

## **Pérdida de tolerancia a la desecación durante la imbibición-germinación en semillas de maíz\***

### **Loss of desiccation tolerance during imbibition-germination in maize seeds**

**María Alma Rangel-Fajardo<sup>1§</sup>, Leobigildo Córdova-Téllez<sup>2</sup> y Elizabeth Cárdenas-Soriano<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Campo Experimental Mocochoá-INIFAP. Carretera Mérida-Motul, km 25, Mérida. C. P. 97454, Mocochoá Yucatán. Tel: 01 (991) 9162215. Ext. 146. <sup>2</sup>Programa Producción de Semillas. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. <sup>3</sup>Programa de Fitopatología. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Carretera México-Texcoco, km. 36.5, Montecillo, Texcoco. C. P. 56230, Estado de México. (lcordova@colpos.mx; esoriano@colpos.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: rangel.alma@inifap.gob.mx.

#### **Resumen**

Las semillas ortodoxas cerca de la madurez adquieren tolerancia a la desecación; sin embargo, durante el proceso de imbibición-germinación ésta se pierde. El tiempo en que ocurre entre especies, incluso entre lotes de la misma especie es variable. Se determinó el momento en que ocurre la pérdida de tolerancia a la desecación en semillas de maíz durante la imbibición-germinación, además se observó el comportamiento y relación de cuerpos lípidos con la pérdida de tolerancia. Semillas de maíz de la línea 231 fueron imbibidas en agua y con diferentes concentraciones de polietilenglicol 8 000. La cinética de imbibición se cuantificó en periodos de ocho horas hasta las 40 h y la pérdida de tolerancia a desecación se estimó con pruebas de germinación estándar, conductividad eléctrica y envejecimiento acelerado. Ejes embrionarios fueron procesados y observados en el microscopio electrónico de transmisión. La pérdida de tolerancia a la desecación se presentó a las 32 h de imbibición a contenidos de agua de 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> y 520 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> en semilla y embrión respectivamente. En este momento la conductividad aumenta de 7.26 a 15.63  $\mu\text{Sm}^{-1}\text{g}^{-1}$  mientras la germinación y viabilidad se redujeron 27 y 84% respectivamente. El movimiento de los cuerpos lípidos durante la imbibición-germinación se presenta entre las 24 h y 32 h, provocando alteraciones a la membrana con

#### **Abstract**

Orthodox seeds near maturity acquire desiccation tolerance, however during this imbibition-germination is lost. The time that occurs between species even between batches of the same species is variable. When the loss of desiccation tolerance in maize seeds during imbibition, germination occurs is determined, and also the behavior of lipid bodies relative to the loss of tolerance was observed. Maize seeds of line 231 were imbibed in water and with various concentrations of polyethylene glycol 8 000. The imbibition kinetics was quantified in periods of eight hours to 40 hours and the loss of tolerance to desiccation is estimated by testing standard germination, conductivity electrical and accelerated aging. Embryonic axes were processed and observed in the transmission electron microscope. The loss of desiccation tolerance was presented at 32 h of imbibition water contents of 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> and 520 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> seed and embryo respectively. At this time the conductivity increases from 7.26 to 15.63  $\mu\text{Sm}^{-1}\text{g}^{-1}$  while the germination viability decreased 27 and 84% respectively. The movement of lipid bodies during imbibition-germination occurs between 24 h and 32 h, causing changes to the membrane with dried, so the role of these, besides being a source of energy during germination, provide membrane protection during desiccation.

\* Recibido: diciembre de 2013  
Aceptado: marzo de 2014

los secados, por lo que el papel que juegan éstos, además de ser fuente de energía durante la germinación, proveen de protección a las membranas durante la desecación.

**Palabras clave:** contenido de agua, lípidos, membranas celulares.

## Introducción

Las semillas ortodoxas durante el desarrollo, cerca de la madurez, presentan la capacidad de reducir el contenido de agua de los tejidos sin afectar la viabilidad. A ésta característica se le conoce como tolerancia a la desecación. Se considera que ésta es una cualidad que confiere protección a los tejidos que pueden sufrir daños durante la deshidratación (Vertucci y Farrant, 1995). Bewley (1995) la define como la capacidad de las semillas para germinar después de un secado rápido. Puede reducir el contenido de agua hasta 50 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> y almacenarlas por periodos mayores a un año sin tener descensos en el porcentaje de germinación (Egli y TeKrony, 1997).

Durante la adquisición de la tolerancia las células embrionarias presentan cambios en estructura, moleculares y bioquímicos, por ejemplo la movilización de cuerpos lipídicos a la periferia de la pared celular, presencia de proteínas LEA's, conformación del ADN, reacción del citoesqueleto y presencia de sistemas antioxidantes (Vertucci y Farrant, 1995; Córdova-Tellez y Burris, 2002; Buitink *et al.*, 2000).

Durante el proceso de imbibición-germinación se pierde la tolerancia a la desecación (Oliver *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001; Bing *et al.*, 2012). Las sustancias de reservas, como almidón y lípidos, son transformadas enzimáticamente para formar compuestos solubles que son movilizados al embrión y propiciar el crecimiento de la plántula (Egli y TeKrony, 1997). El periodo en que ocurre la pérdida de tolerancia va desde que inicia la imbibición y hasta el momento de la protusión radical (LePrince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005) y está íntimamente ligada con la concentración de agua presente en los tejidos de la semilla (Vertucci y Ross, 1990; Walters *et al.*, 2002; Ren y Tao, 2003). Sin embargo, el tiempo en que ésta se presenta es variable entre especies. Senaratna y McKersie (1983) encontraron que semillas de soya [*Glycine max* (L.) Merr cv. Maple Arrow] imbibidas por 6 h seguían manteniendo la tolerancia a secados severos, pero después de 36 horas la perdieron, mientras que en semillas de chícharo (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) ésta fue entre 18 y 24 h (Koster y Leopold 1988).

**Keywords:** water content, lipid cell membranes.

## Introduction

Orthodox seeds during development near maturity have the ability to reduce water content of the tissues without affecting viability. In this feature is called desiccation tolerance. It is considered that this is a quality which confers protection to tissues may suffer damage during dehydration (Vertucci and Farrant, 1995). Bewley (1995) defines it as the ability of seeds to germinate after rapid drying. You can reduce the water content to 50 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> and stored for periods longer than one year without decreases in the percentage of germination (TeKrony and Egli, 1997).

During acquisition of tolerance embryonic cells show changes in structure, molecular and biochemical, for example the mobilization of lipid bodies in the periphery of the cell wall, the presence of LEAs proteins, DNA conformation, reaction of the cytoskeleton and the presence of antioxidant systems (Vertucci and Farrant, 1995; Buitink *et al.*, 2000; Burris, 2002).

During imbibition, germination, desiccation tolerance (Hoekstra *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2000; Bing *et al.*, 2012) is lost. Reserve substances such as starch and lipids, are enzymatically transformed to form soluble compounds are mobilized to promote the embryo and seedling growth (Egli and TeKrony, 1997). The period in which the loss of tolerance ranges from initiating imbibition until time of radical protrusion occurs (LePrince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005) and is closely linked with the concentration of water present in the seed tissues (Vertucci and Ross, 1990; Walters *et al.*, 2002; Ren and Tao 2003). However, the time in which this occurs varies among species. Senaratna and McKersie (1983) found that soybean [*Glycine max* (L.) Merr cv. Maple Arrow] imbibidas for 6 h still maintaining tolerance to severe drying, but after 36 hours lost while in pea seeds (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) it was between 18 and 24 h (Koster and Leopold 1988).

As acquisition causes changes in cell structure, the loss of tolerance, prior to drying, brings physical, physiological and anatomical changes in the cells (Farias *et al.*, 2005) resulting in low viability and seed germination. Daws *et al.* (2008) reported that the loss of tolerance might reduce up to 50% germination of seed lots are in geographical airlines affected by high relative humidity or rainy seasons. This study determined the time when the loss of desiccation tolerance

Al igual que la adquisición provoca cambios en la estructura celular, la pérdida de la tolerancia, previo a un secado, trae alteraciones físicas, fisiológicas y anatómicas en las células (Farias *et al.*, 2005) ocasionando baja viabilidad y poder germinativo de las semillas. Daws *et al.* (2008) reportan que la pérdida de tolerancia puede mermar hasta 50%, la germinación de lotes de semillas se encuentran en aéreas geográficas afectadas por altas humedades relativas o estaciones lluviosas. El presente trabajo determinó el momento en que ocurre la pérdida de tolerancia a la desecación en un lote de semillas de maíz durante el proceso de imbibición-germinación y se observó el comportamiento de cuerpos lipídicos asociados a la pared celular y su relación con la pérdida de tolerancia a la desecación.

## Materiales y métodos

Se utilizó semilla de maíz de la línea de maíz 231 proporcionada por el Dr. Aquiles Carballo Carballo y fue producida en el ciclo primavera-verano de 2002 en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Estado de México.

**Cinética de imbibición.** Con la finalidad de observar la cinética de imbibición en la semilla se realizaron dos experimentos, uno para controlar la tasa de imbibición, el grado de hidratación final y determinar la contenido de humedad en la que se presenta la pérdida de la tolerancia a la desecación y el segundo para evaluar el tiempo en horas en el que se da este fenómeno y evaluar de forma indirecta las implicaciones en las membranas celulares. Para el experimento uno se utilizaron diferentes concentraciones de polietilenglicol 8000 (PG) SIGMA. Fueron colocadas 2 000 semillas por tratamiento entre toallas de papel (24 x 23.5 cm) marca Marquis Georgia-Pacific, las cuales se humedecieron previamente con una solución de PG a concentraciones de 0 (testigo, agua destilada), 15, 20, 25 y 30 % p/v a 20 °C (Suisse, 1985). Las toallas se enrollaron en forma de taco (50 semillas por taco) y el conjunto de tratamientos se colocó a temperatura constante de  $20 \pm 1$  °C. Durante el proceso de imbibición se extrajeron al azar muestras de 400 semillas de cada concentración a las 8, 16, 24, 32 y 40 h y se enjuagaron con agua corriente. De éstas, se usaron 100 semillas para determinar el contenido de humedad (50 en semilla completa y 50 del embrión), 100 para hacer inmediatamente pruebas de germinación estándar (sin secado) y 200 para llevarlas de nuevo a secado en condiciones de laboratorio (18 °C y 75% de humedad relativa) suspendiéndose cuando la humedad en la semilla se redujo nuevamente a

in maize seed lot happens during imbibition-germination and behavior of lipid bodies associated with the cell wall and their relation to observed loss desiccation tolerance.

## Materials and methods

Maize seed maize line 231 provided was produced in the spring-summer season 2002 in the Experimental Field of the Graduate College of Agricultural Sciences, State of Mexico was used.

**Imbibition kinetics.** In order to observe the kinetics of seed imbibition two experiments were conducted, one to control the rate of imbibition, the final degree of hydration and determining the moisture content in the loss of tolerance occurs desiccation and the second to assess the time in hours in which this phenomenon occurs and indirectly assess the implications in cell membranes. For the experiment one different concentrations of polyethylene glycol 8 000 (PG) used SIGMA. Were placed 2 000 seeds per treatment between paper towels (24 x 23.5 cm) mark Marquis Georgia-Pacific, which is previously moistened with a solution of PG at concentrations of 0 (control, distilled water), 15, 20, 25 and 30% w/v at 20 °C (Suisse, 1985). The towels were rolled taco shaped (50 seeds per taco) and the set of treatments was placed at a constant temperature of  $20 \pm 1$  °C. During seed imbibition 400 samples of each concentration at 8, 16, 24, 32 and 40 h and rinsed with tap water were removed at random. Of these, 100 seeds were used to determine the moisture content (50 to seed complete and 50 embryo), 100 to immediately test standard germination (without drying) and 200 to bring them back to drying at laboratory conditions (18 °C and 75% RH) when the moisture suspended in the seed is further reduced to levels of 100 - 110 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. These seeds were used for germination and germination rate in response to the accelerated aging test.

In 2000 a second experiment seeds were imbibed in towels moistened with distilled water, sampling intervals were every 8 h to 40 h of imbibition. At each sampling seeds with radicle hydrated (swollen) were recorded, with radicle of 1 and 3 mm in length, of which 50 seeds of each state were taken for observation in the transmission electron microscope (TEM). At each sampling time the moisture content (150 seeds) were determined as described below and 200 seed drying were carried out 24 hours at 35 °C and 40% RH for later evaluation of loss of desiccation tolerance by standard germination, viability and electrical conductivity.

niveles entre 100-110 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. Estas semillas se emplearon para evaluar germinación y germinación en respuesta a la prueba de envejecimiento acelerado.

En un segundo experimento se imbibieron 2 000 semillas en toallas humedecidas con agua destilada, los intervalos de muestreo fueron cada 8 h hasta las 40 h de imbibición. En cada muestreo se contabilizaron semillas con radícula hidratada (hinchada), con radícula de 1 y 3 mm de longitud, de las cuales se tomaron 50 semillas de cada estado para realizar observaciones en el microscopio electrónico de transmisión (TEM). En cada intervalos de muestreo se determinó el contenido de humedad (150 semillas) como se describe posteriormente y se llevaron 200 semillas a secado por 24 h a 35 °C y 40% HR para posteriormente evaluar la pérdida de tolerancia a la desecación por medio de germinación estándar, viabilidad y conductividad eléctrica.

**Contenido de humedad:** se determinó mediante el método de la estufa de acuerdo con “International Seed Testing Association” (ISTA, 1996) a 103 °C por 72 h en dos repeticiones de 25 para semillas completas y embriones para cada tratamiento, las muestras fueron pesadas en una balanza analítica y el contenido de humedad se calculó con la ecuación  $CH = [(PI - PF) / PI] \times 1000$  (Moreno, 1996); donde CH= contenido de humedad; PI= peso inicial antes del secado; PF= peso final después del secado. Los resultados se reportan en g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>.

**Pérdida de tolerancia a la desecación:** en el experimento uno se evaluó mediante la prueba de germinación estándar (antes y después del secado) y la prueba de envejecimiento acelerado, realizada únicamente después del secado. La prueba de germinación se realizó de acuerdo con las normas de la ISTA (1996), excepto que el tamaño de la muestra consistió de cuatro repeticiones de 25 semillas, entre papel (Marquis Georgia-Pacific) enrollado (taco), el conjunto se colocó en una cámara germinadora a 25 ± 1 °C. La prueba de envejecimiento acelerado se realizó en una cámara germinadora a 45 °C por 72 h de acuerdo con la metodología propuesta por Delouche (1996), excepto que se utilizaron 4 repeticiones de 25 semillas.

En el experimento dos se realizó la prueba de germinación estándar, como se describió con anterioridad excepto que fue sólo en semillas después de secado, además de realizar la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad utilizando la metodología de acuerdo con Moreno (1996), excepto que se emplearon 4 repeticiones de 25 semillas por cada tiempo de imbibición y la prueba de conductividad eléctrica para determinar de manera indirecta el daño en membranas

**Moisture content:** determined by the oven method according to “International Seed Testing Association” (ISTA, 1996) at 103 °C for 72 h in two replicates of 25 for whole seeds and embryos for each treatment, samples were weighed on an analytical balance and the moisture content was calculated from the equation  $CH = [(PF - PI) / PI] \times 1000$  (Moreno, 1996); where CH= moisture content; PI= initial weight before drying; PF= final weight after drying. The results are reported in g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>.

Loss of desiccation tolerance: in one experiment was assessed by standard germination test (before and after drying) and the accelerated aging test, carried out only after drying. The germination test was conducted according to the rules of ISTA (1996), except that the size of the sample consisted of four replications of 25 seeds, between paper (Marquis Georgia-Pacific) wound (heel), the assembly was placed in a germination chamber at 25 ± 1 °C. The accelerated aging test was performed in a germination chamber at 45 °C for 72 h according to the proposal by Delouche (1996) method except that 4 replicates of 25 seeds were used.

In experiment two standard germination test was performed as described above except that it was only in seeds after drying, in addition to the tetrazolium test to assess viability using the method according to Brown (1996), except that 4 replicates of 25 seeds were used for each soaking time and the electrical conductivity test to determine indirectly damage cell membranes, although it consisted of three repetitions of 25 seeds for each soaking time (0, 8, 16, 24, 32 and 40 h), each replicate was placed in 250 mL beakers containing 75 ml of deionized water and set aside on a germination room at 22 ± 1 °C for 24 h, after which time they proceeded to measure by electrical conductivity meter mark OAKTON WD-356070 -00 micro-siemnes (µ Scm<sup>-1</sup>).

Behavior of lipid bodies: using a razor blade, the embryonic axis of 5 seeds per each imbibition times (which had different levels of hydration) In addition to removing the embryonic axis with the following seeds were removed (1) dry seed (0 h imbibition); (2) imbibidas-germinated in the presence of fully hydrated seeds radicle (swollen), seeds with 1 and 3 mm of root; and (3)-germinated seed imbibida after drying following 1 and 3 mm. Were processed according to the methodology used with the following modifications: the first fixation is done with a solution consisting of 3% glutaraldehyde/1 mM CaCl<sub>2</sub>, a 0.05M phosphate buffer at pH 7.2; the dwell time was 24 h at 4 °C and was double staining using 4% uranyl acetate and Reynolds dye (Bozzola *et al.*, 1999).

celulares, ésta consistió en pesar 3 repeticiones de 25 semillas por cada tiempo de imbibición (0, 8, 16, 24, 32 y 40 h), se colocó cada repetición en vasos de 250 ml conteniendo 75 ml de agua desionizada y se reservaron en un cuarto de germinación a  $22 \pm 1$  °C por 24 h, después de este tiempo se procedió a medir la conductividad eléctrica mediante un medidor marca OAKTON WD-356070<sup>00</sup> en micro-siemnes ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ).

**Comportamiento de cuerpos lipídicos:** con ayuda de navaja de un filo, se extrajeron los ejes embrionarios de 5 semillas por cada uno de los tiempos de imbibición (los cuales presentaban diferentes niveles de hidratación) además extraer los ejes embrionarios a semillas con las siguientes características (1) semilla seca (0 h de imbibición); (2) semillas imbibidas-germinadas, con la presencia de radícula completamente hidratada (hinchada), semillas con 1 y 3 mm de raíz; y (3) semilla imbibida-germinada después de secado con raíz de 1 y 3 mm. Se procesaron de acuerdo a la metodología empleada por Córdova-Tellez y Burris (2002) con las siguientes modificaciones: la primer fijación se hizo con una solución compuesta por 3% de Glutaraldehído/1 mM  $\text{CaCl}_2$ , un amortiguador de fosfatos a 0.05M pH de 7.2; el tiempo de fijación fue de 24 h a 4 °C y la tinción fue doble utilizando 4% de acetato de uranilo y el colorante de Reynolds (Bozzola *et al.*, 1999).

Los ejes embrionarios fueron seccionados en forma transversal a la altura del meristemo radical, a excepción de las muestras de ejes con longitud de 1 y 3 mm los cuales fueron seccionados también por encima del meristemo, en la parte media entre el nudo cotiledonar y el meristemo. Para realizar los cortes se empleó un ultramicrotomo Reichert modelo 570 con navaja de diamante, obteniendo cortes de 60 a 90 nm. Éstos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM9 y las imágenes obtenidas fueron capturadas en película Kodak electrón 4489 6.5 x 9 cm.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó independiente para el experimento uno y dos. El uno fue analizado en un diseño completamente al azar con arreglo factorial consistente en dos factores: concentración de polietilenglicol y tiempo de imbibición con cinco niveles cada factor y el dos fue analizado en un diseño completamente al azar. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias comparación de medias Tukey con  $\alpha = 0.05$ , empleando el programa Statistical Analysis System<sup>®</sup> (SAS) versión 9.11.

The embryonic axes were sectioned transversely at the level of the root meristem, except samples axes length of 1 and 3 mm which were sectioned also above the meristem, in the middle between the cotyledonary and meristem. To make the cuts an ultra-microtome Reichert model 570 was used with diamond knife, getting cut from 60 to 90 nm. These were observed by transmission electron microscope and Carl Zeiss EM9 imagery were captured on Kodak electron 4489 6.5 x 9 cm.

**Statistical analysis.** The statistical analysis was performed independently for experiment one and two. Each was analyzed in a completely randomized design in factorial arrangement consisting of two factors: polyethylene glycol concentration and soaking time with five levels each and two-factor was analyzed in a completely randomized design. Analysis of variance and mean comparison Tukey mean comparison with  $\alpha = 0.05$  were performed using the Statistical Analysis System<sup>®</sup> (SAS) software version 9.11.

## Results and discussion

**Control of hydration.** Imbibition kinetics maize seeds shown in Figure 1a, three phases of imbibition (fast, slow and other fast) for 48 h test lasted detected. The first phase of rapid imbibition occurred during the first 8 h, the highest rate of imbibition corresponded to the control ( $21 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) compared with 18.1, 18.7, 16.3 and  $15.5 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  registered treatments of 15, 20, 25 and 30% w/v PG respectively registering differences in both the concentration and the soaking time ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The slow phase of imbibition occurred 8-32 h. The highest rate was  $2.8 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for the witness, the record low was  $1.3 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for 30% w/v of PG.

At the end of this phase (32 h) the moisture content was  $306 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  for witness treatment followed 15% w/v PG ( $282 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ ) while the rest treatments did not exceed  $268 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ . The third phase (32-48 h), again rapid imbibition occurred only in the control with a rate of  $4 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $4.7 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for 15% w/v of PG. In both cases, the moisture content was more than  $350 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , which represents more than 3 times the initial moisture, while treatments of 20, 25 and 30% w/v PG remained within of slow absorption phase, with low humidity to  $300 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  without achieve radicle emission during soaking treatments.

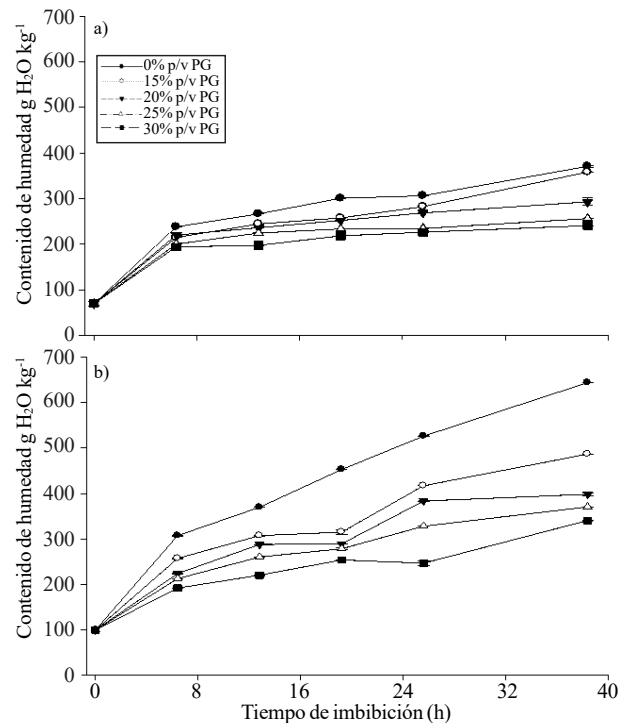
## Resultados y discusión

**Control de hidratación.** La cinética de imbibición en las semillas de maíz se observa en la Figura 1a, se detectaron tres fases de imbibición (rápida, lenta y otra rápida) durante las 48 h que duró la prueba. La primera fase de rápida imbibición ocurrió durante las primeras 8 h, la mayor tasa de imbibición correspondió al testigo (21 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) en comparación con 18.1, 18.7, 16.3 y 15.5 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> registrado en los tratamientos de 15, 20, 25 y 30% p/v de PG, respectivamente registrando diferencias tanto en la concentración como en el tiempo de imbibición ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 1). La fase de imbibición lenta ocurrió de 8 a 32 h. La tasa más alta fue de 2.8 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para el testigo, la de menor registro fue de 1.3 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para 30% p/v de PG.

Al final de esta fase (32 h) el contenido de humedad era de 306 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> para el testigo seguido del tratamiento de 15% p/v PG (282 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>) mientras que el resto de tratamientos no superaba los 268 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. La tercera fase (32 a 48 h), nuevamente de rápida imbibición, ocurrió únicamente en el testigo con una tasa de 4 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y con 4.7 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para 15% p/v de PG. En ambos casos, el contenido de humedad fue superior a 350 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>, lo que representa más de 3 veces la humedad inicial, mientras que los tratamientos de 20, 25 y 30% p/v de PG se mantuvieron dentro de la fase de absorción lenta, con humedades inferiores a 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> y sin lograr la emisión de radícula durante los tratamientos de imbibición.

Las tres fases de imbibición observadas ya han sido reportadas por Roberts y Ellis (1989) y Clifford (1995) en leguminosas. Éstos autores señalan que en la primera fase ocurre la imbibición o rehidratación de los tejidos de la semilla; en la segunda fase se presenta la activación de la germinación en sentido estricto, caracterizándose por un equilibrio en los potenciales hídricos de la semilla y la activación de los procesos metabólicos que desencadenan la emergencia de la radícula.

La tercera fase, Bewley y Black (1994) señalan que se caracteriza por un aumento en la demanda de agua como consecuencia del crecimiento de las estructuras del embrión debido principalmente al aumento en tamaño de las células. En la primera fase, que corresponde a un proceso físico de absorción de agua de un potencial hídrico mayor al que presenta la semilla (Egli y TeKrony, 1997), la reducción en la velocidad de imbibición en los tratamientos de PG se debió principalmente a que el PG modifica el potencial osmótico a



**Figura 1. Cinética de imbibición en semillas de maíz con diferentes concentraciones de polietilenglicol 8000. a) semillas completas; y b) ejes embrionarios.**

**Figure 1 Kinetics of maize seed imbibition with various concentrations of polyethylene glycol 8000 a) whole seeds; b) embryo axes.**

**Cuadro 1. Cinética de imbibición de semillas y ejes embrionarios de maíz.**

**Table 1. Kinetics imbibition of seeds and embryonic axes of maize.**

Factores	Contenido de agua (g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> Okg <sup>-1</sup> )	
	Semilla	Eje embrionario
Concentración PG (% p/v)		
0	296.39 a	459.98 a
15	266.94 ab	350.08 b
20	258.43 bc	323.22 b
25	229.75 cd	323.22 b
30	215.37 d	250.8 c
DMS	31.52	34.42
Tiempo de imbibición (h)		
8	213.39 c	247.62 d
16	233.81 bc	294.67 c
24	252.42 b	320.09 c
32	263.58 b	391.39 b
40	303.67 a	453.54 a
DMS	31.52	34.42

Las medias con diferentes letras difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

The three phases of imbibition observed and have been reported by Ellis and Roberts (1989) and Clifford (1995) in legumes. These authors point out that in the first phase

niveles inferiores al del agua libre (Bewley y Black, 1994). Los tratamientos de PG superiores a 15% p/v PG se mantuvieron en la fase de absorción lenta con niveles de humedad inferiores a  $300 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  en la semilla y no lograron la emisión de radícula, tal como ocurrió en el testigo y 15% p/v PG entre las 32 y 40 h que en promedio alcanzaron  $306.15$  y  $282.36 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  respectivamente, Hunter y Erickson (1952), señalan que la concentración mínima de humedad para que ocurra la emisión de la radícula en maíz es de  $305 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ .

En la Figura 1b se visualiza la hidratación de los ejes embrionarios de las semillas de maíz. Al igual que en semilla, los factores con sus niveles probados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 1). Durante las primeras 8 h se presentó una fase rápida de imbibición, con tasas de  $26 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para el testigo y de sólo  $12 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para el tratamiento de mayor concentración de PG (30% p/v PG). No obstante, entre 8 y 40 h no se aprecian de manera contundente las dos fases de imbibición registradas en la semilla completa. En el testigo es notorio un incremento lineal a una tasa de  $11 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , alcanzando una humedad de  $644 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  a las 40 h.

En los tratamientos de 15, 20 y 25% p/v PG se aprecia una fase lenta de imbibición de 8 a 24 h con tasas de  $4 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para cada tratamiento, seguida (24 a 40 h) de un ligero incremento de con tasas de 7, 5 y  $4 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. En el tratamiento de 30% p/v PG la fase lenta se prolonga hasta las 32 h con una tasa de  $2 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , seguido por un incremento de  $6 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  durante las 8 h finales.

La emisión radical se presentó a las 32 h para el testigo y para el tratamiento de 15% p/v con humedades del eje embrionario de  $526 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  y  $417 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ , respectivamente. A la fecha, no se encontraron reportes que indiquen los niveles críticos de humedad del embrión a la que ocurre la germinación y que además expliquen la diferencia en la velocidad de absorción entre los diferentes tejidos de la semilla. Sin embargo, Bradford (1990) indica que es necesario que existan potenciales hídricos en los tejidos que permitan a las radículas romper la barrera que impone el endospermo.

En este sentido, se puede decir que la cantidad de agua crítica en el tejido embrionario para que ocurra la germinación en maíz es superior a  $417.24$  (valor para la concentración 15% p/v PG a las 32 h)  $400 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ . Las semillas imbibidas en las soluciones de PG de 20, 25 y 30 % p/v PG a las 40 h sólo alcanzaron contenidos de agua de 398, 370 y  $340 \text{ g}$

imbibition or rehydration of the tissues of the seed occurs; in the second stage germination activation occurs in a strict sense, characterized by an equilibrium in the water potentials of the seed and the activation of metabolic processes that trigger the emergence of the radicle.

The third phase, Bewley and Black (1994) state that is characterized by an increase in water demand due to the growth of the embryo structures mainly due to increased cell size. In the first phase, which corresponds to a physical process of absorption of water of a water potential greater than that presented the seed (Egli and TeKrony, 1997), the reduction in the imbibition rate of PG treatment was primarily due to PG amending the osmotic potential below the free water (Bewley and Black, 1994) levels. PG treatments above 15% w/v PG remained at the stage of slow absorption with moisture levels below  $300 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  seed and failed to radicle emission, such as in the control and 15% w/v PG between 32 and 40 h on average reached  $306.15$  and  $282.36 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  respectively, Hunter and Erickson (1952) indicate that a low concentration of moisture to occur issuing maize radicle is  $305 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ .

In Figure 1b the hydration of the embryonic axes from seeds of maize is shown. Like seed, factors with their levels tested showed significant differences ( $p < 0.05$ ) (Table 1). During the first 8 h imbibition rapid phase was presented, with rates of  $26 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for the control and only  $12 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for the treatment of higher concentration of PG (30% w/v PG). However, between 8 and 40 h are not appreciated overwhelmingly the two phases of imbibition registered full seed. In the control it is known a linear increase at a rate of  $11 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , reaching a humidity of  $644 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

In treatments of 15, 20 and 25% w/v PG slow imbibition phase 8-24 h rates seen with  $4 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for each treatment, followed (24-40 h) a slight increase in rates of 7, 5 and  $4 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectively. In the treatment of 30% w/v PG the slow phase lasts until 32 h at a rate of  $2 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , followed by an increase of  $6 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  during the final 8 h.

The radical emission appeared at 32 h for the control and treatment of 15% w/v with the embryonic axis moisture of  $526 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$  and  $417 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ , respectively. To date, no reports indicating the critical moisture levels which occurs embryo germination and further explain the difference in the absorption rate between the different tissues of the seed was found. However, Bradford (1990) indicates that there need to be water potentials in tissues that allow rootlets break the barrier imposed by the endosperm.

H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> respectivamente, no se registraron emisiones de radícula esto coincide con lo reportado por Georghiou *et al.* (1983) quienes observaron reducción en la formación de vacuolas y rompimiento de estructuras de almacenamiento de reservas en las células de semillas de lechuga imbibidas en soluciones osmóticas que evitaron los potenciales hídricos para la emisión de radícula.

**Pérdida de tolerancia a desecación.** El efecto de la concentración de polietilén glicol (PG) y tiempos de imbibición sobre la germinación puede observarse en el Cuadro 2. La germinación de las semillas evaluadas no se vio afectada por las concentraciones de PG ( $p \geq 0.05$ ) manteniendo porcentajes de germinación superiores a 93%. Por otro lado, el tiempo de imbibición presentó diferencias ( $p \leq 0.05$ ) registrando la menor germinación a las 40 h (91.2%) en semillas húmedas. Mientras que cuando las semillas eran secadas después del tratamiento con PG se registraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) resultando las concentraciones de 25 y 30% p/v PG las que arrojaron los mejores porcentajes de germinación (93.2 y 94.6% respectivamente).

In this sense, one can say that the critical amount of water in the embryonic tissue for germination of maize occurs exceeds 417.24 (value for the concentration 15% w/v PG at 32 h) 400 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Seeds in PG solutions of 20, 25 and 30% w/v PG at 40 h reached a water content of 398, 370 and 340 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> respectively, no emissions were recorded radicle this coincides with those reported by Georghiou *et al.* (1983) who observed reduction in vacuole formation and breakdown of storage structures reservations of cells of lettuce seeds in osmotic solutions that prevented water potential for the issuance of radicle.

**Loss of desiccation tolerance.** Effect of the concentration of polyethylene glycol (PG) and soaking time on the germination can be seen in Table 2. Germination of seeds tested was not affected by the concentrations of PG ( $p \geq 0.05$ ) maintaining higher germination percentages at 93%. On the other hand, presented the soaking time differences ( $p \leq 0.05$ ) recorded the lowest germination at 40 h (91.2%) in wet seeds. While when seeds were dried after treatment with PG differences ( $p \leq 0.05$ ) were recorded resulting

**Cuadro 2. Germinación y respuesta a envejecimiento acelerado de semillas de maíz, antes y después de secado, sometidas a diferentes concentraciones de polietilén glicol 8 000 y tiempos de imbibición.**

**Table 2. Germination and accelerated aging response of maize seeds before and after drying, subjected to varying concentrations of polyethylene glycol 8 000 and imbibition times.**

Factores Concentración PG (%) p/v	Germinación (%)		
	Húmedas	Secas	Envejecimiento
0	97.4 a	76.4 c	38.5 ab
15	97.8 a	90.6 ab	27.4 bc
20	97.6 a	85.2 b	42.6 a
25	93.2 a	93.2 a	23.2 c
30	94.6 a	94.6 a	15.2 c
DMS	4.83	6.88	12.7
Tiempo de imbibición (h)			
8	97.2 a	95.4 a	52.2 a
16	95.6 ab	92.2 a	51.7 a
24	98.4 a	91.2 a	28.4 b
32	97.8 a	91.8 a	14 c
40	91.2 b	69.4 b	0.6 d
DMS	4.83	6.88	12.7

Las medias con diferentes letras difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Por otro lado, el tiempo de imbibición en semillas secadas solo registro diferencia volvió a registrar diferencias ( $p \leq 0.05$ ) para el tiempo de 40 h con una germinación 69.4%. Éstos resultados indican la sensibilidad de las semillas a desecación durante de la imbibición (Dasgupta *et al.*, 1982; Koster y Leopold, 1988; Leprince *et al.*, 1995) resultando más afectadas las semillas con mayor tiempo

concentrations of 25 and 30% w/v PG which produced the best germination percentages (93.2 and 94.6% respectively).

Furthermore, the soaking time in dried seeds single record difference again recorded differences ( $p \leq 0.05$ ) for the 40 h time with 69.4% germination. These results indicate



de imbibición. Esto fue indudable cuando las semillas del testigo se secaron después de imbibición y la germinación se redujo considerablemente después de las 32 h. Mientras que la imbibición con PG creó protección a las estructuras celulares después de secado (Georghiou *et al.*, 1983).

La respuesta a germinación en la prueba de envejecimiento acelerado arrojó diferencias ( $p \leq 0.05$ ) para ambos factores evaluados (Cuadro 2). La concentración de 20% p/v PG registró la mayor germinación mientras que 30% p/v PG fue la más afectada, esto puede deberse a una reacción tóxica del PG en la semilla durante la germinación como lo reportan varios autores (Murillo-Amador *et al.*, 2002; Kaya *et al.*, 2006; Ibrahim y Kazim, 2008). Mientras que la germinación en respuesta al tiempo de imbibición para el envejecimiento acelerado se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) notándose más afectados los tiempos de 24, 32 y 40 h de imbibición lo que coincide con la fase dos y tres en la cinética de imbibición (Figura 1) y en éstas es donde se presenta la germinación en sentido estricto (Roberts y Ellis, 1989; Clifford, 1995) por lo que las semillas ya eran sensibles a la desecación (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005).

De acuerdo con estos resultados se puede determinar que la pérdida de la tolerancia a la desecación se presentó poco después de las 32 h con contenidos de humedad de 371 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> y 644 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> para la semilla completa y el embrión en el tratamiento testigo respectivamente.

Por otro lado, los tratamientos de imbibición con PG, en semillas húmedas y secas, mantuvieron la germinación por arriba de 70% sugiriendo la protección a las estructuras celulares al modificar los potenciales osmóticos de la semilla y retrasar procesos propios de la germinación (Georghiou *et al.*, 1983).

En la prueba de envejecimiento acelerado se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en todos los tratamientos; cabe resaltar, que la concentración de 20% p/v PG tuvo la mejor respuesta de germinación, mientras que el tiempo de imbibición después de las 16 h registró una baja en la germinación de aproximadamente 45%. Se puede inferir que la pérdida de tolerancia se presentó en un lapso de tiempo entre las 24 y 32 h de imbibición y está fuertemente ligado a las concentraciones de humedad (Vertucci y Farrant, 1995; Walters *et al.*, 2002); sin embargo, para la pérdida de tolerancia se involucran otros factores como los son la permeabilidad de las cubiertas (Bing *et al.*, 2012).

the sensitivity of seeds to desiccation during imbibition (Dasgupta *et al.*, 1982; Koster and Leopold, 1988; Leprince *et al.*, 1995) most affected resulting in greater seed soaking time. This was undoubtedly the witness when the seeds were dried after soaking and germination was greatly reduced after 32 h. While PG created imbibition with protection of cell structures after drying (Georghiou *et al.*, 1983).

The germination response to the accelerated aging test threw differences ( $p \leq 0.05$ ) for both factors evaluated (Table 2). The concentration of 20% w/v PG showed the highest germination while 30% w/v PG was the most affected this can be due to a toxic reaction of PG in the seed during germination as several authors (Murillo-Amador *et al.*, 2002; Kaya *et al.*, 2006; Ibrahim and Kazim, 2008). While the germination time in response to the accelerated aging imbibition differences ( $p \leq 0.05$ ) were observed more affected noticing time of 24, 32 and 40 h of imbibition which coincides with the phase two and three in the imbibition kinetics (Figure 1) and where they are strictly germination (Roberts and Ellis, 1989; Clifford, 1995) is presented. So the seeds were already sensitive to drying (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005).

According to these results it can be determined that the loss of desiccation tolerance came shortly after 32 h with a moisture content of 371 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> and 644 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> for the whole seed and the embryo in the control treatment respectively.

Furthermore, the soaking treatment with PG, wet and dry seed germination maintained above 70% suggesting protection cellular structures to modify the osmotic potential of the seed and delay germination processes themselves (Georghiou *et al.*, 1983).

In the accelerated aging test differences ( $p \leq 0.05$ ) in all treatments were observed; worth noting that the concentration of 20% w/v PG had the best germination response, while soaking time after 16 h showed a low germination of about 45%. It can be inferred that the loss of tolerance was presented at a time between 24 and 32 h of imbibition and is strongly linked to the concentrations of moisture (Vertucci and Farrant, 1995; Walters *et al.*, 2002.). However, the loss of tolerance to other factors such as the permeability is involved covers (Bing *et al.*, 2012).

In Figure 2 it can be seen germination viability and electrical conductivity of the seeds with distilled water imbibidas for different times and dried after imbibition.

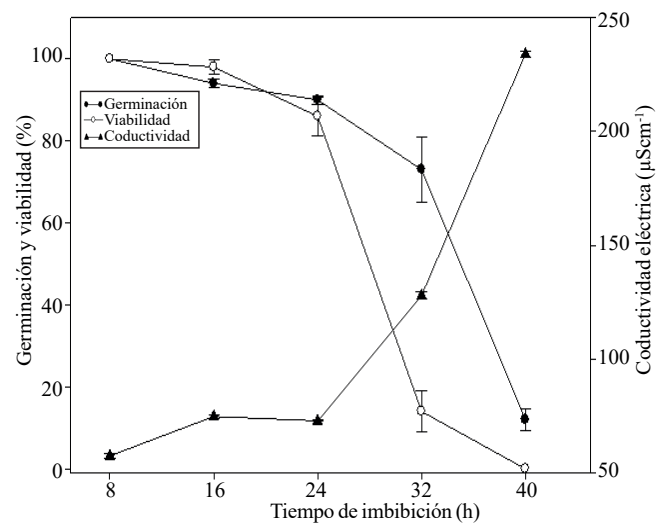
En la Figura 2 puede apreciarse la germinación, viabilidad y conductividad eléctrica de las semillas imbibidas con agua destilada por diferentes tiempos y secadas después de imbibición.

Dentro de todos los tiempos de imbibición se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en todas las pruebas. La germinación registro una fuerte reducción de 88 puntos porcentuales, esta disminución se hizo más evidente a partir de las 32 h de imbibición. En el caso de la viabilidad el descenso más drástico fue después de las 24 h registrando valores de 14 y 0% para las 32 y 40 h respectivamente mientras que la conductividad eléctrica se incrementó para este mismo periodo registrando valores de 127.97 y 234  $\mu\text{Scm}^{-1}$ . Con éstos resultados se sugiere que el secado después de la imbibición genero daño dentro de las membranas celulares. Éste se registró de forma gradual conforme fue avanzando el proceso de germinación (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005).

#### Cuerpos lípidos vs pérdida de tolerancia a la desecación.

Los cuerpos lípidos (CL) en células meristemáticas antes de la imbibición se observaron alineados y cerca de la pared celular (Figura 3a) esto coincide con lo observado por Córdova-Tellez y Burris (2002). Durante el inicio de la imbibición-germinación se observan los CL migrando al interior del citoplasma (Figura 3b) aproximadamente a las 32 h de imbibición. La principal razón de la movilización de éstos CL dentro del citoplasma, es para el desdoblamiento y ser utilizados como elementos de reserva, los cuales son necesarios durante el proceso de germinación que en este periodo de tiempo (32 h) ya se estaba presentando (Roberts y Ellis, 1989; Clifford, 1995; Egli y TeKrony, 1997).

Las células meristemáticas de semillas que aún no presentaban protusión radical (Figura 3c) a este tiempo (32 h) y que fueron secadas después de la imbibición aun presentaban algunos CL distribuidos dentro del citoplasma y cerca de la membrana plasmática, la cual comenzaba a verse con alteraciones. En células meristemáticas, de raíz con 1 mm de longitud después de secado, los CL disminuyeron en cantidad alrededor de la pared celular y las alteraciones en la membrana son apreciables (Figura 3d). Mientras células de muestras con raíz de 3 mm después de secado (Figura 3 e y f) las membrana plasmática está completamente alterada y no se puede apreciar ningún órgano dentro del citoplasma, la célula está colapsada.



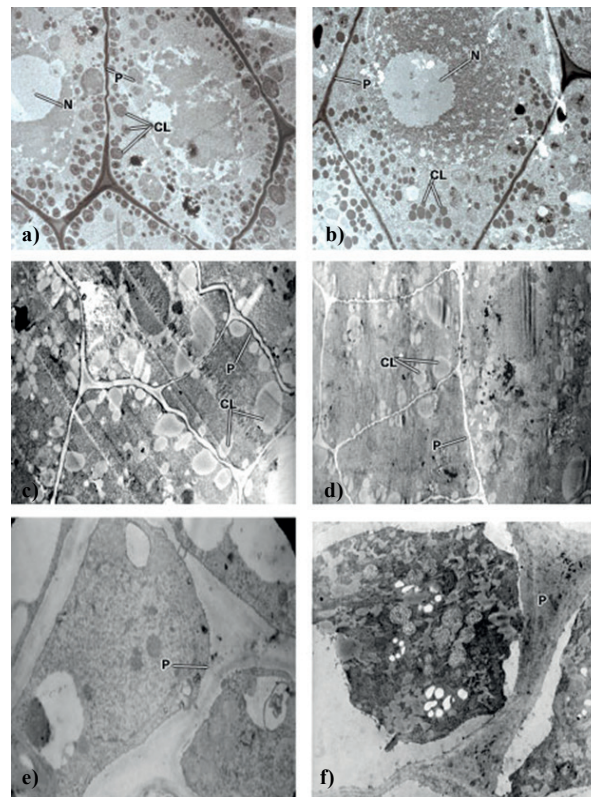
**Figura 2. Germinación, viabilidad y conductividad eléctrica de semillas imbibidas por diferentes tiempos y sometidas a secado.**

**Figure 2. Germination, viability and seed imbibidas electrical conductivity for different times and subjected to drying.**

Within all imbibition times differences ( $p \leq 0.05$ ) in all tests were observed. Germination record a sharp decline of 88 percentage points, this decline became more evident from 32 h of imbibition. For viability was the most dramatic decrease after 24 h recording values of 14 and 0% for the 32 and 40 h respectively while electrical conductivity increased for the same period of recording values 127.97 and 234  $\mu\text{Scm}^{-1}$ . With these results it is suggested that the gender drying after imbibition damage within cell membranes. This occurred gradually progressed as the germination process (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005).

Loss vs lipid bodies desiccation tolerance. Lipids luteum (CL) in meristematic cells before imbibition were observed aligned and close to the cell wall (Figure 3a) that coincides with that observed by Cordova-Tellez and Burris (2002). During start-germination imbibition CL observed migrating into the cytoplasm (Figure 3b) at approximately 32 h of imbibition. The main reason for the mobilization of these CL within the cytoplasm, and the split is to be used as reserve elements, which are necessary for the germination process in this period of time (32 h) and was being presented (Roberts and Ellis, 1989; Clifford, 1995; TeKrony Egli, 1997).

Meristematic seed not yet presented radical protrusion (Figure 3c) at this time (32 h) and were dried after imbibition still had some CL distributed within the cytoplasm and



**Figura 3.** Foto-micrografía (4 800x) del microscopio electrónico de transmisión mostrando los cuerpos lípidos durante el proceso de imbibición-germinación en células meristemáticas de raíz. a) 0 h de imbibición; b) 32 h de imbibición; c) 24 h de imbibición y secado; d) células meristemáticas de raíz de 1 mm de longitud después de someterse a secado; e y f) células meristemáticas de raíz de 3 mm de longitud después de someterse a secado. N= núcleo; CL= cuerpos lípidos; P= pared celular.

**Figure 3.** Photomicrograph (4 800 x) of the transmission electron microscope showing the lipid bodies during imbibition, germination in root meristem cells. a) 0 h of imbibition; b) 32 h imbibition; c) 24 h of soaking and drying; d) root meristem cells of 1 mm in length after being subjected to drying; e and f) root meristem cells of 3 mm in length after undergoing drying. N= nucleus; CL= lipid bodies; P= cell wall.

El proceso de germinación inicia con la imbibición, sin embargo, existe un periodo de tiempo donde el proceso solo es físico y se puede presentar en todas las semillas aun muertas (Bewley y Black, 1994). Existe un punto donde la cantidad de agua presente en las células promueve procesos irreversibles de la germinación, como es la movilización de reservas (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005). Muchas reservas como el caso de los CL además de suministrar energía para llevar a cabo la germinación proporcionan protección a la membrana citoplasmática durante la desecación (Leprince *et al.*, 2000). Los resultados de las imágenes coinciden con lo obtenido en las pruebas de germinación, viabilidad y envejecimiento, en todos los casos las disminuciones en la respuesta a germinación se presentaron después de las 24 h y el incremento de solutos en la prueba de conductividad fue en respuesta a las alteraciones observadas en las membranas plasmáticas.

around the plasma membrane, which was beginning to be with alterations. In meristematic cells, root length with 1 mm after drying, the CL decreased amount around the cell wall and membrane alterations are significant (Figure 3d). While root cells samples 3 mm after drying (Figure 3 e, f) the plasma membrane is completely altered and can not see any organelle within the cytoplasm, the cell is collapsed.

The germination process begins with imbibition; however, there is a time period where the process is only physical and can occur at all even dead seeds (Bewley and Black, 1994). There is a point where the amount of water present in the cell promotes germination irreversible processes, such as the mobilization reserves (Leprince *et al.*, 2000; Buitink *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005). Many reserves as the case of the CL addition to supplying power to carry out the germination provide protection to the cytoplasmic membrane during drying (Leprince *et al.*, 2000). The imaging results agree with

## Conclusiones

La pérdida de tolerancia a la desecación en semillas de maíz se presentó a las 32 h de imbibición cuando se tenían contenidos de agua superiores a 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> y 520 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> en semilla y embrión respectivamente. Las semillas de maíz toleran desecación hasta antes de 24 h de imbibición o con contenidos de humedad inferiores a 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. El movimiento de los cuerpos lípidos durante la imbibición-germinación se presenta durante las 24 h y 32 h de imbibición. Después de la movilización de éstos de la membrana al citoplasma, las células son sensibles a la desecación, por lo que el papel que juegan, además de ser fuente de energía durante la germinación, proveen de protección a las membranas durante la desecación.

## Literatura citada

- Bewley, J. D. 1995. Physiological aspects of desiccation tolerance. A retrospect. *J. Plant Sci.* 156:393-403.
- Bewley, J. D. and Black, M. 1994. *Seed. Physiology of development and germination*. 2<sup>nd</sup> Edition, Plenum Press. New York. 421p.
- Bing, B.; Sikron, N.; Gendler, T.; Kazachkova, Y.; Barak, S.; Grafi, G.; Khozin-Goldberg, I. and Fait, A. 2012. Ecotypic variability in the metabolic response of seeds to diurnal hydration-dehydration cycles and its relationship to seed vigor. *Plant Cell Physiol.* 53:38-52.
- Bozzola, J. J. and Russell, D. L. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologist*. Second edition. Sudbury, Mass. Jones and Bartlett Publishers, Inc. New York. 780 p.
- Bradford, K. J. 1990. A water relations analysis of seed germination rate. *Plant Physiol.* 94:840-849.
- Buitink, J. V; Satour, B. L. P. and Leprince, O. 2003. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn seeds. *Seed Sci. Res.* 13:273-286.
- Buitink, J.; Hoekstra, F. A. and Leprince, O. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. In: Black, M. and Pritchard, H. W. (Eds.). *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing Wallingford, Oxon. 293-318 pp.
- Clifford, M. B. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seed. In: Kigel, J. and Galili, G. (Eds.). *Seed development and germination*. Editorial Marcel Dekker. New York. 467-789 pp.
- Córdova-Tellez, L. and Burris, J. 2002. Alignment of lipid bodies along the plasma membrane during the acquisition of desiccation tolerance in maize seed. *Crop Sci.* 42:1982-1988.
- Dasgupta, J.; Bewley, J. D. and Yeung, E. C. 1982. Desiccation tolerant and desiccation intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. *J. Exp. Bot.* 13:1045-1057.
- Daws, I. M.; Crabtree, L. M.; Dalling, J. W.; Mullins, E. C. and Burslem, D. F. R. P. 2008. Germination responses to water potential in Neotropical pioneers suggest large-seeded species taken more risks. *Ann. Bot.* 102:945-951.
- those obtained in the germination tests, viability and aging, in all cases decreases in response to germination occurred after 24 h and the increase of solutes in the conductivity test was in response to the alterations observed in the plasma membranes.

## Conclusions

The loss of desiccation tolerance in maize seeds was presented at 32 h of imbibition when water contents higher than 300 g kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O and 520 g kg<sup>-1</sup> seed and had embryo respectively. Maize seeds tolerate desiccation to 24 h before embedding or moisture contents below 300 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. The lipid bodies move during imbibition, germination occurs during the 24 h and 32 h of imbibition. After mobilization of these membrane to the cytoplasm, the cells are sensitive to drying, so that the role, besides being a source of energy during germination, provide protection to the membrane during drying.

*End of the English version*



- Delouche, J. C. 1996. Accelerated aging test. AOSA meeting. College of Agriculture. University of Kentucky, Lexington, KY.
- Egli, D. B. and TeKrony, D. M. 1997. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. *Seed Sci. Res.* 7:3-11.
- Farias, R. M. J.; Buitink, J.; Van Lammeren, A. A. M. and Hilhorst, M. W. H. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J. Exp. Bot.* 418:2119-2130.
- Georghiou, K.; Psaras, G. and Mitrakos, K. 1983. Lettuce endosperm structural changes during germination under different light, temperature and hydration conditions. *Bot. Gazette* 144:207-211.
- Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A. and Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:431-438.
- Hunter, R. J.; Erickson, E. A. 1952. Relation of seed germination to soil moisture tension. *Agron. J.* 44:107-112.
- Ibrahim, D. and Kazim, M. 2008. Effect of salt and osmotic stresses on the germination of pepper seeds of different maturation stages. *Brazilian Ar. Biol. Technol.* 51(5):897-902. (online) [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132008000500004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132008000500004&lng=en&nrm=iso). ISSN 1516-8913.
- International Seed Testing Association (ISTA) 1996. *International rules for seed testing*. Seed Sci. Technol. 24:243.
- Kaya, M. D.; Okçub, G.; Ataka, M.; Çikilic, Y. and Kolsarıcı, Ö. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Eu. J. Agron.* 24(4):291-295.
- Koster, K. L. and Leopold, A. C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88:829-832.

- Leprince, O.; Harren, F. J. M.; Buitink, J.; Alberda, M. and Hoekstra, F. A. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. *Plant Physiol.* 122:597-608.
- Leprince, O.; Vertucci, W. C.; Hendry, G. A. F. and Atherton, N. M. 1995. The expression of desiccation induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiol. Plantarum.* 94:233-240.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. D. F. 389 p.
- Murillo-Amador, B.; López-Aguilar, R.; Kaya, C.; Larrinaga-Mayoral, J. and Flore-Hernández, A. 2002. Effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *J. Agron. Crop Sci.* 108:235-247.
- Oliver, M. J.; Tuba, Z. and Mishler, D. B. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecol.* 152:85-100
- Ren, J. and Tao, L. 2003. Effects of hydration-dehydration cycles on germination of seven *Calligonum* species. *J. Arid Environ.* 55:11-122.
- Roberts, H. E. y Ellis, H. R. 1989. Water and seed survival. *Ann. Bot.* 63:39-52.
- Senaratna, T. and McKersie, B. D. 1983. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Plant Physiol.* 72:620-624.
- Suisse, G. A. 1985. Effects of osmoconditioning corn (*Zea mays* L.) seed in polyethylene glycol on germinative responses at sub-optimal temperature. Master of Science Thesis, Department of Agronomy. Mississippi State University, State College. Mississippi. 63 p.
- Vertucci, W. C. and Roos, E. E. 1990. Theoretical basis of protocols of seed storage. *Plant Physiol.* 94:1019-1023.
- Vertucci, W. C. and Farrant, M. J. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In: Kigel, J. and Galili, G. (Eds).* Seed development and germination. Marcel Dekker. New York. 237-271.
- Walters, C.; Farrant, M. J.; Pammenter, N. W. and Berjak, N. 2002. Desiccation and damage. *In: Black, M. and Pritchard, H. W. (Eds.).* Desiccation and survival in plants. Drying without dying. CABI Publishing Wallingford, Oxon. 263-291 pp.