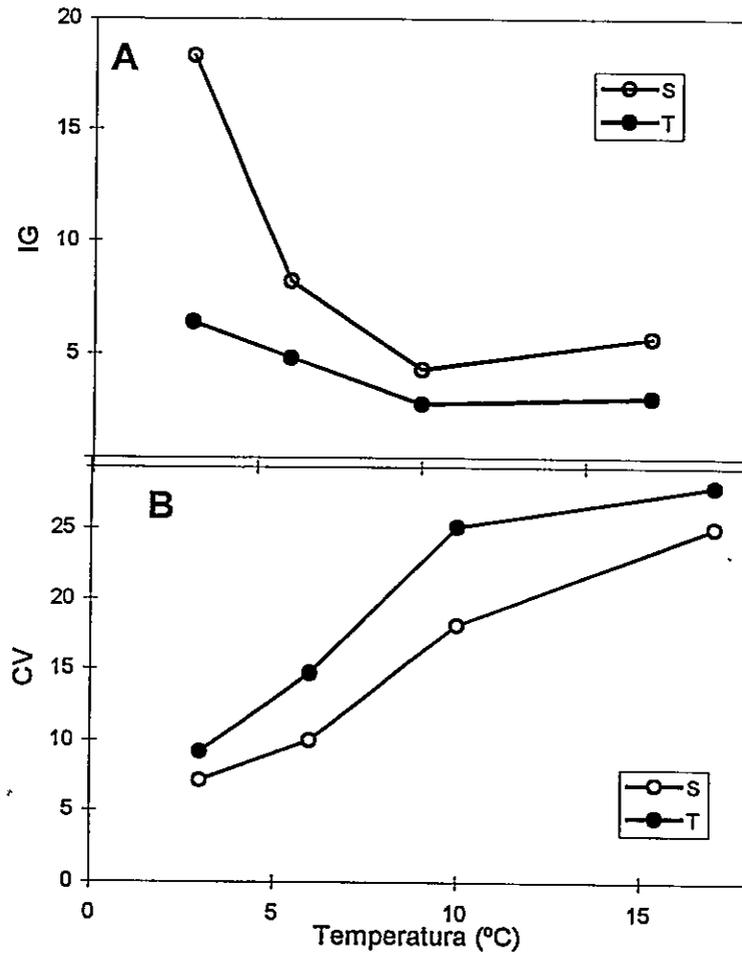


Figura 6. Criterios de tolerancia al frío durante la germinación de las variedades Tolerante (T, OT220xOMIHI) y Susceptible (S, América). A) Índice de Germinación (IG) y B) Coeficiente de Velocidad (CV). Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones de 30 semillas cada una.

acuerdo a los cuatro criterios empleados, la variedad OT220xOMIHI fue significativamente más tolerante al frío durante la germinación que la variedad América.

En el intento de definir una temperatura mínima de germinación fuera del rango estudiado, se analizó el comportamiento de las semillas a 0°C por tiempos superiores a los 15 días determinados previamente (Figura 2). A esta temperatura la germinación se inició sólo en la variedad Tolerante aproximadamente a los 36 días desde el inicio de la imbibición ($T_i = 36,4 \pm 2,8$ días), mientras que la variedad Susceptible no registró germinación dentro de los 60 días del ensayo. Aunque resultó interesante definir un tratamiento de temperatura mínima a la cual sólo la variedad Tolerante germinara, éste se hizo impracticable debido al bajo rendimiento del tejido para análisis y a la alta incidencia de infecciones fungosas.

3.2.3 Cinética de la germinación

La cinética de la germinación de las variedades seleccionadas se siguió diariamente durante 18 días (Figuras 7 y 8). La germinación a 25°C no superó el 20% en ambas variedades y comenzó entre los 4 y 5 días en ambos casos (Figuras 7A y 8A). La variedad Tolerante tuvo mayores porcentajes de germinación a 17 y 20°C que la variedad Susceptible, aunque esta última fue más precoz. Las temperaturas de 25 y 20°C mostraron claramente el efecto de la termodormancia. Las semillas expuestas al frío, a 10, 6 y 3°C, tuvieron mayores porcentajes finales de germinación y éstos se alcanzaron cada vez más tarde con la menor temperatura en ambas variedades (Figuras 7B y 8B). La germinación a 10, 6 y 3°C mostró un comportamiento sigmoideo y se aprecia que aún

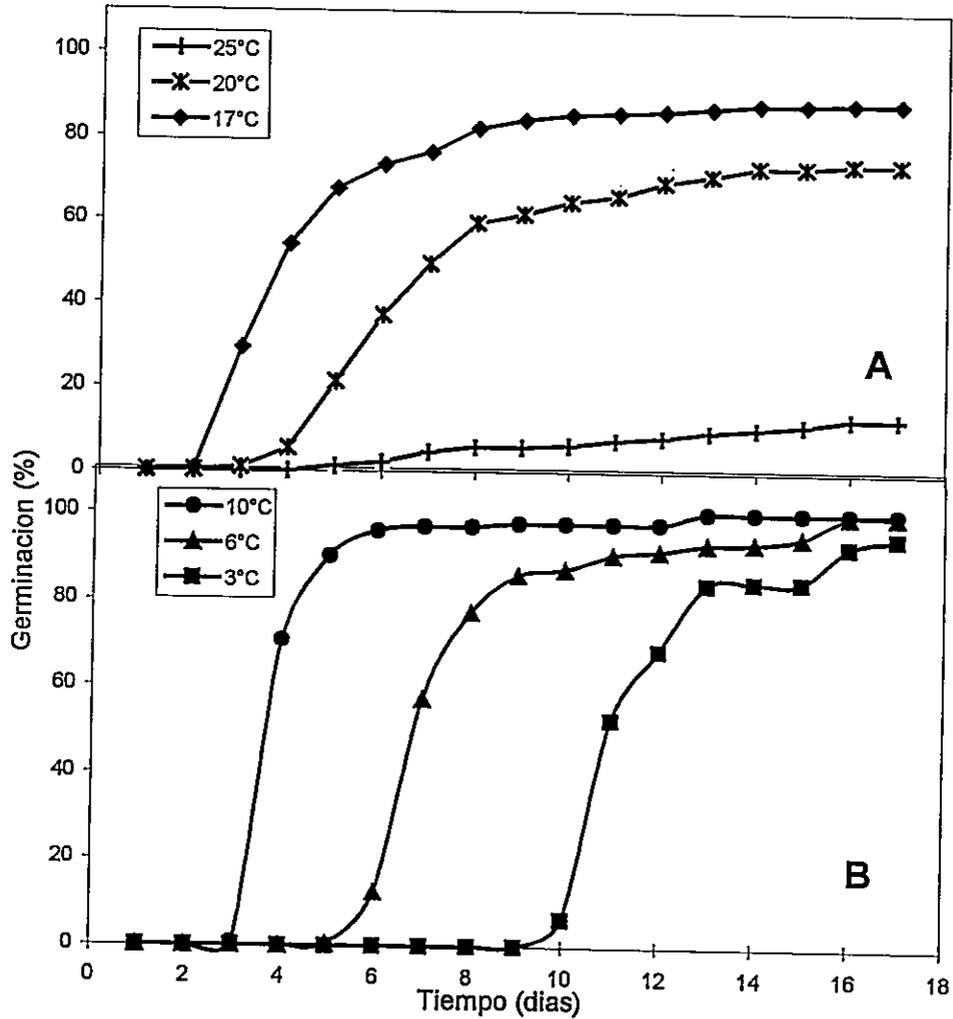


Figura 7. Germinación acumulada de la variedad Tolerante (OT220xOMIHI) para las temperaturas A) 25, 20 y 17°C y B) 10, 6 y 3°C. Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones de 30 semillas cada una. Todas las desviaciones estándar fueron inferiores al 10%.

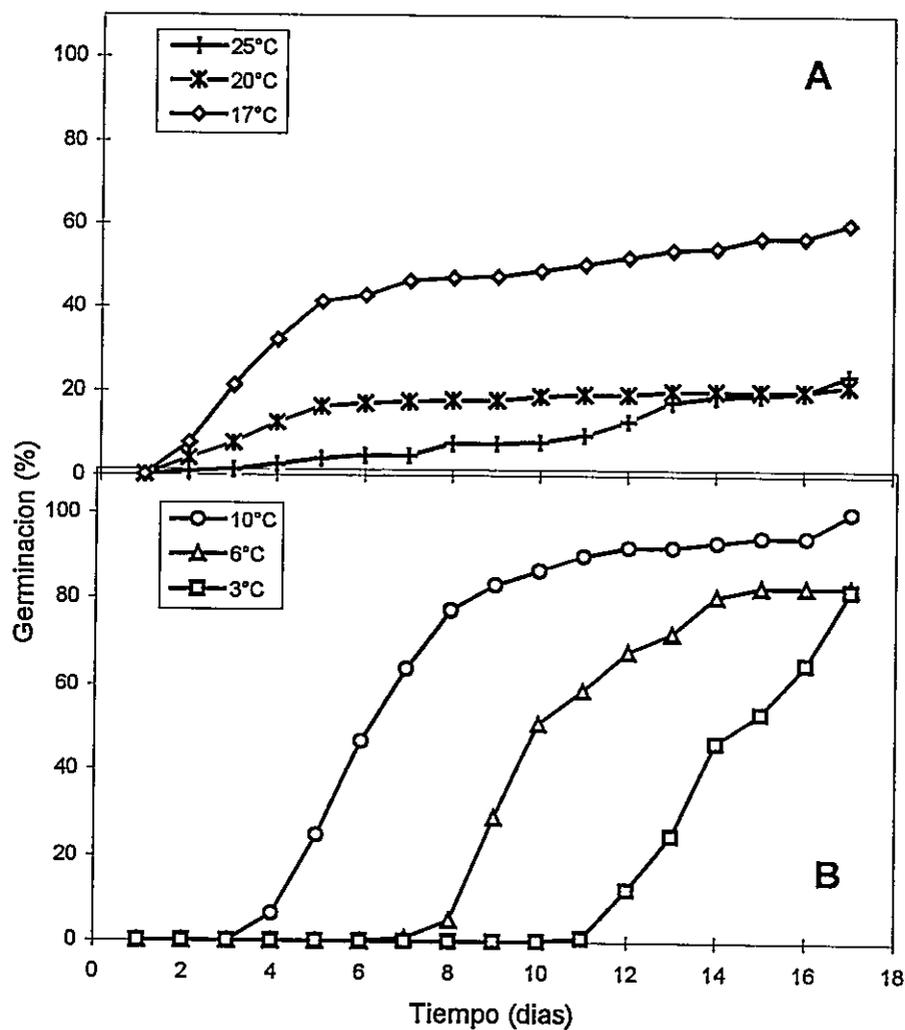


Figura 8. Germinación acumulada para la variedad Susceptible (América) para las temperaturas A) 25, 20 y 17°C y B) 10, 6 y 3°C. Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones de 30 semillas cada una. Todas las desviaciones estándar fueron inferiores al 10%.

cuando el frío indujo un retardo en el inicio de la germinación respecto a las temperaturas de 17 y 20°C, las semillas exhibieron mayor sincronía y homogeneidad de la respuesta que se tradujo en una pendiente característica para cada variedad. La pendiente de las curvas de la germinación en frío (10-3°C) fue más pronunciada para la variedad Tolerante que para la Susceptible, lo que implica que el 50% de la germinación ocurrió en lapsos más cortos (Figuras 7B y 8B) y que la población es más homogénea en cuanto al carácter de germinación. De las Figuras 7B y 8B se deduce que además del menor T_i para la variedad Tolerante a la misma temperatura baja, el tiempo transcurrido entre el inicio de la germinación y la germinación de la mitad de la población es menor en la variedad Tolerante. Al mismo tiempo, una vez gatillado el proceso de germinación ocurre en la misma forma, esto es, que la pendiente de germinación es similar para todos los tratamientos entre 10 y 3°C en una misma variedad.

3.2.4 Tasa de germinación

Como se señaló previamente, pese a la diferencia significativa encontrada en la tolerancia al frío entre las dos variedades seleccionadas, ambas germinaron a 3, 6 y 10°C con porcentajes elevados pero lo hicieron en tiempos diferentes, con una sigmoidea que se desplazó hacia la derecha con mayor intensidad del frío (Figuras 7B y 8B). De ahí que la diferencia entre las variedades radica más bien en el tiempo requerido para el inicio de la germinación, es decir en la fase de latencia desde la imbibición. Este fenómeno puede quedar mejor descrito intra e intervarietalmente usando la tasa de germinación.

Se calculó la tasa de germinación para la mitad de la población como el recíproco del tiempo desde el inicio de la imbibición (Roberts 1988) (Figura 9A). La tasa de germinación se redujo con el frío en ambas variedades. La variedad Tolerante tuvo mayor tasa de germinación a entre 10 y 3°C y tuvo diferencias estadísticas a 6 y 3°C ($U=98$, $n=8$, $P \leq 0.001$). Si la tasa de germinación se calcula como el lapso comprendido entre el tiempo de inicio y el tiempo en que la mitad de la población germina, se tiene que la variedad Tolerante superó a la Susceptible en todo el rango de temperaturas estudiado (Figura 9B). La tasa de germinación fue superior con temperaturas entre 10 y 3°C en ambas variedades y tuvo un incremento especialmente elevado a 10°C para la variedad Tolerante.

Se puede concluir que las temperaturas entre 10 y 3°C retardan la ocurrencia de la germinación, pero una vez iniciado el proceso, la velocidad de germinación se mantiene relativamente constante. Esto significa que para que la germinación se gatille puede requerir un umbral metabólico. Se puede pensar que aquello que permite que la germinación ocurra, puede detectarse en una fase inmediatamente posterior como la aparición del primer signo visible de la germinación, que es la coleorriza en el caso de la avena.

3.2.5 Daño por frío durante la imbibición

Para descartar que el frío produjera daño a nivel de las membranas durante la imbibición, se evaluó la pérdida de iones midiendo la CE del agua de imbibición a los 60 minutos (Figura 10) y a las 24 horas de imbibición (Tabla 6). Los valores de CE superiores a la

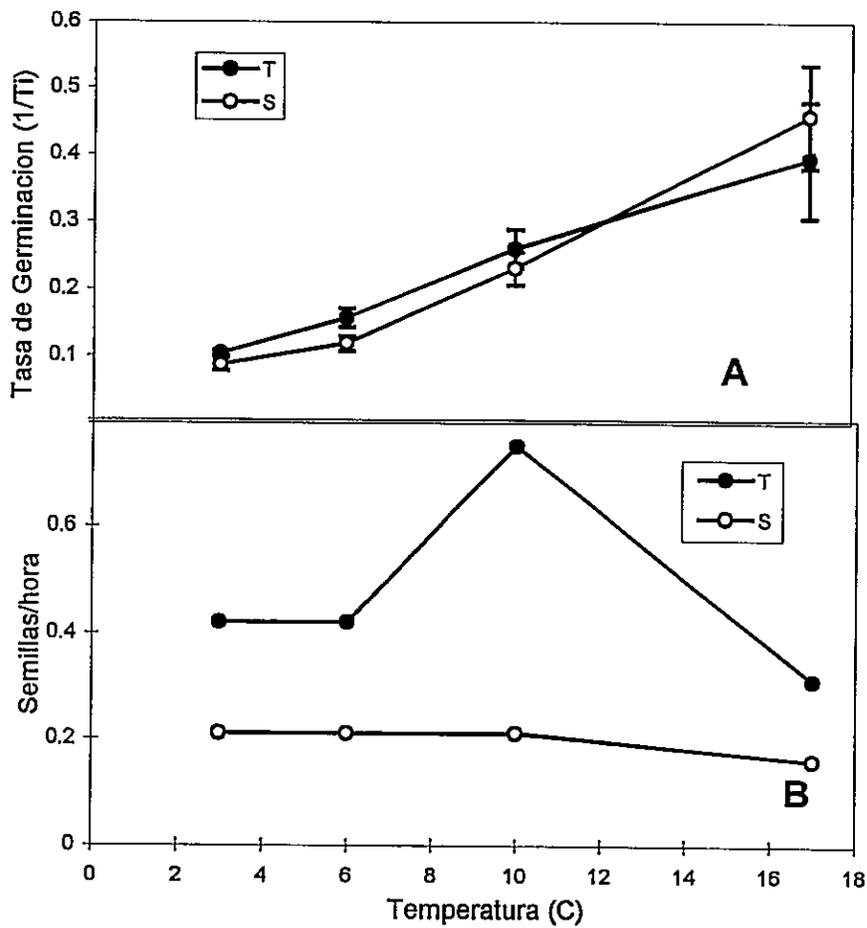


Figura 9. Tasa de germinación de las variedades Tolerante (T, OT220xOMIHI) y Susceptible (S, América) determinada como A) $1/T_i$ y B) número de semillas/hora para alcanzar el 50% de la germinación. Cada punto corresponde al promedio de 8 repeticiones de 30 semillas cada una. Las desviaciones estándar fueron inferiores al 10%.

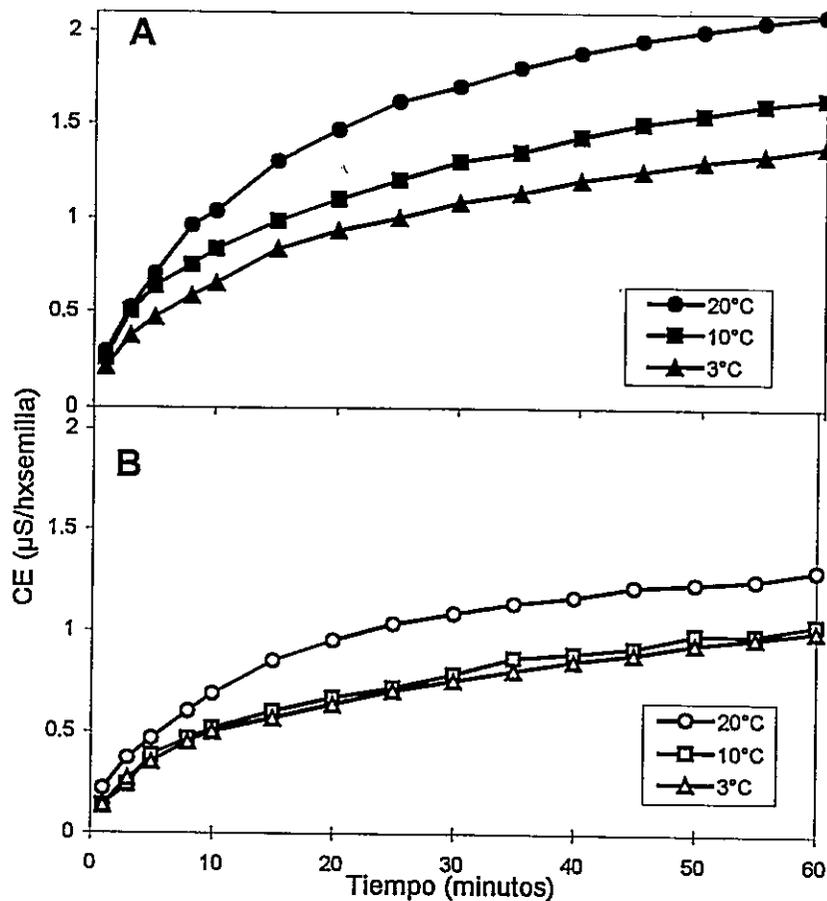


Figura 10. Conductividad eléctrica (CE) a distintas temperaturas de imbibición de las semillas de las variedades A) Tolerante (OT220xOMIHI) y B) Susceptible (América) durante los primeros 60 minutos sometidas a un rango de temperatura. 60 semillas se embebieron en 30 ml de agua desionizada a temperatura constante. Cada punto corresponde al promedio de 3 repeticiones. La desviación estándar fue inferior al 10%.

algún factor en particular. Por esta razón, la variación de p se expresó como una relación porcentual para cada una de las repeticiones, asignando cada vez un valor de 100% al valor de p medido en la membrana del tratamiento de 20°C del Estado 3 de la variedad Tolerante. De esta forma se pudo comparar la reducción relativa de p entre variedades y para cada una de ellas (Tabla 12).

De los valores de p transformados a porcentaje, se puede comparar el comportamiento de las membranas microsomales entre las variedades. Para los Estados 3 y 4 existió una tendencia a la reducción de los valores de p , y por ende al aumento de la fluidez, en la variedad Tolerante que en la Susceptible. Sin embargo, estas tendencias no fueron significativas. Al analizar el comportamiento de la fluorescencia, se puede esperar que la p de los embriones crecidos a 3°C y medidos a 4°C fuera similar a la de aquellos crecidos a 20°C y medidos a 20°C, sin embargo, consistentemente las membranas no mostraron los mismos valores y por ende no tuvieron la misma fluidez durante la incubación de crecimiento.

3.7 Determinación de lípidos

3.7.1 Ácidos grasos de la fracción de lípidos polares

Se estudió la distribución porcentual de 6 ácidos grasos aislados de la fracción polar embrionaria en los Estados 3 y 4 (Tablas 13 y 14). En todos los casos el ácido graso más abundante fue el linoleico (18:2) con un 40% aproximadamente. Le siguió el ácido oleico (18:1) con un 28 a 38%, el ácido palmítico (16:0) con alrededor de un 15% y los ácidos

Tabla 12. Valores de polarización (p) para las fracciones microsomas de las variedades Tolerante (OT220xOMIH) y Susceptible (América) expresados como porcentaje. Las membranas microsomas de embriones germinados a 20 y 3°C se incubaron con la sonda DPH y se leyó la fluorescencia emitida a diferentes temperaturas. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones. \pm desviación estándar.

Lectura (°C)	Polarización (%)							
	Estado 3				Estado 4			
	Tolerante		Susceptible		Tolerante		Susceptible	
	20°C	3°C	20°C	3°C	20°C	3°C	20°C	3°C
4	100	89,2 \pm 3,1	98,5 \pm 31,2	95,0 \pm 9,3	101,2 \pm 2,7	100,9 \pm 7,5	90,8 \pm 8,3	98,2 \pm 10,1
20	79,2 \pm 3,3	69,3 \pm 4,1	77,1 \pm 24,0	76,7 \pm 4,1	81,3 \pm 0,3	73,3 \pm 6,3	77,8 \pm 9,8	77,7 \pm 9,8
35	60,6 \pm 10,9	52,8 \pm 9,6	57,5 \pm 5,6	59,3 \pm 6,4	63,2 \pm 9,6	60,2 \pm 12,1	58,3 \pm 6,3	58,5 \pm 18,0

Tabla 13. Distribución porcentual de ácidos grasos de la fracción polar del embrión en el Estado 3 de la germinación para las variedades Tolerante (OT220xOMIH) y Susceptible (América) al frío. El análisis se realizó utilizando CG. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones. \pm desviación estándar.

Acido graso	% (mol/mol)					
	Tolerante			Susceptible		
	20°C	10°C	3°C	20°C	10°C	3°C
16:0	17,0 \pm 2,4	15,5 \pm 2,4	17 \pm 1,1	14,1 \pm 2,5	16,0 \pm 2,0	17,0 \pm 1,3
16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	1,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	2,2 \pm 0,5	1,4 \pm 0,1
18:1	34,4 \pm 1,1	34,7 \pm 1,9	34,0 \pm 1,2	35,8 \pm 1,1	38,0 \pm 1,9	37,3 \pm 1,2
18:2	42,2 \pm 0,3	44,0 \pm 3,0	42,7 \pm 1,0	44,0 \pm 3,2	40,0 \pm 3,2	40,0 \pm 1,7
18:3	4,9 \pm 1,2	5,0 \pm 1,4	4,9 \pm 1,2	4,9 \pm 1,9	3,9 \pm 1,4	4,0 \pm 1,2
18:2/16:0	2,48	2,83	2,51	3,43	2,34	2,35
GI	1,34	1,38	1,34	1,38	1,30	1,30

Tabla 14. Distribución porcentual de los ácidos grasos de la fracción polar del embrión en el Estado 4 de la germinación para las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) al frío. El análisis se realizó utilizando CG. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones. \pm desviación estándar.

Acido graso	% (mol/mol)					
	Tolerante			Susceptible		
	20°C	10°C	3°C	20°C	10°C	3°C
16:0	13,7 \pm 2,3	13,9 \pm 3,1	14,8 \pm 2,4	16,3 \pm 2,1	17,1 \pm 3,1	15,7 \pm 1,2
16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	4,0 \pm 0,3	3,3 \pm 0,5	2,4 \pm 0,8	2,1 \pm 0,3	2,4 \pm 0,0	2,1 \pm 0,0
18:1	26,3 \pm 3,7	28,0 \pm 3,3	26,1 \pm 1,4	37,2 \pm 3,7	35,2 \pm 3,3	36,6 \pm 2,3
18:2	48,7 \pm 3,2	48,3 \pm 4,4	45,3 \pm 3,1	39,1 \pm 3,1	38,1 \pm 3,2	38,3 \pm 2,6
18:3	7,3 \pm 1,3	6,5 \pm 2,4	11,4 \pm 3,6	5,3 \pm 2,0	7,2 \pm 2,4	7,3 \pm 1,9
18:2/16:0	3,55	3,47	3,06	2,39	2,22	2,43
GI	1,46	1,44	1,50	1,31	1,33	1,35

linolénico (18:3) y esteárico (18:0) con un 10 a 15% en conjunto. El ácido (16:1) estuvo ausente en todos los casos.

La aplicación de los tratamientos de 10 y 3°C no provocó grandes variaciones en la distribución porcentual de los ácidos grasos (Tablas 13 y 14). En el Estado 3 las diferencias basales que se pueden apreciar entre variedades son básicamente mayor proporción de 16:0 en la variedad Tolerante y menor proporción en el 18:1, respecto a la variedad Susceptible. El frío de 3°C no provocó cambios en la variedad Tolerante, mientras que en la Susceptible se registró un aumento en 16:0, 18:1 y una reducción de 18:2 y 18:3.

En el Estado 4 los niveles basales fueron diferentes a los encontrados en el 3. En la variedad Tolerante se detectó disminución de 18:1 y aumento del 18:2 y 18:3. En la variedad Susceptible se detectó una disminución en 18:2, 18:3 y aumento en 16:0 y 18:1. Las variedades difirieron en este estado fundamentalmente en los ácidos oleico y linoleico, sin embargo, los GI se mantuvieron constantes. El frío de 3°C provocó cambios en la variedad Tolerante reduciendo 18:0 y 18:2 y aumentando 18:3. En la variedad Susceptible hubo reducción de 16:0 y aumento del 18:3.

3.7.2 Proteínas de la membrana

Se calculó el contenido de proteínas de la fracción microsomal para ambas variedades en el Estado 4 de la germinación (Tabla 15). La variedad Tolerante tuvo mayor contenido de proteínas a nivel basal que la variedad Susceptible. Además, el tratamiento a 3°C provocó

Tabla 15. Contenido de proteínas de la fracción microsomal de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) en el Estado 4. Las membranas aisladas se pesaron en incubaron con Triton X-100 durante 20 minutos. Posteriormente se determinó el contenido de proteínas según Bradford (1976). Cada valor corresponde al promedio de 2 repeticiones.

Temperatura (°C)	mg proteína/mg membrana	
	Tolerante	Susceptible
20	59,97	41,50
3	62,74	49,29

un aumento de la concentración de proteínas de un 5 y un 18% para las variedades Tolerante y Susceptible, respectivamente.

3.8 Consumo de oxígeno

Se comparó el consumo total de oxígeno de los embriones de avena intactos creciendo a 3°C en los Estados 2, 3 y 4 de la germinación (Figura 26). Los resultados mostraron que el consumo total de oxígeno por embrión fue significativamente superior para la variedad Tolerante en todos los estados de desarrollo ($U=16$, $n=4$, $P\leq 0.05$).

El consumo de pre-emergencia (Estado 2) es particularmente importante porque denota la tasa metabólica que tienen las semillas justo antes de germinar y que podría ser una causal para la mayor o menor tolerancia al frío. Debido a que los embriones de la variedad Tolerante son más grandes y de mayor peso que los de la variedad Susceptible, se expresó el consumo de pre-emergencia en base al peso (Tabla 16). Se encontró que la diferencia significativa se mantenía a favor de la variedad Tolerante, demostrándose que la tasa de consumo de esta variedad duplica el consumo de la Susceptible ($U=16$, $n=4$, $P\leq 0.05$).

El consumo de oxígeno aumentó con el estado de desarrollo en las dos variedades y la relación de consumo Tolerante/Susceptible fue de 1,6 y 1,5 para los Estados 3 y 4, respectivamente. La variedad Tolerante aumentó el consumo entre etapas entre 1,5 y 1,9 veces, en cambio la variedad Susceptible lo hizo 2 veces.

Con el fin de conocer la contribución de las vías citocromo y alternativa al consumo total, las tasas de respiración se determinaron utilizando inhibidores de ambas

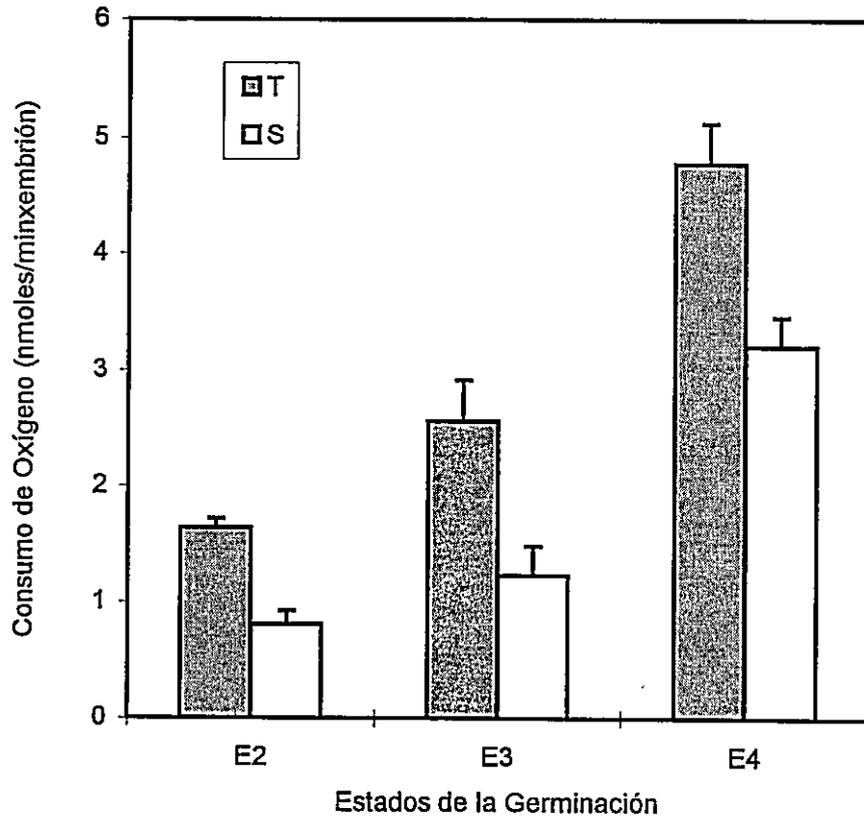


Figura 26. Consumo de oxígeno a 3°C de los embriones intactos de las variedades Tolerante (T, OT220xOMIHI) y Susceptible (S, América) durante los Estados 2 (E2), 3 (E3) y 4 (E4) de la germinación. Cada valor corresponde al promedio de 3 y 4 repeticiones. Las barras representan la desviación estándar.

Tabla 16. Consumo de oxígeno a 3°C durante el estado de pre-emergencia (Estado 2, E2) expresado por embrión y por peso fresco (PF) y seco (PS) de tejido embrionario, para las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América). Cada valor corresponde al promedio de 4 repeticiones. \pm desviación estándar.

Variedad	nmoles O ₂ /min		
	<i>embrión</i>	<i>mg PF</i>	<i>mg PS</i>
Tolerante	1.640 \pm 0.82	0.434 \pm 0.033	1.802 \pm 0.086
Susceptible	0.810 \pm 0.166	0.242 \pm 0.050	0.979 \pm 0.190

vías. La vía citocromo se inhibió con cianuro y la vía alternativa con SHAM en presencia de cianuro. La respiración residual fue el consumo en presencia de cianuro y SHAM. Las concentraciones empleadas corresponden a las recomendadas normalmente para tejido intacto como embriones (Leprince y col. 1992) y secciones de hoja (Lambers 1985).

El consumo de la vía citocromo y de la vía alternativa aumentó con el estado de desarrollo en ambas variedades y fue superior en la variedad Tolerante (Tabla 17). En ambas variedades y para las tres etapas estudiadas, los electrones fluyeron predominantemente a través de la vía citocromo que alcanzó alrededor de un 70% del consumo (Figura 27). La vía alternativa tuvo entre un 13 y un 18% del consumo, mientras que la respiración residual llegó hasta el 15% aproximadamente en las dos variedades.

Los resultados mostraron que la variedad Tolerante presentó una tasa de consumo total de oxígeno significativamente superior en el momento de la pre-germinación respecto a la Susceptible a 3°C. Sin embargo, no hubo diferencias intervarietales en la contribución parcial de las vías citocromo y alternativa con el frío.

Tabla 17. Consumo de oxígeno a 3°C de las vías citocromó c y alternativa, para embriones intactos de las variedades Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) en los Estados 2 (E2), 3 (E3) y 4 (E4) de la germinación. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones. \pm desviación estándar.

Variedad	Consumo de O ₂ (nmoles/minxembrión)							
	Estado 2		Estado 3		Estado 4			
	Vía citocromo c	Vía alternativa	Vía citocromo c	Vía alternativa	Vía citocromo c	Vía alternativa	Vía citocromo c	Vía alternativa
Tolerante	1.151 \pm 0.069	0.252 \pm 0.018	1.416 \pm 0.009	0.431 \pm 0.127	3.340 \pm 0.046	0.618 \pm 0.040		
Susceptible	0.579 \pm 0.024	0.122 \pm 0.048	0.860 \pm 0.081	0.219 \pm 0.071	2.071 \pm 0.013	0.336 \pm 0.010		

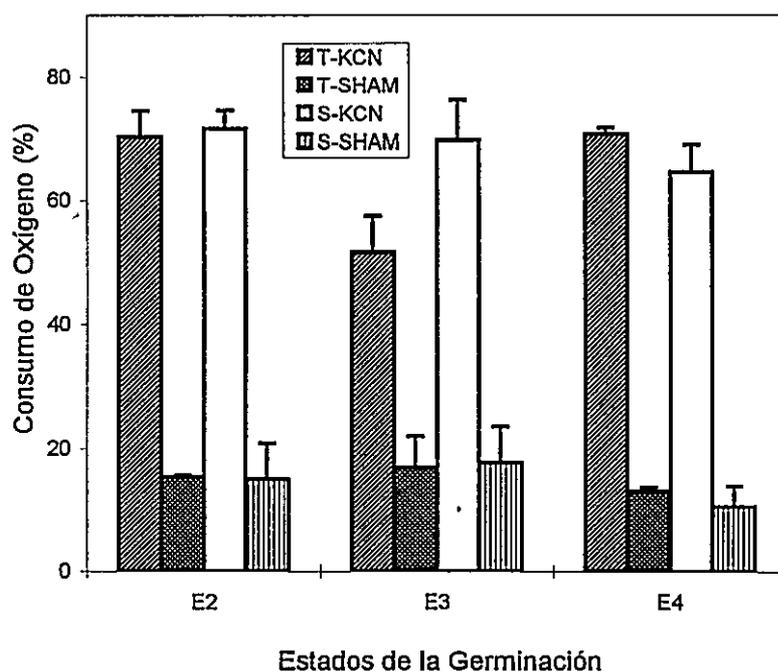


Figura 27. Consumo relativo de oxígeno a 3°C de los embriones intactos de las variedades Tolerante (T, OT220xOMIHI) y Susceptible (S, América) con inhibidores para la vía sensible al cianuro (-KCN) y al SHAM (-SHAM), en los Estados 2 (E2), 3 (E3) y 4 (E4) de la germinación. Cada valor corresponde al promedio de 3 y 4 repeticiones. Las barras representan la desviación estándar. Los valores absolutos del consumo se encuentran en la Tabla 17.

4.1 Caracterización de la germinación de la *Avena sativa*

Las siete variedades de *Avena sativa* analizadas germinaron entre 3 y 25°C, con porcentajes máximos de germinación entre los 3 y 10°C y con diferencias varietales entre estos porcentajes. El rango de temperaturas de germinación encontrado para las avenas en este trabajo, contrasta con las temperaturas óptimas de alrededor de 20°C descritas para esta especie en Chile por el IREN (1982). El rango de 18 a 24°C indujo sólo un 10 a 20% de la germinación, mientras que todas las variedades mostraron un máximo alrededor de los 10°C.

Todas las variedades en estudio presentaron algún grado de termodormancia. El fenómeno de la termodormancia se induce por la exposición de las semillas a temperaturas cercanas a los 20°C, aunque germinan fácilmente entre 5 y 10°C (Labouriau 1983, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). La termodormancia se ha descrito para la avena y otros cereales y se elimina por almacenaje en seco entre 6 a 8 meses después de la cosecha (Côme y Corbineau 1989, Corbineau y col. 1991) o por la aplicación de ácido giberélico (Bradbeer 1988, Bewley y Black 1994). Se desconoce el mecanismo que gatilla la termodormancia, pero se ha relacionado con un aumento de la sensibilidad al ABA en condiciones de alta temperatura (Corbineau y col. 1991).

4.1.1 Criterios de tolerancia al frío durante la germinación

Las variedades estudiadas difirieron en el porcentaje de germinación alcanzado en un mismo período. Con el fin de analizar la tolerancia al frío durante la germinación, la aplicación de un criterio usual en la evaluación de este carácter, el T50, permitió seleccionar en primera instancia las dos variedades de mayor contraste, OT220xOMIHI y América, en cuanto al tiempo para obtener la germinación de la mitad de la población de semillas (Cannon y col. 1973, McConnell y Gardner 1979, Maluf y Tigchelaar 1980, Berrie y Taylor 1981, Scott y Jones 1982, Scott y Jones 1985, Bacon y col. 1983, Hoard y Crosbie 1985, Wolf y col. 1986, Martin y col. 1988). La aplicación de éste y de otros criterios (Scott y col. 1984, Scott y Jones 1985) estableció diferencias estadísticamente significativas entre ellas clasificándose entonces a la variedad OT220xOMIHI como Tolerante y a la variedad América como Susceptible. Este resultado coincide con el contraste documentado entre estas variedades respecto a la tolerancia al frío en dos estados fenológicos más tardíos: estado de plántula en laboratorio y planta adulta en terreno (Alberdi y col. 1993). Las variedades seleccionadas no sólo se diferenciaron en los criterios de tolerancia clásicos, sino también en la tasa de germinación que fue superior para la variedad Tolerante en el intervalo de 10 a 3°C.

4.2 Caracterización de la germinación de las variedades seleccionadas

4.2.1 Relaciones hídricas

Es relevante observar que las variedades Tolerante y Susceptible mantuvieron la integridad de sus membranas durante la imbibición en frío, es decir, no presentaron daño.

Esto se demostró porque los valores de CE y de proteínas en el agua de imbibición fueron inferiores al control y también por el elevado porcentaje de germinación después de 48 horas de tratamiento de 10 y 3°C. El daño por frío, en contraste, se describe como una pérdida excesiva de iones, proteínas, azúcares y otros metabolitos provocada por la alteración de las membranas celulares en la reorganización de la estructura durante la imbibición y ocurre en algunos cereales como arroz, maíz y sorgo a temperaturas entre 0 y 15°C (Wolk y Herner 1982, Graham 1983, Pandey 1992).

Respecto a la imbibición inicial de las semillas de avena o fase I de la germinación, ésta ocurrió rápidamente dentro de las tres primeras horas y no mostró dependencia de la temperatura, dado que se trata de un proceso puramente físico (Koller 1972, Bradbeer 1988, Bewley y Black 1994, Bradford 1995). Luego, el incremento fue gradual hasta llegar a un estado donde no se detectó un aumento neto de agua o fase II de la germinación, que Bradford (1995) describe como equilibrio dinámico de la absorción de agua. En la fase III ocurrió un aumento de la absorción de agua coincidente con la aparición de la coleorriza. Según Mayer y Poljakoff-Mayber (1989), la hidratación inicial depende de la composición química de la semilla, de la permeabilidad de la cubierta y de la disponibilidad de agua en el medio. La imbibición es particularmente rápida en las semillas con alto contenido de proteínas, pero en los cereales en cambio, es gradual porque el componente esencial es almidón que no participa mayormente en el proceso de imbibición (Koller 1972, Mayer y Poljakoff-Mayber 1989).

El frío retardó la germinación prolongando de la fase II de la absorción de agua. Este retardo se reflejó también en las curvas de cinética (Figuras 6 y 7), con un aumento

del número de días requeridos para germinar con mayor grado de frío. La elongación de la fase II de la germinación se ha descrito para semillas de una serie de especies cultivadas mono y dicotiledóneas expuestas a estrés de frío (Koller 1972, Ovcharov 1977, Roberts 1988, Bewley y Black 1994, Dell'Aquila y Spada 1994). Según Côme y Corbineau (1989), la fase II es crucial puesto que de ella depende el desarrollo de la futura planta, ya que corresponde al momento de la preparación para el crecimiento posterior del embrión. Es interesante notar también que una prolongación de la fase II ocurre frente al déficit de agua y al exceso de sales (Hampson y Simpson 1990, Bewley y Black 1994, Bradford 1995). Esto sugiere una similitud en los tipos de respuestas de las semillas frente a distintos tipos de estrés ambiental.

Aunque el proceso de germinación abarca el período desde la imbibición hasta la emergencia de la radícula (fase III), en las gramíneas el primer signo visible de la germinación es la aparición de la coleorriza. La coleorriza es una vaina embrionaria que protege al meristema radicular y que está presente en el grano deshidratado (Esau 1977). Según Mayer y Poljakoff-Mayber (1989), el crecimiento de las células de la coleorriza ocurre por elongación, mientras que la emergencia de la radícula involucra actividad mitótica y de elongación. Para que exista elongación celular debe existir un contenido de agua umbral junto con aumento de la extensibilidad de las paredes celulares (Hsaio 1973) y esto último se considera el factor limitante del crecimiento de la radícula (Cocucci y col. 1995). El patrón de absorción de agua por la semilla implica un aumento inicial rápido del Ψ_h del embrión, que luego se mantiene en equilibrio con el medio hasta después del inicio de la elongación de la radícula (Cocucci y col. 1995, Bradford 1995).

Los valores de Ψ_h de los embriones de avena al momento de la aparición de la coleorriza variaron entre -0,9 y -1,0 MPa, aproximadamente. Según Bradford (1995), en la mayor parte de las especies estudiadas la emergencia de la radícula comienza con Ψ_h entre 0 y -2 MPa, por lo que los valores de Ψ_h encontrados para la avena están dentro del rango descrito. Para cada una de las variedades de avena estudiadas los valores de Ψ_h no variaron con la temperatura. Al comparar entre variedades, se encontró que la variedad Tolerante requirió mayor contenido de agua para el inicio de la elongación de la coleorriza ($\Psi_h = -0,90$ MPa) respecto a la Susceptible ($\Psi_h = -1,0$ MPa). Son escasos los datos respecto al Ψ_h durante el inicio de la germinación en semillas sometidas a frío, pero en contraste a lo encontrado en las avenas, Dahal y col. (1996) informaron que el 50% de la emergencia de la radícula a 20°C ocurrió a -0,82 MPa en una variedad de tomate tolerante al frío durante la germinación, mientras en la susceptible ocurrió a -0,66 MPa. Es decir, la variedad tolerante germinó con menos agua. Sin embargo, a un mismo Ψ_h del medio (entre 0 y -0,5 MPa) a 20°C, la variedad tolerante germinó significativamente antes. En consecuencia, la germinación pareciera corresponder a un gatillo interno más que a las condiciones hídricas del medio. Esto se ve confirmado porque en ambas variedades de avena la temperatura no afectó el contenido de agua del embrión.

Según Dahal y col. (1990), Welbaum y Bradford (1990) y Bradford (1990), desde el punto de vista hídrico parece ser más importante el ablandamiento o aislamiento de los tejidos que rodean al embrión que el potencial hídrico embrionario en el gatillamiento de la protrusión de la radícula. Este ablandamiento podría ser retardado a temperaturas subóptimas en aquellas semillas donde la radícula permanece rodeada del endosperma. En

ambas variedades de avena, los potenciales hídricos aumentaron a valores cercanos a cero en el momento de la elongación de la radícula, pero no se detectaron diferencias entre variedades ni hubo efecto de la temperatura. Los CRA obtenidos fueron mayores en este momento, cercanos al 90%.

4.2.2 Actividad amilasa total

La activación metabólica depende del grado de hidratación, que si es máximo gatilla la mayor parte de la actividad enzimática *de novo* (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989) que permite la germinación propiamente tal (Bewley y Black 1994). La actividad amilasa del endosperma agrupa al conjunto de enzimas que degrada el almidón de las reservas y es un parámetro relacionado con la germinación, caracterizado especialmente bien para las gramíneas (Ziegler 1995). En las dos variedades de avena estudiadas, la actividad amilasa total del endosperma se redujo significativamente a las temperaturas de 10 y 3°C. En coincidencia con esta tendencia, Moraru y Atimoshoae (1985) encontraron una reducción de la actividad amilasa en variedades de invierno de trigo, cebada y centeno. Otros tipos de estrés también afectan la actividad α -amilasa y es así que 100 mM de NaCl o -0,46 MPa durante las primeras 24 de imbibición, redujeron drásticamente la actividad alterando el patrón electroforético de las isoenzimas (Marambe y Ando 1995). Gupta y col. (1993) informaron que en dos variedades de garbanzo de tolerancia contrastante al déficit hídrico durante la germinación, el tratamiento de -0,3 MPa redujo la actividad amilasa total, y la α -amilasa y β -amilasa medidas por separado, con respecto al control especialmente en los cotiledones.

La reducción de la actividad amilasa total encontrada en la avena impidió la germinación ni el logro del estado de desarrollo en cuestión. La menor actividad amilasa encontrada no retardaría la germinación, debido a que dado que la actividad α -amilasa no está presente en el grano maduro (Ziegler 1995), constituye según Bewley y Black (1994) un evento post-germinativo debido a que el mayor incremento de actividad se produce luego de la emergencia de la radícula. Según Drennan y Berrie (1962), el máximo de la actividad amilasa total en la avena incubada a 30°C se produjo 96 horas después de alcanzado el 100% de la germinación, con un 10% de la actividad máxima durante el intervalo previo al máximo de germinación. Considerando esto último, la actividad amilasa de las variedades Tolerante y Susceptible correspondería a una fase inicial de su inducción. Ovcharov (1977) señaló que la actividad amilasa de las semillas de variedades de maíz tolerante al frío es mayor que la de una variedad sensible, lo que implicaría una producción más rápida de azúcares solubles a baja temperatura. Moraru y Atimoshoae (1985) propusieron que la mantención de la actividad amilasa sería un buen indicador de tolerancia al congelamiento. La actividad amilasa total no es un buen indicador de tolerancia al frío en avena, y la leve diferencia de 5% registrada entre las variedades Tolerante y Susceptible no incidiría mayormente en el comportamiento de germinación. Coincidentemente, Gupta y col. (1993) consideraron que la evidencia que señala a la mayor actividad amilasa como indicador de tolerancia al estrés es todavía insuficiente.

Los resultados descritos permiten deducir que el carácter de mayor tolerancia al frío durante la germinación parece no depender de las relaciones hídricas durante los

distintos estados de la germinación, ni de la actividad amilasa desde el inicio de la elongación.

4.3 Respuesta al congelamiento

Otro indicador que se ha considerado en la comparación de variedades con distintos grados de tolerancia al frío durante las etapas tempranas del desarrollo, es la capacidad para tolerar temperaturas congelantes (Rizza y col. 1994, Bridger y col. 1995). Este método permite separar variedades en especies cultivadas y estudiarlos fisiológicamente (Alberdi y col. 1993, Webb y col. 1994). Las semillas deshidratadas de las dos variedades de avena mostraron tolerancia máxima al congelamiento, puesto que no hubo diferencias en la tinción de viabilidad (TTC) respecto al control después de ser sometidas a -70°C durante 48 horas. Las semillas tenían un porcentaje de humedad promedio cercano al 10%, como otras especies ortodoxas (Roberts 1973), y por lo tanto no sufrieron daño por congelamiento (Koller 1972, Cary 1975, Fuller y Eagles 1978, Alberdi y Ríos 1983, Chandel y col. 1995). El aumento del contenido de agua coincidió con un rápido aumento de la susceptibilidad a las temperaturas congelantes. La tolerancia al congelamiento de las variedades Tolerante y Susceptible se evaluó determinando los TL_{50} de la población en cuatro etapas de la germinación: desde la imbibición hasta la emergencia de 1 cm de radícula. No se encontraron diferencias intervarietales para ninguno de los estados estudiados.

En ambas variedades los TL_{50} fueron significativamente menores antes de la emergencia del embrión que después de ocurrida ésta. En los estados iniciales de la

germinación (Estados 1 y 2), los TL_{50} más bajos se deberían a la protección que ejerce el endosperma sobre el embrión, como se demuestra al calcular la relación de peso endosperma/embrión, que en ambas variedades se redujo desde 10 a 3,5 aproximadamente, desde la imbibición a la emergencia de la radícula. Klimov (1983) propuso al Índice Heterotrófico del grano seco como un buen indicador de la tolerancia intervarietal al congelamiento. Este índice fue superior en la variedad Tolerante pero no alcanzó diferencias estadísticas con la variedad Susceptible. Una vez emergido el embrión desde la protección ofrecida por el endosperma, fue altamente sensible al congelamiento como se demostró por el aumento de los TL_{50} en los Estados 3 y 4.

Son escasas las referencias bibliográficas respecto a la respuesta de las semillas al congelamiento en los estados tempranos de la germinación. Roberts y Grant (1968) sometieron 18 variedades de trigo a congelamiento entre 0 y 16 semanas de edad. Encontraron que las semillas completamente embebidas tenían un TL_{50} de -5°C , las plántulas de 12 días de edad tuvieron la mínima tolerancia al congelamiento con $TL_{50} < -5^{\circ}\text{C}$, mientras que las plántulas con más de 2 semanas alcanzaron $TL_{50} < -10^{\circ}\text{C}$. En esto último coincidieron con Andrews y col. (1960), quienes informaron que en plántulas de trigo con más de 10 semanas de edad la tolerancia al congelamiento aumenta y es la máxima dentro de esta fase del ciclo de vida. En semillas de betarraga completamente embebidas a 20°C , Cary (1975) determinó TL_{50} inferiores a -2°C , pero cuando las plántulas tenían la radícula de 1 cm de longitud el TL_{50} estuvo entre 0 y -1°C , mostrando la máxima susceptibilidad al congelamiento. Lo mismo que en las referencias anteriores, Cary (1975) encontró que desde los 15 días de edad la tolerancia aumentaba nuevamente

con TL_{50} entre -3 y $-4^{\circ}C$. Fuller y Eagles (1978) estudiaron la tolerancia al congelamiento de cinco variedades de *Lolium perenne*, encontrando que las semillas completamente embebidas presentaron un 15% de sobrevivencia a temperaturas entre 2 y $-6^{\circ}C$, mientras que plántulas de tres días no sobrevivieron a esta exposición. Alberdi y Ríos (1983) encontraron un comportamiento similar para las leñosas *Gevuina avellana* y *Embothrium coccineum*. Según estos autores, en ambas especies la tolerancia al congelamiento decreció en semillas germinadas recuperándola después del despliegue de los cotiledones.

Los antecedentes coinciden en que en aquellas semillas en germinación, la tolerancia al congelamiento declina desde la imbibición hasta la elongación de la radícula donde es mínima, coincidiendo con Sakai y Larcher (1987) que durante la elongación rápida ocurre la máxima sensibilidad, incrementando entonces en un segundo máximo que se alcanza cuando el brote tiene entre $1,5$ y 2 cm. Posteriormente, la tolerancia aumenta con la mayor edad de la plántula.

La respuesta al congelamiento en el estado de plántula es diferente a la encontrada durante el período de germinación. Las plántulas de avena tienen mayor tolerancia al congelamiento que durante el estado de coleorriza y radícula. Alberdi y col. (1993) estudiaron la tolerancia al congelamiento de la avena de las variedades OT220xOMIHI y América al estado de plántula entre los 10 y 25 días de edad. La variedad OT220xOMIHI tuvo un TL_{50} de $-2,5^{\circ}C$ a los 10 días de edad, disminuyendo a $-3,5^{\circ}C$ a los 16 días. La variedad América en cambio, tuvo TL_{50} entre -1 y $-2^{\circ}C$ en el mismo período. El tratamiento de aclimatación desde $20^{\circ}C$ a ciclos de $8/4^{\circ}C$ provocó que la variedad Tolerante redujera sus TL_{50} a $-7^{\circ}C$ al final del período mientras que América llegó sólo a -

5°C. Este comportamiento llevó a Alberdi y col. (1993) a la clasificación de Tolerante o Susceptible. Webb y col. (1994) también compararon la tolerancia al congelamiento de plántulas de avena de primavera y de invierno, encontrando que con tratamientos de ciclos de 20/15°C los TL₅₀ fueron similares entre variedades (-3°C), pero con la aclimatación de ciclos de 13/7°C y luego 2°C, los TL₅₀ de las variedades de primavera alcanzaron hasta -8 y las de invierno hasta -10°C. Cloutier y Andrews (1984) determinaron los TL₅₀ de plántulas de avena de seis variedades luego de aclimatación al frío, encontrando un rango entre -7 a -13°C, lo cual era comparable a la cebada y muy superiores a los TL₅₀ encontrados para el trigo y el centeno.

Se puede concluir que las semillas de avena en estados previos a la emergencia de la coleorriza muestran elevada tolerancia al congelamiento, pero una vez iniciada la elongación de la coleorriza y posteriormente de la radícula, la tolerancia se hace mínima. No se detectaron diferencias intervarietales en la respuesta al congelamiento.

En los Estados 3 y 4, el congelamiento actuaría sobre el tejido turgente expuesto provocando la muerte a temperaturas cercanas a 0°C. Este comportamiento coincide con lo informado para el trigo y una leguminosa en estados de desarrollo similares: mayor tolerancia en la imbibición, reducción en el estado de radícula emergente y, según lo informado para el estado posterior de plántula para estas mismas variedades de avena por Alberdi y col. (1993) y para la avena por Webb y col. (1994), un nuevo aumento de la tolerancia al congelamiento en períodos más tardíos del desarrollo.

Una mayor diferenciación intervarietal se detectó en períodos posteriores a la germinación. La diferenciación varietal se ha establecido claramente en plántulas de

alrededor de 10 días de edad en avena (Alberdi y col. 1993), *L. perenne* (Fuller y Eagles 1978) y trigo (Andews y col. 1960, Roberts y Grant 1968). Ovcharov (1977) revisó antecedentes en cereales, encontrando que la respuesta entre variedades de trigo de invierno y de primavera se expresa mejor con el coleoptilo entre 5 y 7 mm. Recientemente, se ha establecido la tolerancia al congelamiento en plántulas sin y con tratamientos de aclimatación de variedades de cebada (Bridger y col. 1995), trigo (Bridger y col. 1995) y *L. perenne* (Thomas y James 1993).

La alta susceptibilidad en la germinación durante la elongación de la radícula se debería en parte a la mayor exposición del tejido, pero también al mayor grado de succulencia en este estado de desarrollo (Bravo 1997). El daño por congelamiento se puede deber además, al efecto directo sobre las membranas. Wesley-Smith y col. (1995) embebieron embriones de arveja durante 24 horas a 25°C y luego los congelaron a -196°C, descongelando y germinando posteriormente a 25°C. Encontraron anomalías estructurales a nivel de la membrana plasmática y de la pared celular con un 90% de mortalidad de las semillas tratadas. Cuando estos autores congelaron embriones con sólo cuatro horas de imbibición y con el mismo contenido de humedad, prácticamente no hubo daño, lo que interpretaron como un nivel de crioprotección dado por los azúcares presentes en el tejido embrionario a las cuatro horas pero metabolizados a las 24 horas. Kendall y Mc Kersie (1989) demostraron que el daño provocado por la congelación/descongelación de membranas microsomales de plántulas de trigo provocó pérdida de lípidos fosfato, aumentó el nivel de ácidos grasos libres y elevó la temperatura

de la transición de fase de los lípidos, coincidentemente con un incremento de los radicales libres de oxígeno provocado por el congelamiento.

4.4 Estrés oxidativo y capacidad antioxidante

Es un hecho conocido que en muchos casos el estrés de frío conlleva un estrés oxidativo en los sistemas vegetales (Purvis y Shewfelt 1993, Olsson 1995). La capacidad para liberar especies radicales O_2 por los embriones intactos se puede medir a través de la oxidación del DCFDA, técnica que según Caro y Puntarulo (1996), se ha usado recientemente para monitorear el nivel de estrés oxidativo en células y tejidos. La liberación o difusión de sustancias capaces de oxidar el DCFDA en las dos variedades de avena estudiadas durante los Estados 3 y 4, fue inferior en los embriones sometidos a $3^{\circ}C$ respecto al control a $20^{\circ}C$. Junto con esto, la variedad Susceptible mostró mayor liberación a nivel basal.

La actividad oxidativa a $20^{\circ}C$ se puede considerar normal y según Caro y Puntarulo (1996), no debe considerarse estrés oxidativo *sensu stricto* porque no provoca alteraciones en el crecimiento. En el caso de existir un estrés oxidativo se hubiera esperado un aumento de la oxidación del DCFDA a $3^{\circ}C$ respecto al control a $20^{\circ}C$. Se tiene por un lado que aunque existen compuestos oxidantes en mayor cantidad en el control, la composición y la proporción pueden ser diferentes a $3^{\circ}C$ (E. Lissi, comunicación personal), mientras que la cantidad puede deberse a un efecto cinético. En embriones intactos de soya, Caro y Puntarulo (1996) determinaron que un 38% de la oxidación del DCFDA se debió a H_2O_2 y el resto a especies desconocidas. Según

Puntarulo (1994), además del H_2O_2 también ocurre generación de radicales en las membranas externas de los embriones intactos.

Los compuestos oxidantes pueden provenir de diferentes fuentes. En las variedades de avena estudiadas en todos los casos el aporte de estas especies oxidantes provino en gran medida de la respiración, puesto que la inhibición con KCN redujo significativamente la oxidación del DCFDA. Según Kendell y Mc Kersie (1989), los radicales libres provendrían de la oxidación del NADH por las peroxidasas de la pared celular y de las mitocondrias.

De acuerdo a estos datos el frío no habría provocado un incremento en la liberación de oxidantes respecto al control en los embriones de avena, referida al menos a la oxidación del DCFDA, durante todo el período de elongación del embrión durante la germinación. Por una parte, puede interpretarse la mayor reducción en la variedad Susceptible como una forma de reducir la exudación de oxidantes más eficiente que la Tolerante, sin embargo, si se considera que la oxidación es inferior comparada al control, puede pensarse que la variedad Tolerante mostró una menor reducción y por lo tanto mayor estabilidad (homeostasis) frente al estrés. En este caso se pueden suponer actividades oxidativas similares al control.

Existió un descenso de la capacidad oxidante del DCFDA de el Estado 4 respecto al 3 en ambas variedades. Según Puntarulo (1994), en la fase III de la germinación ocurriría un rearrreglo de las membranas embrionarias al iniciarse la elongación de la radícula, lo cual contribuiría al decrecimiento de los valores de fluorescencia con respecto a las etapas anteriores.

La mayor actividad de los radicales de O_2 afecta la capacidad antioxidante de la planta, con sus componentes enzimáticos y no enzimáticos (Caro y Puntarulo 1996), de tal manera que una planta debe defenderse aumentando la capacidad antioxidante y reduciendo los productos de la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge 1989). Se ha propuesto que frente a un estrés de frío, las especies de clima templado presentan un aumento de enzimas antioxidantes (Foyer y col. 1994, Zhang y col. 1995), mientras que en las de origen tropical ocurre una reducción del sistema antioxidante, especialmente de la actividad catalasa (Fadzillah y col. 1996). Ovcharov (1977) menciona que la actividad catalasa incrementa en semillas expuestas a bajas temperaturas. La catalasa es según Puntarulo y col. (1988), la enzima más importante en el consumo del H_2O_2 intracelular durante los primeros estados de la germinación de semillas de soya, en cambio, la glutatión peroxidasa y la ascorbato peroxidasa no parecen contribuir significativamente en esta etapa del desarrollo. La actividad catalasa de las dos variedades de avena estudiadas fue bastante reducida y no hubo efecto del frío en el estado de imbibición. Este resultado coincide con lo encontrado por Caro y Puntarulo (1995) para embriones de soya bajo estrés oxidativo, donde no hubo respuesta antioxidante en estados tan tempranos de la germinación. La respuesta de la catalasa de las variedades de avena en este trabajo se detectó más claramente durante la aparición de la coleorriza y aún con más fuerza en el estado de emergencia de la radícula, particularmente en la variedad Tolerante. La temperatura del ensayo de las enzimas antioxidantes puede tener importancia en el estrés de frío, ya que el ensayo en las condiciones *in vivo* puede reflejar

mejor la capacidad para reducir el H_2O_2 (Hakam y Simon 1996). Al respecto no se encontraron datos para la catalasa.

Las reacciones de radicales libres tienen un rol importante en los procesos de degradación de los lípidos polares de las membranas causando lipoperoxidación (Quartacci y Navari-Izzo 1992). La lipoperoxidación ha sido fundamentalmente asociada a la pérdida de la viabilidad en semillas de especies recalcitrantes (Bewley y Black 1994, Finch-Savage y col. 1996), pero los datos a nivel de germinación son escasos. En ambas variedades de avena estudiadas, la lipoperoxidación fue un evento normal de la célula al emerger la radícula, dado que ocurrió en el control. La variedad Tolerante aumentó la lipoperoxidación de sólo un 5% sobre el control y presentó un aumento significativo de la actividad catalasa con el frío en el mismo estado de desarrollo. La variedad Susceptible en cambio, incrementó la lipoperoxidación de un 24% respecto al control sin alteración del nivel de la actividad catalasa. Aparentemente, el frío provocó un estrés oxidativo y la variedad Tolerante mostró una respuesta de protección (*sensu* Halliwell y Gutteridge 1989). La variedad Susceptible en cambio no presentó esta respuesta y por lo tanto podría sufrir mayor grado de daño. Chandel y col. (1995) determinaron la lipoperoxidación inducida por la criopreservación en nitrógeno líquido de semillas maduras mantenidas en cultivo *in vitro* durante 10 días. Encontraron que todas las semillas tenían un nivel basal de lipoperoxidación, pero las especies ortodoxas no sufrieron aumento del MDA con el congelamiento, mientras que las recalcitrantes tuvieron un aumento significativo de la lipoperoxidación. Según Zhang y col. (1995), las variedades de plántulas de maíz de tolerancia media y susceptible tuvieron un incremento

del MDA del 30 y 15% del control, respectivamente, con lo que se establece un marcador de tolerancia.

En resumen, los mecanismos oxidantes y antioxidantes se expresan en los embriones de avena en las condiciones control y de estrés de frío. Se ha definido según Zhang y col. (1995), que una variedad tolerante aumenta sus niveles de catalasa a la vez que se reducen los productos de la lipoperoxidación, mientras que una susceptible mantiene o disminuye esta actividad y la producción del metabolito MDA. Pese a que los datos de oxidación del DCFDA no mostraron el incremento esperable en la génesis de especies oxidantes, la capacidad antioxidante detectada por la aparición de la catalasa sugiere lo contrario. Los resultados mostraron que la variedad Tolerante se comportó como tal respecto a los parámetros de protección contra el estrés oxidativo.

4.5 Solutos compatibles

En el estado de plántula y de planta adulta de numerosas especies, entre ellas la avena, la acumulación de solutos compatibles frente al frío tendría relación con el carácter de tolerancia al frío (ref. Hallgreen y Öquist 1990, ref. Alberdi y Corcuera 1991, Livingston 1991, Alberdi y col. 1993).

4.5.1 Prolina

El mayor aumento de prolina en la variedad Susceptible es aparentemente contradictorio. Son escasos los antecedentes respecto a la acumulación de la prolina en la respuesta al frío en tejido embrionario, pero Ovcharov (1977) menciona acumulación de aminoácidos

en semillas de trigo y centeno tratadas con temperaturas entre 0 y 3°C. Los resultados de este trabajo mostraron que el frío estimuló la acumulación de la prolina sólo durante el Estado 4 de la germinación en ambas variedades. Las proteínas de reserva de la avena (globulinas, glutelinas, albúminas y prolaminas) tienen un contenido importante de prolina (Peterson y Brinegar 1986), especialmente la prolamina (Pearson y Stewart 1990). Durante la proteólisis de las reservas, estos aminoácidos se movilizan desde el endosperma hacia el embrión a través de escutelo (Bewley y Black 1994).

Algunos antecedentes señalan que los embriones pueden acumular prolina durante la germinación frente a condiciones de estrés hídrico y salino durante la embriogénesis o la germinación. Es así que en plantas de cebada y trigo que han sufrido déficit hídrico durante la embriogénesis, se encuentra una acumulación de este aminoácido en el grano (Karamanos y col. 1983, Pearson y Stewart 1990). En semillas de *Kosteletzkya virginica*, una malvácea adaptada a la salinidad, un exceso de NaCl provocó un aumento de prolina de más del 100% del control con 200 mM de NaCl a las 96 horas de la imbibición (Poljakoff-Mayber y col. 1994). En raicillas de plántulas de 3 días de edad de *Sorghum bicolor*, Colmer y col. (1996) encontraron acumulación significativa de prolina en respuesta al estrés salino.

Es interesante que el patrón de acumulación de la prolina en los embriones de avena de las variedades Tolerante y Susceptible, coincide con el patrón de acumulación para estas variedades en el estado de plántula descrito por Alberdi y col. (1993). Estos autores encontraron que el contenido basal de prolina a 26°C de la variedad Tolerante era inferior (10 a 20 µg/gPF) al encontrado en la Susceptible (15 a 25 µg/gPF). En plántulas

de avena aclimatadas al frío con 8/4°C, hubo acumulación transiente de prolina con un máximo de 50 y 60 μ /gPF para las variedades Tolerante y Susceptible, respectivamente. Según los autores, el incremento de prolina no reflejó la tolerancia encontrada según el criterio del TL₅₀. La falta de correlación positiva entre tolerancia al frío y acumulación de prolina también ocurre en variedades de cebada (Murelli y col. 1995). Según estos autores, plántulas con la primera hoja expandida crecidas a 15°C, mostraron un aumento del 320% en el contenido de prolina después de la aclimatación a 4 y a 2°C, sin diferencias entre tolerantes y susceptibles al frío. Thomas y James (1993) determinaron la acumulación de prolina en 12 variedades de *L. perenne*, encontrando un aumento de más de un 100%, pero no hubo una relación positiva entre la acumulación de prolina y el TL₅₀.

El patrón de acumulación de la prolina en los embriones de avena se acentuó en el estado de coleorriza respecto al estado de la emergencia de la radícula. En embriones en germinación de *K. virginica*, se detectó un incremento de la prolina a las 72 horas de imbibición seguido de una reducción a las 96 horas (Poljakoff-Mayber y col. 1994). Las plántulas de avena estudiadas por Alberdi y col. (1993) también mostraron un patrón irregular de acumulación de prolina. En contraste, las plántulas de cebada descritas por Murelli y col. (1995) tuvieron un patrón de acumulación rápido y un "plateau".

Si bien es cierto se ha relacionado la acumulación de prolina con la tolerancia al estrés de frío, sales y agua (Taiz y Zeiger 1991), Larcher (1995) señala que la acumulación de prolina es más bien un indicador general de estrés que un mecanismo de tolerancia. Desde este punto de vista, la variedad Susceptible mostró mayor acumulación

y por lo tanto, mayor grado de estrés. No obstante, gran cantidad de literatura señala que la prolina es un soluto compatible que, como otros solutos de esta categoría, podría proteger a la célula contra el daño inducido por radicales libres (Smirnov y Cumbar 1989), junto con ejercer una posible acción estabilizadora sobre algunas enzimas (Pollard y Win-Jones 1979) y sobre las membranas (Jolivet y col. 1982). En este trabajo se detectó que la variedad Susceptible acumula más prolina, sin embargo, esta variedad sufre mayor daño por radicales libres (MDA). En consecuencia, la acumulación de prolina no constituiría un buen parámetro para discriminar grados de tolerancia al frío durante la germinación, como también lo han sugerido Alberdi y col. (1993) para la avena y Murelli y col. (1995) para la cebada, ambas especies en el estado de plántula.

4.5.2 Hidratos de carbono

Otro grupo de solutos compatibles que aumenta en respuesta a la disminución de la temperatura es el de los azúcares solubles (Alberdi y Corcuera 1991), una respuesta común a todos los cereales (Olien y Clarck 1993, Murelli y col. 1995).

La semilla deshidratada de la avena contiene azúcares solubles (mono y disacáridos) y una serie de oligosacáridos, fructanos, betaglucanos y arabinosilanos que en total conforman del 0,9 al 1,3% del peso seco del grano (Mac Arthur-Grant 1986). Los hidratos de carbono se encuentran por lo general en la partes vivas de la semilla: embrión, escutelo y aleurona en los cereales (Ziegler 1995).

Según Ziegler (1995), los azúcares solubles son las primeras reservas en agotarse luego de la imbibición, junto con los oligosacáridos, como sustrato de la respiración

inicial hasta la movilización de las reservas. En las gramíneas, la degradación de los azúcares se inicia por una gran batería enzimática presente en el grano que degrada las paredes celulares y el almidón de reserva. Los productos finales de la degradación del almidón, glucosa y maltosa, son absorbidos por el escutelo para la síntesis de sacarosa utilizada en el crecimiento de la plántula, llegando luego a ser el azúcar más importante detectado en este tejido.

Se ha sugerido que la sacarosa presente en el tejido embrionario podría actuar como crioprotector en las semillas durante la germinación en frío (Duffus y Binnie 1990, Chatterton y col. 1990). Los azúcares, en particular la sacarosa y algunos oligosacáridos, han demostrado tener una participación fundamental en la protección embrionaria contra la desecación durante la embriogénesis tardía, efecto que se pierde cuando estos azúcares se metabolizan durante la elongación de la radícula (Koster y Leopold 1988, Chen y Burris 1990, Kermode 1990). Las semillas maduras contienen importantes cantidades de estos azúcares (Amuti y Pollard 1977, Ganter y col. 1991) que se utilizan en la germinación. Estudios en liposomas y polen sugieren que los oligosacáridos incluyendo la sacarosa, interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos de las membranas aumentando su estabilidad frente a la desecación y al enfriamiento (Caffrey y col. 1988, Hoekstra y col. 1989). En este trabajo se propuso que los hidratos de carbono actuarían como crioprotectores durante el crecimiento inicial. Los resultados mostraron que en respuesta al frío en el estado de la coleorriza hubo aumento del contenido de azúcares solubles y de fructanos en ambas variedades, pero no se detectó cambio en la sacarosa en ninguna de las dos variedades. En el estado de emergencia de la radícula el patrón de

acumulación fue diferente. Los azúcares solubles totales se acumularon en la misma forma en ambas variedades, los fructanos se acumularon en mayor medida en la variedad Tolerante y comenzaron a acumularse en la Susceptible, mientras que la sacarosa se acumuló sólo en la variedad Tolerante. Es decir, ambas variedades registraron acumulación de hidratos de carbono, pero la variedad Tolerante mostró mayor acumulación de fructanos y de sacarosa, diferencia que se expresó mejor a los 3°C. En el Estado 4 el patrón de acumulación de azúcares fue similar entre ambas variedades.

Los datos respecto a la evolución de los hidratos de carbono en respuesta al frío durante la germinación son escasos. Ovcharov (1977) menciona un incremento en los azúcares de semillas de trigo de invierno que aumentarían su tolerancia al congelamiento. Recientemente Gupta y col. (1993) han señalado que el metabolismo de los azúcares en semillas en germinación bajo condiciones de estrés ha recibido escasa atención. Alguna información en relación a la desecación natural y al estrés hídrico y salino durante este período señala acumulación de los hidratos de carbono. Chandel y col. (1995) encontraron un aumento significativo de los azúcares solubles en embriones de dos especies recalcitrantes (cocoa y te) sometidas a un período de desecación de 4 horas en el estado de madurez completa, con un 56% de humedad. Al mismo tiempo, encontraron degradación de los gránulos de almidón por microfotografía, y por lo tanto supusieron su degradación a azúcares simples. Gupta y col. (1993) estudiaron el efecto del déficit hídrico sobre los hidratos de carbono durante la germinación de cuatro variedades de garbanzo. Encontraron que el déficit de agua incrementó significativamente el contenido de azúcares solubles totales y de fructosa ligada (sacarosa, rafinosa y estaquiosa), los

azúcares reductores aumentaron en menor proporción que los totales y la glucosa se mantuvo constante. Según Gupta y col. (1993), la sacarosa puede provenir inicialmente de los azúcares libres presentes en los cotiledones o bien de la conversión de glucosa que posteriormente sería trasladada al eje embrionario. Misra y Dwivedi (1995) estudiaron la respuesta al exceso de NaCl en embriones de una variedad tolerante y una susceptible de *Phaseolus aureus*. Encontraron que en los embriones tolerantes la acumulación de azúcares superó al control en más de un 34%, mientras que la variedad susceptible aumentó sólo un 5% sobre el control a los 5 días de la imbibición. Sin embargo, los embriones tolerantes tuvieron una producción de azúcares superior a las 24 horas de la imbibición que fue independiente del nivel de salinidad.

En las plántulas de avena de las mismas variedades usadas en esta tesis, el contenido de azúcares solubles basal fue similar (Alberdi y col. 1993). La aplicación de ciclos de frío (8/4°C) aumentó el contenido de azúcares solubles de la variedad tolerante dos veces más que el de la variedad susceptible. Este contraste es superior a las diferencias encontradas en esta tesis entre los embriones de las mismas variedades Tolerante y Susceptible durante la germinación. La acumulación de los azúcares en plántulas de ambas variedades fue transiente, lo cual los autores explicaron como variabilidad genética. En plántulas con la primera hoja completamente expandida de dos variedades de cebada con tolerancia diferente al frío, Murelli y col. (1995) encontraron que los azúcares solubles basales eran superiores en la variedad tolerante, y que con un cambio de 18 a 4°C ocurrió un incremento superior pero transiente en la variedad tolerante. En ambas variedades de cebada, más del 90% de los azúcares solubles fueron

fructosa y glucosa, ambos superiores en la variedad tolerante. Por el contrario, la rafinosa y los fructanos fueron superiores en las plantas susceptibles, mientras que la sacarosa no mostró diferencias entre variedades. De acuerdo a esto, Murelli y col. (1995) concluyeron que aunque la acumulación de hidratos de carbono es una adaptación del metabolismo de azúcares a la baja temperatura, no es un buen indicador de tolerancia.

Los fructanos son polímeros de fructosa que se han asociado a la tolerancia al frío en los cereales de clima frío. Livingston (1991) determinó la acumulación de fructanos en plántulas de seis variedades de avena. Encontró que los niveles de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) y de fructanos totales de las plantas creciendo a 15/10°C se mantuvo relativamente constante hasta una aplicación de frío de 2°C. Se detectó un incremento abrupto de azúcares solubles en un 400% aproximadamente pero fue transiente, mientras que los fructanos de GP 3-6 aumentaron rápidamente en un 150% reduciéndose posteriormente y los fructanos de GP>6 aumentaron en forma gradual pero sostenida hasta el final del experimento. Livingston (1991) encontró diferencias varietales en la cinética de los azúcares solubles y en los fructanos GP>6. Este autor concluyó que pese a que la acumulación de fructanos GP3-6 en la avena es mayor a la encontrada en centeno, cebada y trigo, la avena es el cereal más susceptible al frío. Por esto Livingston (1991) sugirió que no sólo puede ser importante la acumulación de azúcares, sino también su distribución y la presencia de otros mecanismos de protección además de éste. Pese a que se ha informado en numerosos casos de aumentos de azúcares en respuesta al frío, la relación entre hidratos de carbono y estrés de congelamiento es más complicada que una correlación entre la tolerancia y una composición específica de azúcares entre

variedades de cebada (Livingston y col. 1989) o entre variedades de avena, centeno y trigo (Livingston 1991). Olien y Clarck (1993), informaron que el estrés de frío aumenta el contenido de los azúcares solubles totales, pero provoca cambios en el patrón de aumento. Así, un estrés intenso indujo reducción del contenido de fructanos y un aumento del contenido de sacarosa. En una dicotiledónea, *L. perenne*, Thomas y James (1993) informaron un aumento significativo de azúcares solubles totales, sin embargo, la contribución de cada una de las especies (fructosa, sacarosa, glucosa y fructanos) fue leve, por lo que el total fue más importante.

De lo expuesto se puede concluir que los embriones de avena acumulan solutos compatibles durante los estados tempranos de la germinación en respuesta al frío. Ovcharov (1977) revisó literatura rusa sobre el comportamiento intervarietal del trigo frente al congelamiento durante la germinación, concluyendo que el frío aumenta el contenido de azúcares y de algunos aminoácidos, la prolina entre ellos. En las dos variedades de avena estudiadas, la composición de los metabolitos acumulados es diferente según el estado de desarrollo del embrión, pero la variedad Tolerante presentó a una mayor acumulación de azúcares respecto a la Susceptible. Un aspecto importante de considerar es que pareciera ser mas valiosa la contribución de todos los azúcares en conjunto, que la acumulación de sólo una especie de azúcar (Livingston y col. 1989, Livingston 1991, Thomas y James 1993).

Como una forma de evaluar la importancia de los solutos compatibles en la tolerancia al frío, Thomas y James (1993) correlacionaron el TL₅₀ con la acumulación de prolina y azúcares en 12 variedades de *L. perenne*. Los autores encontraron que menores

TL₅₀ correlacionaron bien con mayores concentraciones de prolina, pero la correlación entre el TL₅₀ y los azúcares solubles no fue consistente entre las diversas variedades. Los TL₅₀ descritos para los embriones de avena en esta tesis fueron similares con el frío y entre variedades, de manera que no se puede establecer una correlación clara. Si esta correlación se hace para el estado de plántula considerando los datos descritos por Alberdi y col. (1993) para estas mismas variedades de avena, se tiene que el TL₅₀ más bajo se correlaciona con menor acumulación de prolina y mayor contenido de hidratos de carbono. No obstante, debido a que el patrón de acumulación no fue estable en el tiempo, esta relación dependerá del momento en que se establezca. Coincidentemente, Murelli y col. (1995) señalaron que la acumulación de prolina y de hidratos de carbono no son buenos indicadores de tolerancia al frío en plántulas de cebada.

4.6 Membranas celulares

Otro de los mecanismos asociados a la tolerancia al frío es el cambio en las propiedades de las membranas celulares (ref. Alberdi y Corcuera 1991). Debido a que se considera que durante la germinación (Di Nola y Mayer 1981, 1985, 1986) las membranas sienten la temperatura (Hallgreen y Öquist 1990), se supone que constituyen un lugar fundamental para los cambios que permiten la sobrevivencia de un organismo expuesto al frío.

Los embriones de avena expuestos al frío no sufrieron daño por imbibición y mantuvieron la integridad de sus membranas, según los datos del eflujo de solutos y por la total germinabilidad luego de embeber a bajas temperaturas.

Uno de los cambios más conspicuos frente a las bajas temperaturas es el aumento de la fluidez de las membranas en las especies que toleran el frío (Hallgreen y Öquist 1990). La fluidez de las membranas de las dos variedades de avena se estimó mediante la depolarización (p) del DPH. Se esperaba que las membranas microsomales de aquellos embriones expuestos a 3°C presentaran un aumento de fluidez respecto a los embriones germinados a 20°C, en el mismo estado de desarrollo. Cuando se analizó el comportamiento de las membranas en una lectura (Figura 24), se determinó que las membranas crecidas a 20°C eran menos fluidas que las crecidas a 3°C para los Estados 3 y 4 de desarrollo. Yoshida (1984) estudió la fluidez de la membrana plasmática de plántulas de la gramínea *Dactylis glomerata* luego de períodos de crecimiento en terreno a temperaturas congelantes de -7,5°C y de -15°C. Las gráficas de Arrhenius de la polarización de fluorescencia con la sonda DPH, mostraron que las membranas tratadas a -7,5°C fueron menos fluidas que las tratadas a -15°C, sin embargo, las diferencias entre ambos tratamientos fueron reducidas dentro del rango de lectura entre 0 y 15°C.

La p de los embriones de avena mostró que los cambios inducidos por el frío fueron más marcados en la variedad Tolerante respecto a la Susceptible, pero la diferencia no fue significativa. Se esperaba que la p de los embriones crecidos a 3°C y medidos a 4°C fuera similar a la de aquellos crecidos a 20°C y medidos a 20°C. Esto, porque la magnitud de la fluidez del control se debiera mantener en una planta creciendo en frío. Sin embargo, consistentemente, las membranas no mostraron los mismos valores y por ende no tuvieron la misma fluidez durante la incubación de crecimiento. Leborgne y col. (1992) mostraron que la p del tonoplasto medida a 4°C de una línea celular de

Eucalyptus gunnii tolerante al frío, era similar a la p medida a 20°C de una línea susceptible. Ambas líneas de *E. gunnii* se diferenciaron por un TL₅₀ de -4°C para la susceptible al frío y un TL₅₀ de -10°C para la tolerante. En las avenas estudiadas, en los dos estados de desarrollo en que se midió la fluidez los TL₅₀ correspondientes no hubo diferencias entre variedades.

Los valores de fluidez encontrados para los embriones de avena fluctuaron entre 0,150 y 0,250 en las lecturas realizadas a 20°C. Los valores de p obtenidos en suspensiones de membrana plasmática de raíces de jojoba (0,235) y maravilla (0,261) (Burgos y Donaire 1996), en membranas microsomaes de raíces de trigo (0,300) (Rojas 1991) y de células de *Catharanthus roseus* (0,330) (Mérillon y col. 1995) y de suspensiones de membrana plasmática y de tonoplasto de células de *Eucalyptus gunnii* (0,300-0,350) (Leborne y col. 1992) a la misma temperatura, son algo más elevados.

Debido a que una fracción microsomal corresponde a una mezcla de membranas que incluye retículo endoplásmico, Golgi, tonoplasto y plasmalema (Leborgne y col. 1992), se puede suponer que una fracción purificada de membrana presente un comportamiento diferente y por lo tanto invalidar el uso de fracciones microsomaes para esta determinación. Al respecto, se ha comparado la respuesta de p en fracciones purificadas para tonoplasto y plasmalema y una fracción microsomal total en células de *Eucalyptus gunnii* tolerantes y susceptibles al frío, encontrándose un aumento de la fluidez en la línea tolerante en ambos tipos de preparación membranosa, y por ende, la mantención de la respuesta (Leborgne y col. 1992). Se deduce entonces la validez de la comparación de fracciones microsomaes totales frente a diversos tipos de tratamientos.

Para las diferentes membranas de una misma planta, la plasmalema ha mostrado ser menos fluida respecto a las endomembranas (RE, Golgi y mitocondria) (Yoshida y Uemura 1984).

La respuesta al frío se ha asociado con el cambio de la composición de los lípidos de la membrana, en particular a través de la participación de los ácidos grasos insaturados (Lyons 1973, Hallgreen y Öquist 1990, Alberdi y Corcuera 1991) para compensar el decrecimiento de la fluidez de las membranas (Nishida y Murata 1996).

Son escasos los datos respecto a la composición de los ácidos grasos durante la germinación. No obstante, la magnitud de la distribución de los ácidos grasos encontrada en las dos variedades de avena es similar a la de semillas deshidratadas de esta misma especie por (Youngs 1986). La distribución porcentual de los ácidos 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3 de la fracción polar embrionaria, según Young (1986) fosfolípidos en su mayoría, no tuvo cambios sustanciales con el frío para ninguna de las variedades en estudio. Se detectaron cambios con el estado de desarrollo independientes de la temperatura de tratamiento característicos de cada variedad.

Los datos obtenidos para semillas maduras y deshidratadas pueden tomarse como modelo de análisis. Según Youngs (1986), cuando el grano de avena se desarrolla y madura a 12°C, se produjo un aumento del grado de insaturación de los ácidos grasos en el embrión comparado con 28°C. En cebada, las semillas maduras de las variedades tolerantes al frío presentaron un aumento relativo de los ácidos linoleico y linolénico y una menor proporción de los ácidos oleico y esteárico, determinándose diferencias significativas en el grado de insaturación de los ácidos grasos con las variedades

susceptibles (De Man 1985). En las variedades de avena estudiadas, la proporción de ácidos oleico y esteárico fue superior a los datos de De Man (1985). La cebada es una especie más tolerante al frío que la avena (Livingston y col. 1989, Webb y col. 1994) y, a nivel de la semilla, ésta podría ser una razón de su tolerancia. Es necesario señalar que De Man (1985) analizó semillas completas de cebada sin considerar la distribución porcentual de los ácidos grasos en el embrión de las variedades tolerantes.

Alberdi y col. (1993) analizaron la distribución porcentual de los ácidos grasos en las hojas de plántulas de avena no aclimatadas y aclimatadas al frío de la variedad tolerante. Las proporciones descritas por estos autores fueron diferentes a las encontradas en los embriones de esta misma variedad. Es notorio que la proporción de 18:3 es muy superior en hojas que en los embriones, mientras que 18:1 y 18:2 son claramente inferiores en las hojas. También resulta interesante que las hojas aclimatadas al frío presenten una reducción importante del ácido graso 16:1, mientras que los embriones expuestos al frío no presentaron este ácido graso en ninguno de los estados de desarrollo. Se sabe que la composición de los lípidos de membrana varía con el estado de desarrollo de la planta (Liljenberg y von Arnold 1987), lo que podría explicar la detección del 16:1 en plántula.

Alberdi y col. (1993) registraron cambios en la distribución de ácidos grasos de las hojas de la variedad tolerante luego del tratamiento de frío, lo cual implicó un aumento del grado de insaturación. En contraste, en los embriones de esta misma variedad de avena hubo una tendencia al incremento del 18:3 en el estado de radícula que no fue significativa. Esto es particularmente interesante si se considera que a 3°C el

estado de radícula se alcanzó al menos 15 días desde la imbibición, es decir, el mismo tiempo de aclimatación ocupado para las plántulas con Alberdi y col. (1993). Considerando lo informado para la variedad Tolerante por Alberdi y col. (1993) en el estado de plántula, podría sugerirse que relación porcentual de los ácidos grasos no es un carácter mudable en estados tempranos del desarrollo, pudiendo cambiar luego de superado un cierto estado de desarrollo que sería posterior a la emergencia de la radícula.

El cambio en el grado de insaturación es un parámetro que no siempre tiene relación con la aclimatación al frío. Yoshida y Uemura (1984) no registraron cambios importantes en la composición de ácidos grasos ni en el grado de insaturación en respuesta al frío en membranas de plántulas de *Dactilys glomerata*. Debido a que la composición de esteroides y el grado de insaturación de los ácidos grasos fue relativamente estable durante el tratamiento de frío, Yoshida (1984) y Yoshida y Uemura (1984) atribuyeron la diferencia de fluidez al contenido de proteínas de la membrana. Norberg y Liljenberg (1991) estudiaron la composición de la membrana plasmática de raíces de plántulas de avena frente a un estrés hídrico, no encontrando cambios en el patrón de distribución de los ácidos grasos, detectando un aumento de la proporción de proteínas respecto al contenido de lípidos. En los embriones de avena estudiados en este trabajo, se detectó mayor contenido de proteínas en las membranas microsomales de la variedad Tolerante, a la vez que en ambas variedades hubo una tendencia al aumento de la concentración de proteínas a 3°C comparado con 20°C. Uemura y Steponkus (1994) no encontraron cambios importantes en la composición de lípidos de la membrana

plasmática de hojas de plántulas de avena de primavera y de invierno luego de cuatro semanas a 2°C.

Por otro lado, el aumento del grado de insaturación no siempre se correlaciona con un incremento de la fluidez de las membranas. Las preparaciones de membrana plasmática de jojoba son significativamente más fluidas que las de maravilla, no obstante, la proporción de 16:0, 18:2 y 18:3 fue significativamente superior en la maravilla, el 18:1 fue significativamente mayor en la jojoba mientras que el grado de insaturación de los ácidos grasos fue igual en ambas especies (Burgos y Donaire 1996). En consecuencia, el ácido oleico puede contribuir en mayor medida a la fluidez, o bien existen otros componentes que son capaces de alterar este carácter. Según Leborgne y col. (1992), pareciera ser más importante la relación lípido:proteína en la tolerancia al congelamiento, según el criterio de Norberg y Liljenberg (1991). La aclimatación al frío induce una serie de cambios en las membranas y se desconoce aún la contribución individual de las diferentes fracciones que las componen (Leborgne y col. 1992). Según Steponkus y Lynch (ref. Leborgne y col. 1992), los ácidos grasos insaturados contribuyen más al comportamiento de fase que a la fluidez de las membranas. En este sentido, el DPH es una sonda que se inserta entre lípidos y por lo tanto da cuenta de la interacción lípido-lípido y no proteína-lípido.

Por último, aunque el grado de insaturación es un aspecto importante en la fluidez de membranas, los esteroides pueden afectar el grado de fluidez dependiendo del dominio donde se inserten (Nilsen y Orcutt 1996). En esta tesis se determinó el contenido de esteroides de la membrana microsomal utilizando CG acoplada a un espectrómetro de

masas. Debido a la baja cantidad de membrana obtenida, los esteroides no se detectaron con esta técnica, lo que significa un contenido inferior a los 0,14 ng/mg PF de embrión.

Los resultados de esta tesis muestran que, pese a las diferencias entre las variedades en cuanto a su tolerancia al frío en la germinación, no hubo cambios en la composición porcentual de los ácidos grasos. Para Nishida y Murata (1996), la insaturación de los ácidos grasos de membrana no está claramente relacionada con la respuesta al frío durante la imbibición de las semillas.

4.7 Consumo de oxígeno

La activación metabólica luego de la imbibición de la semilla durante la germinación puede evaluarse a través de la tasa respiratoria (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). Por lo general, los patrones de imbibición y de respiración previos a la emergencia de la radícula coinciden estrechamente (Bewley y Black 1994). El consumo de O₂ aumenta rápidamente en la imbibición (fase I) por la activación de la cadena respiratoria pre-existente y la biogénesis de mitocondrias (Ehrenshaft y Brambl 1990), le sigue una tasa estable de consumo (fase II) y finalmente, ocurre un segundo aumento respiratorio asociado con la emergencia radicular y luego con la movilización de reservas y el crecimiento de la plántula (fase III) (Bewley y Black 1994). Debido a que la respiración es un proceso de extrema importancia en el crecimiento heterotrófico, el estudio de las bajas temperaturas sobre la actividad mitocondrial es fundamental. Según Raven (1985), la producción de solutos compatibles y otras respuestas de tolerancia al estrés requieren energía probablemente generada por la mitocondria. El frío induce una extensión de la fase II,

manteniendo el "plateau" y retardando la fase III del consumo de O₂ (Bewley y Black 1994, Dahal y col. 1996).

En las dos variedades de avena estudiadas se determinó la tasa de consumo de O₂ de los embriones intactos sometidos a 3°C justo antes que se pudiera detectar el primer signo visible de la germinación, esto es, previo a la elongación de la coleorriza. La tasa de consumo de O₂ por embrión y por peso fue significativamente superior en la variedad Tolerante. De esta manera, la variedad Tolerante tiene mayor actividad metabólica que la Susceptible en el momento de la pre-germinación. Esto podría explicar por una parte el menor intervalo de tiempo para el inicio de la germinación y por otra, la mayor pendiente o velocidad de germinación en la variedad Tolerante. Es importante considerar sin embargo, que si bien es cierto ambas variedades crecieron a 3°C, el consumo de oxígeno se determinó a 20°C debido a limitaciones experimentales. Por lo tanto, las tasas de consumo pudieron haber sufrido alguna modificación durante los 20 minutos que tomó la determinación.

Se ha discutido si una tasa de respiración superior se asocia con una mayor tolerancia al frío. Existen pocos antecedentes que evalúen la relación entre la tolerancia al frío y la tasa metabólica en la fase de germinación. Sin embargo, para la fase de plántula Hurry y col. (1992) encontraron aumento significativo de la tasa de respiración de variedades de trigo tolerantes al frío con respecto a las susceptibles y en plantas de centeno aclimatadas al frío respecto a las no tratadas. También se conocen respuestas negativas entre variedades de cebada tolerantes y susceptibles al frío (Svec y Hodges 1973).

La información respecto a la tasas respiratorias de variedades tolerantes y susceptibles al frío durante la germinación es escasa. Según Bewley y Black (1994), se desconoce si las tasas de respiración son una limitante para el momento de la emergencia de la radícula. Recientemente, Dahal y col. (1996) señalaron que no existe información acerca de las tasas de respiración de las semillas de variedades contrastantes en la tolerancia al frío en función de las tasas de germinación. Estos autores analizaron variedades de tomate, donde se han detectado diferencias heredables en las tasas de germinación y la tolerancia al frío (Scott y Jones 1985). Dahal y col. (1996) estudiaron las tasas de respiración de dos genotipos de tomate tolerante y susceptible al frío durante la germinación. La tasa de respiración con frío en el momento previo a la emergencia de la radícula fue similar entre las dos variedades. Cuando se aumentó artificialmente la presión de O_2 , aumentó también la tasa respiratoria en ambas variedades pero la germinación no se adelantó en el tiempo. Según estos autores, la tasa respiratoria previa a la germinación no es una limitante para el proceso y, por lo tanto, el retardo de la germinación debido al frío no sería una consecuencia directa de una menor tasa respiratoria. Dahal y col. (1996) concluyeron que las tasas de respiración se ajustan a la tasa de progreso de la emergencia de la radícula, lo cual sería un posible mecanismo de conservación de energía bajo condiciones que retarden la germinación. Los resultados de Dahal y col. (1996) contrastan con los de esta tesis para la avena. Esta diferencia podría deberse a que el tomate es una especie más sensible al frío, contrariamente a la avena que se clasifica dentro del grupo de las especies más tolerantes (Mayer y Poljakoff-Mayber 1989). Se sabe que existen diferencias en cuanto al comportamiento de generación de

energía entre especies tolerantes y sensibles al frío (Moynihan y col. 1995) y en cuanto al comportamiento de las vías respiratorias (Rychter y col. 1988). Por lo tanto, distintos grupos de especies pueden diferir en cuanto a la respuesta respiratoria al frío.

La capacidad de la vía alternativa de respiración puede aumentar con la exposición en frío (Purvis y Shewfelt 1993) como una forma de protegerse frente al daño (Rychter y col. 1988, Purvis y Shewfelt 1993, Purvis y col. 1995). Leprince y col. (1992) señalan que existe escasa información respecto a las tasas de respiración en embriones intactos en el período previo o durante la emergencia de la radícula, y sobre la dependencia de las diferentes vías. En las dos avenas estudiadas, entre el 55 y el 70% del consumo correspondió a la vía citocromo y menos del 20% a la vía oxidasa alternativa. Esto significa que el flujo de electrones en la avena ocurrió fundamentalmente por la vía citocromo. Este resultado coincide con lo descrito para otras especies por Lambers (1985) y para maíz por Leprince y col. (1992), quienes señalan que la respiración de las semillas embebidas corresponde mayoritariamente a la vía citocromo c. Aunque se ha demostrado la participación de la vía alternativa resistente al cianuro desde las primeras horas de la imbibición, no parece ser un requisito para asegurar la germinación (Lambers 1985).

Las variedades tolerantes al frío generalmente desarrollan un mayor potencial para el flujo de electrones a través de la vía alternativa que las variedades sensibles (McCaig y Hill 1977, van der Venter 1985). En las avenas estudiadas no se mostraron diferencias en el porcentaje del consumo de oxígeno de la vía alternativa entre la variedad Tolerante y la Susceptible. Coincidentemente, Stewart y col. (1990b) encontraron que en mitocondrias

aisladas de maíz, a pocas horas de imbibición y en el estado temprano de plántula, no hubo diferencias significativas en las tasas de respiración mitocondrial de las variedades tolerante y susceptible a 25°C, pero la oxidasa alternativa tuvo mayor actividad y mayor expresión con frío.

Según Lambers (1985), el papel fisiológico de la vía alternativa sería la oxidación del exceso de azúcares cuando la carga energética celular es elevada. En muchas plantas expuestas a condiciones de frío ocurre acumulación de azúcares solubles, induciendo probablemente la vía alternativa (Rychter y col. 1988). Según algunos autores, el frío aumenta la capacidad de la oxidasa alternativa y así previene la acumulación de radicales libres que de otra manera podrían acumularse a niveles tóxicos (Purvis y Shewfelt 1993, Fernandes de Melo y col. 1994, Purvis y col. 1995). Ambas variedades de avena tuvieron un nivel de liberación de compuestos oxidantes bastante similar, sin que se detectara una diferencia a favor de la variedad Tolerante.

El aumento de la respiración, en particular mediante la vía alternativa, en respuesta al frío resulta en un aumento de la evolución de calor en la planta que podría tener una función en la reducción de los efectos provocados por la temperatura baja en aquellas especies no termogénicas (Moynihan y col. 1995). Según Moynihan y col. (1995), el enfriamiento aumentó la génesis de calor entre un 7 y un 22% en las especies como la arveja, berenjena y la papa (tolerantes al frío) cuando hubo una reducción de 24 a 8°C, y la mayor parte del calor sería producida por la vía alternativa. Según Purvis y Shewfelt (1993), dado que la cadena transportadora de electrones no tiene un sitio de conservación de energía entre la ubiquinona y el oxígeno, disipa la energía como calor. La

respiración por la vía citocromo c también libera una cantidad importante de calor pero es más eficientemente acoplada a la generación de ATP (Moynihan y col. 1995). En las variedades de avena estudiadas en este trabajo, se encontró que en condiciones de frío la tasa de consumo de oxígeno fue prácticamente el doble en la variedad Tolerante. Además, aunque la distribución porcentual entre las vías citocromo y alternativa fue muy similar en las dos variedades, los valores absolutos de la respiración por ambas vías fueron muy superiores en la variedad Tolerante (Tabla 17). Este aumento de calor podría contrarrestar el efecto del frío sobre la integridad de la membrana mitocondrial, ayudando a la mantención de su fluidez y a la actividad de las enzimas respiratorias (Moynihan y col. 1995).

De esta manera, al mantener una tasa de respiración superior, la variedad Tolerante genera más calor lo cual puede influir sobre las reacciones metabólicas facilitando la germinación acelerada respecto a la variedad Susceptible.

4.8 Discusión general

El objetivo general de esta tesis fue determinar si existían diferencias fisiológicas en la respuesta de tolerancia al frío entre dos variedades de una misma especie, que presentan una respuesta diferencial y contrastante al frío durante la germinación, y comparar sus comportamientos fisiológicos con el descrito para otras etapas del ciclo de vida de la planta. Se trabajó con dos variedades de una misma especie, esto es genotipos estrechamente relacionados, con el objeto de disminuir las fuentes potenciales de variación genética (Bazzaz y Wayne 1994) respecto a la comparación entre dos especies.

Se ha demostrado que existen variedades con diversos grados de resistencia al frío en avena (Alberdi y col. 1993), cebada (Rizza y col. 1994, Bridger y col. 1995) y trigo (Bridger y col. 1995), aunque pocos datos bioquímicos y moleculares permiten explicar esta variabilidad (Murelli y col. 1995). Se estudió la germinación debido a que existe un gran interés respecto a la capacidad de tolerancia al frío en especies cultivadas en esta etapa del ciclo de vida, pero a la vez hay carencia de conocimiento fisiológico sobre los mecanismos de tolerancia del embrión (Sakai y Larcher 1987, Hallgreen y Öquist 1990, Dell'Aquila y Spada 1994). Se estudiaron dos variedades de avena porque los mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío son relativamente conocidos para otras etapas del ciclo de vida de esta especie (Alberdi y col. 1993, Livingston 1991, Webb y col. 1994, Uemura y Steponkus 1994).

La comparación de los mecanismos fisiológicos descritos para las fases de plántula y planta adulta permitían una primera aproximación experimental al problema. Si algunos mecanismos inducidos por el frío corresponden a una respuesta general a estrés (Taiz y Zeiger 1991), se podría esperar que los mismos mecanismos de tolerancia se expresen en distintas fases del desarrollo de una planta. Recientemente sin embargo, Nilsen y Ocurtt (1996) concluyeron que, pese a que numerosos cambios metabólicos son similares, un cambio en la misma dirección no significa necesariamente protección cruzada al estrés. Esto permite suponer ámbitos de modificaciones particulares frente a un estrés dado.

En concordancia con los mecanismos de tolerancia descritos para el estado de plántula por Alberdi y col. (1993), se esperaba que en condiciones de estrés de frío los

embriones de la variedad Tolerante acumularían mayor cantidad de solutos compatibles y presentarían mayor GI de los ácidos grasos. Estas respuestas se midieron en la etapa de aparición de la coleorriza, porque los cambios que permitirán en última instancia la emergencia y elongación de la coleorriza ocurrirían en la fase II (Côme y Corbineau 1989, Bradford 1990, Bewley y Black 1994).

Los resultados mostraron que:

- a) Entre las siete variedades evaluadas se determinaron la más Tolerante (OT220xOMIHI) y la más Susceptible (América) al frío durante la germinación. Estas variedades fueron las mismas clasificadas como tolerante y susceptible por Alberdi y col. (1993) para el estado de plántula.
- b) No hubo correlación entre la tolerancia al frío y la tolerancia al congelamiento medida por el TL_{50} en las etapas de coleorriza y de radícula. En la etapa de imbibición la tolerancia al congelamiento fue alta en ambas variedades. Como ya se discutió, la fase de la elongación del embrión es la más sensible al congelamiento y no se ha descrito diferenciación entre genotipos de la misma especie (Fuller y Eagles 1978).
- c) Ambas variedades tuvieron el mismo patrón de acumulación de solutos crioprotectores: en la etapa de coleorriza se acumularon azúcares solubles y en la etapa de radícula se acumularon prolina y fructanos en respuesta a los tratamientos de 10 y 3°C. La variedad Tolerante se diferenció al acumular más fructanos en la etapa de coleorriza y más sacarosa en la fase de radícula frente al frío. Esto no representa una diferencia clara en la acumulación a favor de la variedad Tolerante. Además, no hubo correlación entre la acumulación de solutos compatibles y el TL_{50} .

d) La tasa de consumo de oxígeno a 3°C de los embriones intactos la variedad Tolerante superó casi en un 100% la tasa medida para la variedad Susceptible desde el período previo a la aparición de la coleorriza. No hubo diferencias entre los aportes relativos de las vías respiratorias.

e) No se detectó aumento de la fluidez de las membranas microsomales embrionarias en ninguna de las dos variedades cuando se expusieron a las temperaturas bajas. No se detectó alteración de la distribución de los ácidos grasos ni del GI.

f) Se constató menor lipoperoxidación y mayor protección antioxidante en la variedad Tolerante en respuesta al estrés de frío.

Además, en un ensayo preliminar no se detectó un cambio en el patrón electroforético asociado a la presencia de proteínas en respuesta al frío en ninguna de las dos variedades en los Estados 3 y 4. Dell'Aquila y Spada (1994) analizaron la síntesis *de novo* en embriones de trigo 5 días luego de la imbibición a 5°C, utilizando electroforesis 2-D con metionina S³⁵. Estos autores no detectaron péptidos específicos sintetizados en respuesta al frío y concluyeron que la imbibición a 5°C puede ser tolerada por las semillas sin la expresión de nuevas proteínas específicas, sugiriendo por último, que un mecanismo regulador efectivo sobre un amplio rango de proteínas normales sería responsable de la tolerancia al frío durante la germinación.

Estos resultados sugieren por una parte, que más que un sólo mecanismo, la respuesta de tolerancia al frío durante la germinación dependería de las contribuciones parciales de un conjunto de mecanismos. Thomas y James (1993), Livingston y col. (1989) y Livingston (1991) sugieren lo mismo, en particular para la avena (Livingston

1991, Uemura y Steponkus 1994), especie en la cual no está claramente definido el mecanismo fisiológico de respuesta de tolerancia entre variedades con distinta susceptibilidad al frío. Por otra parte, la tolerancia al frío durante la germinación podría depender del metabolismo basal de cada variedad en el período pre-germinativo y se puede sugerir que una variedad metabólicamente más activa genera más energía y por ende un mejor estado fisiológico que podría acelerar su germinación, independientemente de otras respuestas fisiológicas. La tasa metabólica es uno de los aspectos que mayor atención ha recibido en la literatura reciente de tolerancia al frío en la germinación y se ha propuesto como limitante de la germinación (Dahal y col. 1996), entre otros, porque se supone que la respuesta de acumulación de solutos compatibles requiere energía (Raven 1985). También se ha sugerido la participación de aspectos anatómicos en la tolerancia al frío como la dureza del tejido que rodea al embrión (Dahal y col. 1990, Bradford 1990, Welbaum y Bradford 1990).

Cuando se comparan estas respuestas embrionarias de la avena con las obtenidas para plántulas de esta misma especie, se tiene que:

- a) No hay concordancia entre la respuesta de TL_{50} durante la germinación y otras etapas del ciclo de vida de la avena. El TL_{50} se considera un indicador eficiente de tolerancia al congelamiento y es efectivo en la fase de plántula y planta adulta y en cultivos celulares en gramíneas y otras especies cultivadas (ver sección 4.3).
- b) el patrón de acumulación de solutos compatibles es similar entre embriones y plántulas de avena. En ambas variedades ocurrió acumulación de prolina en el embrión, pero ésta fue superior en la Susceptible, lo mismo que en la plántula (Alberdi y col. 1993). Los

azúcares solubles se acumularon en respuesta al frío en los embriones de las dos variedades sólo en el estado de coleorriza y con mayor intensidad en la Tolerante, coincidiendo con lo descrito en el estado de plántula (Livingston 1991, Alberdi y col. 1993). En el estado de radícula, en cambio, no se constató acumulación en el tratamiento de baja temperatura, contraponiéndose a lo encontrado en la fase de plántula.

c) El comportamiento de la proporción de ácidos grasos insaturados es diferente entre embriones y plántulas. En los embriones esta proporción se mantuvo frente al tratamiento de frío en ambas variedades. En contraste, para las plántulas de la variedad Tolerante se ha descrito un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados, que determina un incremento del grado de insaturación en las hojas (Alberdi y col. 1993). Es importante considerar que en plantas de avena, Uemura y Steponkus (1994) no detectaron diferencias importantes de la distribución porcentual de ácidos grasos entre una variedad de invierno y una de primavera luego de cuatro semanas a 2°C. Esto puede indicar que este rasgo en la avena no es tan sensible al frío como el descrito para el centeno, trigo o cebada.

d) Respecto a la fluidez de las membranas no se encontraron diferencias entre los embriones de las variedades Tolerante y Susceptible. Aunque no hay información sobre la fluidez de membrana en plántulas de avena, en otra gramínea, *D. glomerata*, las diferencias en fluidez de la membrana en respuesta al tratamiento fueron escasas pero detectables (Yoshida 1984).

e) En relación a la tasa respiratoria, en embriones Tolerantes de avena sometidos a baja temperatura el consumo de oxígeno fue el doble del consumo de la variedad Susceptible.

No existen datos sobre la tasa respiratoria en plántulas de avena sometidas a frío, pero en plántulas de trigo y centeno, también se ha descrito una mayor tasa de respiración en las variedades tolerantes en respuesta al frío (Hurry y col. 1992, 1996).

g) No se encontró información respecto al estrés oxidativo en plántulas de avena. En otra gramínea, *Zea mays*, las plántulas tolerantes al frío tuvieron menor lipoperoxidación y mayor actividad catalasa (Zhang y col. 1995). La respuesta de los embriones de avena de la variedad Tolerante coincide con lo detectado en plántulas de maíz.

En consecuencia, los resultados de esta tesis documentan que la tolerancia al frío durante la germinación determinada a través del uso de indicadores de tiempo (T_i , T_{50} , CV, IG) se asocia con algunos parámetros fisiológicos, tales como la tasa respiratoria y la respuesta al estrés oxidativo, de la misma forma que en el estado de plántula. Los parámetros TL_{50} , grado de insaturación de los ácidos grasos y fluidez de las membranas en cambio, no tuvieron correlación con la tolerancia al frío durante la germinación y por lo tanto difieren respecto al estado de plántula. Aunque se detectó acumulación de solutos compatibles, no existió una relación evidente entre este parámetro y la tolerancia al frío.

Es importante considerar que no siempre se ha descrito una relación entre TL_{50} y acumulación de solutos crioprotectores, haciéndose énfasis en la distribución de los solutos más que en el contenido absoluto. El embrión de las gramíneas es morfológicamente complejo y tiene un alto grado de diferenciación (Esau 1977), y es probable que algunos tejidos requieran de mayor crioprotección durante la emergencia en frío. Se puede sugerir entonces la existencia de compartimentación tisular de los solutos

compatibles durante la germinación a bajas temperaturas. En cuanto a la carencia de respuesta de la fluidez de membrana en la variedad Tolerante frente al frío, es necesario considerar que aún cuando la fluidez de la fracción microsomal es sensible a los tratamientos de bajas temperaturas, las diferencias de composición de los distintos tipos de membrana pueden reflejar reacciones diferenciales en cada tipo, es más, dentro de un mismo tipo de membrana diferentes dominios pueden presentar cambios heterogéneos de la fluidez (Nilsen y Orcutt 1996).

Se puede concluir que los indicadores de tolerancia al estrés de frío durante la germinación no coinciden con los parámetros fisiológicos de tolerancia. El concepto de tolerancia al frío durante la germinación de especies cultivadas involucra la variable temporal. En agronomía se considera que una planta que germina más rápido puede acceder antes a la fase de plántula que se sabe es más tolerante al frío y al congelamiento. Desde el punto de vista de las poblaciones naturales, una planta que germina antes puede tener mayor probabilidad de acceso a nutrientes, agua o luz en su microambiente. Por otro lado, una especie que germina más tarde como aquellas que presentan latencia, puede considerarse más tolerante debido a que pospone su germinación para una condición ambiental más favorable. En las gramíneas cultivadas la latencia es secundaria, se gatilla por temperaturas superiores a los 20°C y se supera con temperaturas bajas (Bewley y Black 1994). Esto significa que la condición de germinación tardía podría corresponder más bien a una menor tasa metabólica.

Los embriones de ambas variedades de avena tienen la capacidad de desarrollar una respuesta de tolerancia al frío durante la germinación. Esta capacidad se debería a un

conjunto de mecanismos que se podría expresar en forma diferencial explicando las diferencias en la cinética de germinación. Al mismo tiempo, otros mecanismos como la tasa de respiración y la capacidad de reducir el estrés oxidativo parecen conferir mayor tolerancia a la variedad OT220xOMIHL, más que los mecanismos propuestos inicialmente. De este trabajo queda claro que algunas respuestas de tolerancia al frío son comunes para diferentes etapas del ciclo de vida de la planta, mientras que otras respuestas no lo son. Si la ausencia de algunas de las respuestas de tolerancia al frío durante la germinación corresponde a la incapacidad de la planta para su expresión, a la presencia de respuestas diferentes o bien no se lograron los niveles de estrés necesarios para su manifestación, es un tema que debe resolverse *a posteriori*. Además, es dificultoso extrapolar una respuesta general a partir de un sólo caso. Por último, debe enfatizarse que las siete variedades de avena investigadas tuvieron la capacidad de germinar a bajas temperaturas difiriendo en la velocidad del proceso. Recientemente se ha señalado que la respuesta al estrés de frío es compleja y multifactorial (Nishida y Murata 1996). No existe sólo un mecanismo fisiológico involucrado en la respuesta y el grado de expresión de cada mecanismo puede variar con el estado de desarrollo. Nishida y Murata (1996) enfatizan que el grado de susceptibilidad al estrés de frío depende de la etapa del ciclo de vida, destacando que la germinación temprana es una de las etapas más sensibles y los mecanismos de tolerancia son los menos conocidos.

CONCLUSIONES

- Las variedades de *Avena sativa* difieren en su capacidad de tolerar las temperaturas bajas durante la germinación. Las dos variedades más contrastantes se definieron como Tolerante (OT220xOMIHI) y Susceptible (América) al frío durante la germinación, de acuerdo a indicadores que consideran la velocidad de emergencia del embrión. Las mismas variedades habían sido descritas como tales en el estado de plántula.
- No existió correlación entre la tolerancia al frío durante la germinación medida por estos indicadores y la tolerancia al congelamiento medida como la temperatura letal para la mitad de la población de semillas.
- La acumulación de solutos compatibles tuvo una tendencia similar en ambas variedades expuestas a tratamientos de baja temperatura, por lo tanto, no se detectó una asociación evidente entre la tolerancia al frío y la crioprotección por solutos.
- No se detectaron diferencias en la fluidez y composición porcentual de ácidos grasos de las membranas celulares entre las variedades expuestas a tratamientos de baja temperatura. Esto es, que ambos rasgos no se correlacionaron con la tolerancia al frío durante la emergencia embrionaria.
- La tolerancia al frío durante la germinación se correlacionó con menor daño por lipoperoxidación y con mayor actividad catalasa.
- Se detectó correlación positiva entre la tolerancia al frío durante la germinación y la tasa de consumo de oxígeno de embriones intactos a 3°C. El consumo de la variedad

Tolerante fue el doble del consumo de la Susceptible desde la pre-germinación. La contribución de la oxidasa alternativa fue entre un 10 y un 20% en ambas variedades.

Conclusión general :

La mayor tolerancia al frío durante la germinación de *A. sativa* medida a través de indicadores de la velocidad de germinación, estaría asociada a la mayor tasa respiratoria y a menor daño por estrés oxidativo, más que a la acumulación de solutos crioprotectores o a un cambio en las propiedades y composición de las membranas. Los embriones de *A. sativa* pueden desarrollar respuesta de tolerancia al frío, no obstante, sólo algunos de los parámetros fisiológicos que caracterizan de tolerancia al frío en etapas posteriores del ciclo de vida de la planta son comunes a los estados tempranos de la ontogenia.

Abernethy R.H., D.S. Thieel, N.S. Petersen y K. Helm. 1989. Thermotolerance is developmentally dependent in germinating wheat seed. *Plant Physiology* 89:569-576.

Acevedo E. 1991. Caracterización y regulación hormonal de las alfa-amilasas de *Araucaria araucana* Mol. Koch. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Alberdi M. 1996. Ecofisiología de especies leñosas de los bosques higrófilos templados de Chile: resistencia a la sequía y bajas temperaturas. *En* Ecología de los Bosques Nativos de Chile. Ed. J.J. Armesto, C. Villagrán y M. Kalin Arroyo. Editorial Universitaria, p. 279-300.

Alberdi M. y D. Ríos. 1983. Frost resistance of *Embothrium coccineum* Forst. and *Gevuina avellana* Mol. during development and aging. *Acta Oecologica/Oecologia Plantarum* 4:3-9.

Alberdi M., L.J. Corcuera, C. Maldonado, M. Barrientos, J. Fernández y O. Henríquez. 1993. Cold acclimation in cultivars of *Avena sativa*. *Phytochemistry* 33:57-60.

Alberdi M. y L.J. Corcuera. 1991. Cold acclimation in plants. *Phytochemistry* 30:3177-3184.

Amuti K.S. y C.J. Pollard. 1977. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. *Phytochemistry* 16:529-532.

Andrews J.E., J.S. Horricks y D.W.A. Roberts. 1960. Interrelationships between plant age, root-rot infection, and cold hardiness in winter wheat. *Canadian Journal of Botany* 38:601-611.

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Ed. Association of Official Analytical Chemist. 14 ed. Whorwitz. Whashington DC.

Bacon R.K., R.P. Cantrell y J.D. Axtelli. 1983. Selection for seedling cold tolerance in grain sorghum. *Crop Science* 26:900-903.

Barrientos M., E. Mol., G. Peruzzo, A. Contreras y M. Alberdi. 1993. Responses to cold of Chilean wild *Solanum* species. *Environmental and Experimental Botany* 34:47-54.

Basra A.S., S. Bedi y C.P. Malik. 1988. Accelerated germination of maize seeds under chilling stress by osmotic priming and associated changes in embryo phospholipids. *Annals of Botany* 61:635-639.

Bazzaz F.A. y P.M. Wayne. 1994. Coping with environmental heterogeneity: the physiological ecology of tree seedling regeneration across the gap-understory continuum. *En Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants*. Academic Press. 349-389.

Bates L., R. Waldren y Y. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.

Berrie A.M.M. y G.C.D. Taylor. 1981. The use of population parameters in the analysis of germination of lettuce seed. *Physiologia Plantarum* 51:229-233.

Bewley J.D. y M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. 2nd ed.

Bonicel A. y N. Vercosa de Médeiros Raposo. 1990. Variation of starch and soluble sugars in selected sections of poplar buds during dormancy and post-dormancy. *Plant Physiology and Biochemistry* 28:577-586.

Boveris A., R.A. Sánchez y M.T. Beconi. 1978. *FEBS Letters* 92:333-338.

Boyer J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.

Bradbeer J.W. 1988. *Seed Dormancy and Germination*. Blackie and Son Ltd. Chapman and Hall, NY.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72:248-254.

Bradford K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *HortScience* 21:1105-1112.

Bradford K.J. 1990. A water relation analysis of seed germination rates. *Plant Physiology* 94:840-849.

Bradford 1995. Water relations in seed germination. *En Seed Development and Germination*. Ed. J. Kigel y G. Galili. Marcel Dekker Inc. NY.

Bravo L. 1996. Tolerancia al frío en cebada. Tesis Doctorado Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Bray C.M. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. *En Seed Development and Germination*. Ed. J. Kigel y G. Galili. Marcel Dekker Inc. NY. 767-789.
- Bridger G.M., D.E. Falk, B.D. McKersie y D.L. Smith. 1995. Crown freezing tolerance and field winter survival of winter cereals in Estern Canada. *Crop Science* 35:150-157.
- Burgos P.A., y J.P. Donaire. 1996. Phospholipids, free sterols, fluidity, and ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles from sunflower and jojoba roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:315-324.
- Caffrey M., V. Fonseca y A.C. Leopold. 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiology* 86:754-758.
- Cannon O.S., D.M. Gatherum y W.G. Miles. 1973. Heritability of low temperature seed germination in tomato. *HortScience* 7:404-405.
- Caro A. y S. Puntarulo 1995. Effect of iron-stress on antioxidant content of soybean embryonic axes. *Plant Physiology (Life Sci. Adv.)* 14:131-136.
- Caro A. y S. Puntarulo. 1996. Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochimica et Biophysica Acta* :1-9.
- Cary J.W. 1975. Factors affecting cold injury of sugarbeet seedlings. *Agronomy Journal* 67:258-262.
- Chandel K.P.S., R. Chaudhury, J. Radhamani y S.K. Malik. 1995. Dessication and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. *Annals of Botany* 76:443-450.
- Chatterton N.J., P.A. Harrison, W.R. Thornley y J.H. Bennett. 1990. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. *Plant Physiology and Biochemistry* 28:167-172.
- Chen Y. y J.S. Burris. 1990. Role of carbohydrates in dessication tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. *Crop Science* 30:971-975.
- Cloutier Y. y C.J. Andrews. 1984. Efficiency of cold hardiness induccion by dessication stress in four winter cereals. *Plant Physiology* 76:595-598.

- Cocucci S.M., S. Morguti, A. Abruzzese, C. Alisi y L. Espen. 1995. Water permeability during the early phase of incubation of *Raphanus sativus* seeds: effects of a medium with low water potential and fucicoccin. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:61-69.
- Colmer T.D., T. Fan, R. Higachi y A. Lauchli. 1996. Interactive effects of Ca^{2+} and NaCl salinity on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum* 97:421-424.
- Côme D. y F. Corbineau. 1989. Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy. *En Recent Advances in the Development and Germination of Seeds*. Ed. R.B. Taylorson. Plenum Press, New York. 165-179.
- Corbineau F., A. Poljakoff-Mayber y D. Côme. 1991. Responsiveness to abscisic acid of embryos of dormant oat (*Avena sativa*) seeds. Involvement of ABA-inducible proteins. *Physiologia Plantarum* 83:1-6.
- Crespi M.D., E.J. Zabaleta, H.G. Pontis y G.L. Salerno. 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Plant Physiology* 96:887-891.
- Dahal P., K.J. Bradford y A.R.A. Jones . 1990. Effects of priming and endosperm integrity on seed germination rates of tomato genotypes. *Journal of Experimental Botany* 41:1431-1439.
- Dahal P., N-S. Kim y K.J. Bradford. 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Journal of Experimental Botany* 47:941-947.
- Dell'Aquila A. y J.D. Bewley. 1989. Protein synthesis in the axes of polyethylene glycol-treated pea seed and during subsequent germination. *Journal of Experimental Botany* 40:1001-1007.
- Dell'Aquila A. y P. Spada. 1993. The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos. *Annals of Botany* 72:97-101.
- Dell'Aquila A. y P. Spada. 1994. Effect of low and high temperature on protein synthesis patterns of germinating wheat embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:65-73.
- De Man W. 1985. The effect of genotype and environment of the fatty acid content of barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Plant, Cell and Environment* 8:571-577.
- Di Nola L. y A.M. Mayer. 1985. Effect of temperature of imbibition on phospholipid metabolism in pea embryonic axes. *Phytochemistry* 24:2549-2554.

Di Nola L. y A.M. Mayer. 1986a. Effect of temperature on glycerol metabolism in membranes and on phospholipases C and D of germinating pea embryos. *Phytochemistry* 25:2255-2259.

Di Nola L. y A.M. Mayer. 1986b. The effect of temperature of imbibition and germination on the lipid and fatty acid content and composition in phospholipids of embryonic axes from pea seeds. *Phytochemistry* 25:2725-2731.

Drennan D.S.H. y A.M.M. Berrie. 1962. Physiological studies of germination in the genus *Avena*. 1. The development of amylase activity. *New Phytologist* 61:1-9.

Ellis R.H., S. Covell, E.H. Roberts y R.J. Summerfield. 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. *Journal of Experimental Botany* 37:1503-1515.

Ehrenshaft M. y R. Brambl. 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology* 93:295-304.

Esau K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. John Wiley & Sons. New York. 2^a ed.

Duffus C.M. y J. Binnie. 1990. Sucrose relationship during endosperm and embryo development in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 28:161-165.

Fernandes De Melo, Y. Jolivet, A. Rocha Facanha, E. Gomes Filho, M. Silva Lima y P. Dizengremel. 1994. Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:405-412.

Fadzillah N.M., V. Gill, R.P. Finch y R.H. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses of rice. *Planta* 199:552-556.

Finch-Savage W.E., P.S. Blake y H.A. Clay. 1996. Dessication stress in recalcitrant *Quercus robur* L. Seed results in lipid peroxidation and increases synthesis of jasmonates and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 47:661-667.

Foyer C.H., P. Descourvieres y K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant and Cell Environment* 17:507-523.

Fuller M.P. y Eagles C.F. 1978. A seedling test for cold hardiness in *Lolium perenne* L. *Journal of Agricultural Science* 91:217-222.

Ganter J., J. Correa, F. Reicher, A. Heyraud y M. Rinaudo. 1991. Low molecular

carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 29:139-146.

García-Maya M., J.M. Chapman y M. Black. 1990. Regulation of alpha-amylase formation and gene expression in the developing wheat embryo. *Planta* 181:296-303.

Graham D. 1983. Chilling stress in plants and their products: causes, responses and amelioration. *En The New Frontiers in Plant Biochemistry*. Ed. T. Akazawa, T. Asahi y H. Imaseki. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 175-192.

Gupta A.K., J. Singh, N. Kaur y R. Singh. 1993. Effect of polyethylene glycol-induced water stress on germination and reserve carbohydrate metabolism in chickpea cultivars differing in tolerance to water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry* 31:369-378.

Guy Ch. L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: rol of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:187-223.

Guy Ch., J.L.A. Huber y S. Huber. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100:502-508.

Halliwell B. y J.M.C. Gutteridge. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. 2nd ed.

Hallgreen J.E. y G. Öquist. 1990. Adaptations to low temperature. *En Stress Responses in Plants: Adaptations and Acclimation Mechanisms*. Wiley-Liss Inc. 265-293.

Hampson C.R. y G.M. Simpson. 1990. Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*). I. Germination. *Canadian Journal of Botany* 68:524-528.

Hakam N. y J.P. Simon. 1996. Effect of low temperatures on the activity of oxygen-scavenging enzymes in two populations of the C4 grass *Echinochloa crus-galli*. *Physiologia Plantarum* 97:209-216.

Hoard K.G. y T.M. Crosbie. 1985. S1-line recurrent selection for cold tolerance in two maize populations. *Crop Science* 25:1041-1045.

Hoekstra F.A., L.M. Crowe y J.H. Crowe. 1989. Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* polen linked to their sucrose contents. *Plant, Cell and Environment* 12:83-91.

Hsiao T. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*. 24 :519-570.

Hurry V.M., M. Krol, G. Oquist y N.P.A. Hunner. 1992. Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold hardened spring and winter wheat. *Planta* 188:369-375.

Hurry V., O. Keerberg, T. Parnik, G. Oquist y P. Gardestrom. 1996. Effect of cold hardening on the components of respiratory decarboxilation in the light and in the dark in leaves of winter rye. *Plant Physiology* 111:713-719.

IREN. 1982. Manual de cereales y chacras. Publicación IREN-CORFO N°30. 14-18.

ISTA 1987. Handbook of vigour test methods. ISTA, Zurich. 2nd ed.

Jolivet Y., F. Larher y J. Hamelin. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants. *Plant Science Letter* 25 :193-205.

Kalyanasundaram K. 1991. Photophysical probes for microenvironments. *En Photochemistry in Organized and Constrained Media*. Ed. V. Ramaturthy. VCH Publishers Inc. 39-77.

Kader J-C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:627-654.

Karamanos A.J., J.B. Drossopoulos y C.A. Niavis. 1983. Free proline accumulation during development of two wheat cultivars with water stress. *Journal of Agricultural Science* 100:429-439.

Kendall E.J. y B.D. McKersie. 1989. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiologia Plantarum* 76:86-94.

Kermode A.R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Review in Plant Science* vol 9:155-195.

Kigel J. Y G. Galili. 1995. *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker Inc. NY.

Klimov S.V. 1983. The causes for genotypical differences in frost resistance of winter cereals. *Sel'skokhoziaistvennaya-biologiya* 12:47-53.

Koller D. 1972. Environmental control of seed germination. *En Seed Biology*. Ed. T.T. Kozlowski. v II. Academic Press. 2-101.

Koster K.L. y A.C. Leopold. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 88:829-832.

Kramer P.J. 1974. *Relaciones Hídricas de Suelos y Plantas*. Edutex S.A. México.

Labouriau L.G. 1983. *A Germinação das Sementes*. Monografia N° 24. Serie de Biología. OEA.

Lambers H. 1985. Regulation and dependence of environmental factors, metabolism and invaded organism. *En Higher Plant Cell Respiration*. Ed. R. Douce y D.A. Day. Springer Verlag. 428-473.

Larcher W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 3°ed.

Leborgne N., L. Dupou-Cézanne, Ch. Teulières, H. Canut, J.F. Tocanne y A.M. Boudet. 1992. Lateral and rotational mobilities of lipids in specific cellular membranes of *Eucalyptus gunnii* cultivars exhibiting different freezing tolerance. *Plant Physiology* 100:246:254.

Leprince O., A. van der Werf, R. Deltour y H. Lambers. 1992. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum* 85:581-588.

Leprince O., N.M. Atherton, R. Deltour y G.A. Hendry. 1994. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. *Plant Physiology* 104:1333-1339.

Liljenberg C. y S. von Arnold. 1987. Effects of the physiological and ontogenical ageing on membrane lipid level in pea leaves (*Pisum sativum*). *Journal of Plant Physiology* 130 :255-265.

Livingston D.P. 1991. Nonstructural carbohydrate accumulation in winter oat crowns before and during cold hardening. *Crop Science* 31:751-755.

Livingston D.P. 1990. Fructan precipitation from a water/ethanol extract of oats and barley. *Plant Physiology* 92 :767-769.

Livingston D.P., C.R. Olien y R.D. Freed. 1989. Sugar composition and freezing tolerance in barley crowns at varying carbohydrate levels. *Crop Science* 29:1266-1270.

Lyons J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24:445-466.

- Mac-Arthur-Grant L. 1986. Sugars and nonstarchy polysaccharides in oats. *En Oats Chemistry and Technology*. De. F. Webster. American Association of Cereal Chemist Inc. Minnesota, USA
- McKenzie J., R.L. Schaefer y E. Farber. 1995. The student edition of MINITAB for Windows. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- Maluf W.R. y E.C. Tigchelaar. 1980. Responses associated with low temperature seed germinating ability in tomato. *Journal of Amererican Society of Horticultural Science* 105:280-283.
- Majumder M.K., D.V. Seshu y V.V. Shenoy. 1989. Implication of fatty acids and seed dormancy in a new screening procedure for cold tolerance in rice. *Crop Science* 29:1298-1304.
- Marambe B. y Ando T. 1995. Physiological basis of salinity tolerance of Sorghum seeds during germination. *Journal of Agronomy and Crop Science* 174:291-296.
- Martin B.A., O.S. Smith y M. O'Neill. 1988. Relationships between laboratory germination tests and field emergence of maize inbreds. *Crop Science* 28:801-805.
- Mayer A.M. y A. Poljakoff-Mayber. 1989. *The Germination of Seeds*. Pergamon Press. 4th ed.
- McCaig T.N. y R.D. Hill. 1977. Cyanide-insensitive respiration in wheat: cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide, and oxygen. *Canadian Journal of Botany* 55:549-555.
- McConnell R.L. y C.O. Gardner. 1979. Selection for cold germination in two corn populations. *Crop Science* 19:765-768.
- Mèrillon J.M., M. Filali, P. Dupéron, M. Montagu, J.C. Chenieux y M. Rideau. 1995. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and habituation on lipid and protein composition of microsoma membranes from periwinkle cell suspension. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 443-451.
- Michel B.E. y M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- Misra N. y U.P. Dwivedi. 1995. Carbohydrate metabolism during seed germination and seedling growth in green gram under saline stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:33-38.

- Moraru K.V. y M.V. Atimoshoae. 1985. Alpha amylase activity in germinating seeds of cereals differing in frost tolerance. CAB Abstracts.
- Moynihan M.R., A. Ordentlich y I. Raskin. 1995. Chilling-induced heat evolution in plants. *Plant Physiology* 108:995-999.
- Murelli C., F. Rizza, F. Marinone, A. Dulio, V. Terzi y L. Cattivelli. 1995. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiologia Plantarum* 94:87-93.
- Nishida I. y N. Murata. 1996. Chilling sensitivity in plants and bacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:541-568.
- Nilsen E.T. y D.M. Orcutt. 1996. *Physiology of Plants Under Stress. Abiotic Factors.* John Wiley & Sons, Inc.
- Norberg P. y C. Liljemberg. 1991. Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells. *Plant Physiology* 96:1136-1141.
- Olien C.R. y J.L. Clark. 1993. Changes in soluble carbohydrates composition of barley, wheat, and rye during winter. *Agronomy Journal* 85:21-29.
- Olsson M. 1995. Alteration in lipid composition, lipid peroxidation and antioxidative protection during senescence in drought stressed plants and non drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:547-553.
- Osmond C.B., M.P. Austin, J.A. Berry, W.D. Billings, J.S. Boyer, J.W.H. Dacey, P.S. Nobel, S.D. Smith y W.E. Winner. 1987. Stress physiology and the distribution of plants. *BioScience* 37:38-48.
- Ovcharov K.E. 1977. *Physiological Basis of Seed Germination.* USDA y NSF. New Delhi.
- Pandey D.K. 1992. Conductivity testing of seeds. *En Seed Analysis.* Ed. H.F. Linskens y J.F. Jackson. *Modern Methods of Plant Analysis New Series* volume 14. Springer-Verlag. 273-304.
- Patterson B.D., D. Graham y R. Paul. 1979. Adaptation to chilling: survival, germination, respiration and protoplasmic dynamics. *En Low Temperature Stress in Crops Plants. The role of the membrane.* Ed. J.M. Lyons, D. Graham y J.K. Raison. Academic Press. 25-35.

Pearson J. y G.R. Stewart. 1990. Free proline and prolamine protein in the grain of three barley varieties subjected to a gradient of water supply. *Journal of Experimental Botany* 41:515-519.

Peterson D.M. y A.C. Brinegar. 1986. Oat storage proteins. *En Oats: Chemistry and Technology*. Ed. F.H. Webster. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota. 153-203.

Pollard A.S. y R.G. Win-Jones. 1979. Enzyme activity in concentrated solutions of glycinebetaine and others solutes. *Planta* 144 :241-248.

Poljafoff-Mayber A., G.F. Somers, E. Werker y J.L. Gallagher. 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination, and salt tolerance. II. germination and salt tolerance. *American Journal of Botany* 81:54-59.

Pritchard H.W., P.B. Tomsett, K. Manger y W.J. Smidt. 1995. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. *Annals of Botany* 76:79-88.

Puntarulo S. 1994. Effect of oxidative stress during imbibition of soybean embryonic axes. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B:279-286.

Puntarulo S., R.A. Sánchez y A. Boveris. 1988. *Plant Physiology* 86:626-630.

Purvis A.C. y R.L. Shewfelt. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum* 88:712-718.

Purvis A.C., R. Shewfelt y J.W. Gegogine. 1995. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiologia Plantarum* 94:743-749.

Quartacci M.F. y F. Navari-Izzo. 1992. Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *Journal of Plant Physiology* 139 :621-625.

Raven J.A. 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytologist* 101:25-77.

Riazi A., K. Matsuda y A. Arslan. 1985. Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 36:1716-1725.

Rizza F., C. Crosatti, A.M. Stanca y L. Cattivelli. 1994. Studies for assessing the influence of hardening on cold tolerance barley genotypes. *Euphytica* 75:131-138.

Roberts E.H. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.

Roberts E.H. 1988. Temperature and seed germination. *En Plants and Temperature*. Ed. S.P. Long y F.I. Woodward. Symposia of the Society of Experimental Biology, Company of Biologist Ltd. Cambridge. 109-132.

Roberts D.W.A. y M.N. Grant. 1968. Changes in cold hardiness accompanying development in winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 48:369-376.

Rojas L.A. 1991. Determinación del efecto de la temperatura sobre la fluidez de membranas celulares de trigo (*Triticum aestivum*) mediante técnicas fluorimétricas. Tesis de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Rohlf F.J. y R.R. Sokal. 1981. *Statistical Tables*. W.H. Freeman and Company. 2nd edition.

Rychter A.M., E. Ciesla y A. Kacperska. 1988. Participation of the cyanide-resistant pathway in respiration of winter rape leaves as affected by plant cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 73:299-304.

Sakai A. y W. Larcher. 1987. *Frost Survival of Plants. Responses and Adaptation to Freezing Stress*. Ecological Studies 62. Springer-Verlag.

Scott S.J. y R.A. Jones. 1982. Low temperature seed germination of *Lycopersicon* species evaluated by survival analysis. *Euphytica* 31: 869-883.

Scott S.J., R.A. Jones y W.A. Williams. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science* 24:1192-1199.

Scott S.J. y R.A. Jones. 1985. Cold tolerance in tomato. I. Seed germination and early seedling growth of *Lycopersicon esculentum*. *Physiologia Plantarum* 65:487-492.

Siegel S. y N.J. Castellan. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill International Editions. Statistical Series. 2nd edition.

Simon E.W. 1979. Seed germination at low temperatures. Adaptation to chilling: survival, germination, respiration and protoplasmic dynamics. *En Low Temperature Stress in Crops Plants. The role of the membrane*. Ed. J.M. Lyons, D. Graham y J.K. Raison. Academic Press. 37-45.

Smirnoff N. y Q.J. Cumbar. 1989. Hydroxyl radicals scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060.

Sokal R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and Company. NY. 2nd edition.

Steponkus P.L. y D.V. Lynch. 1989. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *Journal of Bioenergetics of Biomembranes* 21 :21-41.

Stewart C.R., B.A. Martin, L. Reding y S. Cerwick. 1990a. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures. *Plant Physiology* 92:755-760.

Stewart C.R., B.A. Martin, L. Reding y S. Cerwick. 1990b. Seedling growth, mitochondrial characteristics, and alternative respiratory capacity of corn genotypes differing in cold tolerance. *Plant Physiology* 92:761-766.

Svec L.V. y H.F. Hodges. 1973. Respiration activity in barley seedlings during cold hardening in controlled and natural environments. *Canadian Journal of Plant Science* 53:457-463.

Taiz L. y E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Thomas H. y A.R. James. 1993. Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. *Annals of Botany* 72:249-254.

Uemura M. y P.L. Steponkus. 1994. A contrast of the plasma membranes lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology* 104:479-496.

Van der Venter H.A. 1985. Cyanide-resistant respiration and cold resistance in seedlings of maize (*Zea mays* L.). *Annals of Botany* 56:561-563.

Vieira C.C.J. y R.C.L. Figueiredo-Ribeiro. 1993. Fructose containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant, Cell and Environment* 16:919-928.

Webb M., M. Uemura y P.L. Steponkus. 1994. A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology* 104:467-478.

Welbaum G.E. y K.J. Bradford. 1990. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Plant Physiology* 92:1046-1052.

Wesley-Smith J., P. Berjak, N. Pammenter y C.W. Vertucci. 1995. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axis of *Pisum sativum* L. at various water contents. *Annals of Botany* 76:59-64.

Wolf S., D. Yakir, M.A. Stevens y J. Rudich. 1986. Cold temperature tolerance of wild tomato species. *Journal of American Society of Horticultural Science* 111:960-964.

Wolk W.D. y R.C. Herner. 1982. Chilling injury of germinating seeds and seedlings. *HortScience* 17:169-173.

Worthington Manual. 1988. Worthington Biochemical Corporation. Ch. Worthington ed. Freehol, New Jersey, USA.

Yoshida S. 1984. Studies on freezing injury of plant cells. *Plant Physiology* 75:38-42.

Yoshida S. y M. Uemura. 1984. Protein and lipid compositions of isolated plasma membranes from orchard grass (*Dactiliys glomerata* L.) and changes during cold acclimation. *Plant Physiology* 75:31-37.

Youngs V.L. 1986. Oat lipids and lipids-related enzymes. *En Oats: Chemistry and Technology*. Ed. F.H. Webster. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota. 205-226.

Zaiter H., E. Baydoun y M. Sayyed-Hallak. 1994. Genotypic variation in the germination of common bean in response to cold temperature stress. *Plant and Soil* 63:95-101.

Zhang J., S. Cuy, J. Lee, J. Wey y M.B. Kirkham. 1995. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:567-575.

Ziegler P. 1995. Carbohydrates degradation during germination. *En Seed Development and Germination*. Ed. J. Kigel y G. Galili. Marcel Dekker Inc. NY. p 447-474.