

**SEMILLAS DE RABANITOS
(*Raphanus sativus* L): OBSERVACIONES
DE SU MORFOLOGÍA BAJO
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA,
GERMINACIÓN Y UTILIDAD PARA
ESTUDIOS DE FITOTOXICIDAD**

**SEEDS OF RADISHES
(*Raphanus sativus* L): OBSERVATIONS OF
ITS MORPHOLOGY UNDER ELECTRON
MICROSCOPY, GERMINATION AND
USEFULNESS FOR PHYTOTOXICITY
STUDIES**

Taladrid, I. J. y M.B. Espinosa.

SEMILLAS DE RABANITOS (*Raphanus sativus* L): OBSERVACIONES DE SU MORFOLOGÍA BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, GERMINACIÓN Y UTILIDAD PARA ESTUDIOS DE FITOTOXICIDAD.

SEEDS OF RADISHES (*Raphanus sativus* L): OBSERVATIONS OF ITS MORPHOLOGY UNDER ELECTRON MICROSCOPY, GERMINATION AND USEFULNESS FOR PHYTOTOXICITY STUDIES.

SEMILLAS DE RABANITOS (*Raphanus sativus* L): OBSERVACIONES DE SU MORFOLOGÍA BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, GERMINACIÓN Y UTILIDAD PARA ESTUDIOS DE FITOTOXICIDAD.

SEEDS OF RADISHES (*Raphanus sativus* L): OBSERVATIONS OF ITS MORPHOLOGY UNDER ELECTRON MICROSCOPY, GERMINATION AND USEFULNESS FOR PHYTOTOXICITY STUDIES.

Taladrid, I. J. y M.B. Espinosa

SEMILLAS DE RABANITOS
(*Raphanus sativus* L):
OBSERVACIONES DE SU
MORFOLOGÍA BAJO
MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA,
GERMINACIÓN Y
UTILIDAD PARA ESTUDIOS
DE FITOTOXICIDAD.

SEEDS OF RADISHES
(*Raphanus sativus* L):
OBSERVATIONS OF ITS
MORPHOLOGY UNDER
ELECTRON MICROSCOPY,
GERMINATION AND
USEFULNESS FOR
PHYTOTOXICITY STUDIES.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 51: 171-183. Enero 2021

DOI:

10.18387/polibotanica.51.11

I.J. Taladrid

Instituto Nacional de Semillas (INASE).

Avenida Belgrano 450- C1092AAR-Buenos Aires-Argentina.

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (CONICET-UBA).

Sede: Facultad de Agronomía (UBA).

Av. San Martín 4453.-C1417DSE-Buenos Aires-Argentina.

M.B. Espinosa / mespinosa@agro.uba.ar

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (CONICET-UBA).

Sede: Facultad de Agronomía (UBA).

Av. San Martín 4453.-C1417DSE-Buenos Aires-Argentina.

RESUMEN: *Raphanus sativus* es una planta importante en la industria de las semillas de todo el mundo especialmente en Asia. Actualmente el conocimiento de su genoma convierte a este organismo en un buen modelo para análisis científicos como los que describen la acumulación de sustancias tóxicas como metales pesados en las plantas. *Raphanus sativus* es una planta dicotiledónea que se cultiva en todo el mundo. Pertenece a la misma familia que *Arabidopsis thaliana*: *Brassicaceae*. Se conocen muchos aspectos de su biología y se considera una especie apta para estudios de ecotoxicología. El objetivo de este trabajo fue analizar la morfología y algunas características de la germinación de las semillas de *R. sativus* con la finalidad de establecer un test de germinación. Describimos la morfología observada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) e histología de las semillas. Además, también se describe brevemente la germinación observada de las semillas de *R. sativus*. El color de la capa seminal varía entre los marrones claros, la forma es ovoide e irregular y mide aproximadamente tres (3) mm de diámetro. Estas semillas son apropiadas para ser utilizadas en la evaluación de los efectos tóxicos de ciertos compuestos químicos especialmente sobre el proceso de germinación. La velocidad del crecimiento radicular mostró gran heterogeneidad entre las semillas de un mismo grupo experimental por lo cual la longitud de la radícula no es un buen parámetro para ser usado como indicador de posibles efectos tóxicos.

Palabras clave: rabanitos, test de germinación, ecotoxicología, histología, forma de las semillas.

ABSTRACT: *Raphanus sativus* is an important plant in the seed industry worldwide especially in Asia. Currently, knowledge of its genome makes this organism a good model for scientific analyzes such as those that describe the accumulation of toxic substances such as heavy metals in plants. *Raphanus sativus* is a dicotyledonous plant that is cultivated throughout the world. The radish belongs to the same family of *Arabidopsis thaliana*: *Brassicaceae*. Many aspects of its biology are known and it is considered a species suitable for ecotoxicology studies. The objective of this work was to analyze the morphology and some characteristics of the germination of *R. sativus*

seeds in order to establish a germination test. We describe the morphology observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and histology of the seeds. Furthermore, the observed germination of *R. sativus* seeds is also briefly described. The color of the seminal layer varies between light brown, the shape is ovoid and irregular and measures approximately three (3) mm in diameter. These seeds are appropriate to be used in the evaluation of the toxic effects of certain chemical compounds especially on the germination process. The speed of root growth showed great heterogeneity among the seeds of the same experimental group, therefore the length of the radicle is not a good parameter to be used as an indicator of possible toxic effects.

Key words: radishes, germination test, ecotoxicology, histology, seeds shape.

INTRODUCCIÓN

Raphanus sativus es una planta dicotiledónea que se utiliza en cultivos de hortalizas en todo el mundo. Su número haploide es de 9 cromosomas (Hasterok, y otros, 2006). Se conoce más del 76% del genoma de esta especie, el que contiene aproximadamente 61.500 genes. Se ha estudiado la secuencia del ADN mitocondrial (Tanaka, Tsuda, Yasumoto, Yamagishi, & Terachi, 2012) y el ADN de los cloroplastos de *R. sativus*. Actualmente hay cinco "BioProjects" activos informados en Genome (NCBI) que se llevan a cabo en *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science*; *Myongji University*, Corea y *Kazusa DNA Research Institute*, Japón. Se reconocen al menos ocho líneas puras cuyos polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) se han identificado. El mapa genético de referencia para esta especie, se ha comenzado a construir (Mun, y otros, 2015).

El origen evolutivo de *Raphanus sativus*, probablemente está en la divergencia simultánea de *Raphanus* y *Brassica nigra* a partir de un ancestro común hexaploide. La divergencia ha sido posterior a un evento de triplicación del genoma completo (Cheng, Liang, Cai, Cai, Wu, & Wang, 2017). Se considera que sus semillas presentan dormición en ciertas condiciones. Sin embargo, no hay análisis concluyentes aún que permitan establecer cuál es el tipo de dormición que correspondería atribuirles (Baskin & Baskin, 2004) (Baskin & Baskin, 2005) (Tricault, Matejicek, & Darmency, 2018). Vercellino, Pandolfo, Cerrota, Cantamutto & Presotto (2019) describieron en su trabajo reciente que las semillas frescas de *R. sativus* silvestres no presentan dormición. Se conocen muchos otros aspectos de su biología como por ejemplo el tamaño de los poros de la pared celular en las células de las raíces que mide de 37 a 38 Ångström descrito por Carpita, Sabularse, Montezinos, & Delmer (1979). Este hecho permite predecir la posibilidad de que ciertas nano-partículas artificiales atraviesen la pared celular y se acumulen en los tejidos, afectando las vías metabólicas en el citoplasma y en el núcleo celular. La comprensión de la interacción de las sustancias tóxicas (especialmente de los nano-materiales sintéticos) y su posible rol en la germinación de semillas es un tema de preocupación a nivel global. Desde 1990 se han propuesto test de germinación de semillas comparativos para la evaluación de fitotoxicidad de diversas fuentes. Se han hecho, entre otros, análisis de las aguas contaminadas por metales pesados usando test de germinación de semillas (Wang & Keturi, 1990) (Pirdosti, Movahedi, & Rostami, 2018).

La literatura relacionada al efecto que tienen las AgNPs (nanopartículas de plata) ha sido revisada (Tripathi, y otros, 2017). Dichos autores han mostrado que las mismas afectan importantes procesos metabólicos en las plantas. Aún quedan por describir detalladamente los efectos que producen sobre la germinación y así poder modelizar estas semillas y su germinación. Aquí se consideró a la germinación definida como la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla y que se corresponde con la fase temprana del complejo proceso de germinación que se observa por la ruptura de la testa (Bewley, Seed Germination and Dormancy, 1997), (Copeland & Mc Donald, 2001), (Weitbrecht, Müller, & Leubner - Metzger, 2011).

Se han determinado efectos macroscópicos perjudiciales ocasionados por nano-materiales que se manifiestan en inhibición del crecimiento de las plántulas y la floración (Rico, Majumdar, Duarte-Gardea, Peralta-Videa, & Gardea-Torresdey, 2011). Sin embargo, actualmente, no hay estudios concluyentes acerca de la fitotoxicidad de las nano-partículas. Se sabe que el cadmio (Cd) el cobre (Cu) y el plomo (Pb) se acumulan en las hojas, las flores de *R. sativus*, haciéndolas potencialmente tóxicas para los animales herbívoros y los polinizadores (Hladun, Parker, & Trumble, 2015). Previamente se ha descrito la presencia de plomo el que puede depositarse intracelularmente en las células de diversos tejidos de las plantas y de las semillas de *R. sativus* (Lane & Martín, 1982). El estrés abiótico producido por cobre en *R. sativus* está vinculado a la función reguladora de los brasinosteroides y las poliaminas (Choudhary, Oral, Bhardwaj, Yu, & Tran, 2012).

En este trabajo analizamos la morfología externa e interna de las semillas. Observamos la germinación con el objetivo de contribuir al establecimiento de un modelo de semillas para estudios de toxicidad de compuestos químicos y nano-partículas de plata a nivel local.

Otros autores también han usado las semillas de *Raphanus sativus* para la descripción de los efectos tóxicos que algunas sustancias químicas tienen para la germinación (Wu, Huang, Head, Chen, Kong, & Tang, 2012), (Husen & Siddiqi, 2014), (Siddiqi & Husen, 2017).

Si bien los porcentajes de germinación de *R. sativus* no se ven alterados por la presencia de nanocompuestos de plata en concentraciones menores que 500 mg/L, estos compuestos son fitotóxicos y afectan la elongación radicular y el contenido de agua así como inducen cambios conformacionales en carbohidratos, lignina y lípidos pudiendo tener un efecto deletéreo para la salud cuando se utilizan rabanitos contaminados en la dieta (Zuverza-Mena, Armendariz, Peralta -Videa, & Gardea -Torresdey, 2016), (Zuverza-Mena, y otros, 2017).

Raphanus sativus ha demostrado ser un alimento saludable en la dieta y la salud humana porque parece tener un efecto antidiabético debido a su capacidad para mejorar el mecanismo antioxidante y disminuir el estrés oxidativo (Banihani, 2017). *Raphanus sativus* es una especie que está siendo estudiada profusamente y que se está incorporando como modelo biológico en ciencia como queda en evidencia al consultar los trabajos científicos publicados por diversos autores (Kitashiba, y otros, 2014), (Nie, y otros, 2016).

MATERIAL Y MÉTODOS

Semillas

Las semillas utilizadas en este trabajo corresponden a *Raphanus sativus*, de la variedad Sparkler White tip. Se adquirieron en un comercio local: "La Germinadora" (<https://www.lagerminadora.com.ar/>). Las mismas provienen de cultivos realizados por productores locales pero originalmente fueron comercializadas y distribuidas por la semillería Guasch <https://guasch.com.ar/GuaschSemillas%C2%AE/Hortalizas/Rabanitos/SubFichas/73/Especies/0/1/>. Para medirlas, tomamos al azar 45 semillas secas de un paquete conteniendo 50 gramos de las mismas. Utilizamos un papel milimetrado sobre el cual las colocamos para observarlas y fotografiarlas. El valor promedio del ancho y largo se tomó como el resultado de la medida en milímetros del diámetro mayor y menor observados. Los valores se expresaron en milímetros como la media y su desvío estándar de acuerdo a las indicaciones de la bibliografía específica (Jaykaran, 2010).

Microscopía electrónica de barrido

Se observó la estructura de las semillas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) con un equipo de la marca Philips modelo XL Serie 30 del Sistema Nacional de Microscopía (SNM) dependiente del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Argentina). Las muestras, para microscopía electrónica, se procesaron deshidratándolas por sucesivos

pasajes en etanol (70; 80; 90 y 100%) y luego se transfirieron al secador de punto crítico para realizar la sustitución final con CO₂. Antes de realizar las observaciones y analizar las imágenes, las semillas se metalizaron con una mezcla de 60% de paladio y 40% de oro. Se obtuvieron fotomicrografías con magnificaciones de 32X y 150X.

Germinación

Para analizar la germinación de las semillas de *R. sativus* se observó la ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula en dos experimentos realizados por separado en las mismas condiciones con 50 semillas cada uno. El número total de semillas analizadas fue 50 x 2 (N=100) y se eligieron al azar de un grupo conteniendo al menos 1000 semillas.

Las semillas se trataron durante 20 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 20% para evitar la proliferación de microorganismos (hipoclorito de sodio 58grCl/l producto de venta libre que se usó diluido al 20% en agua). Luego se hicieron cinco lavados con agua destilada. Así tratadas se colocaron 10 semillas sobre papel Whatman N°1 en cada placa de Petri de 50 mm de diámetro. Se colocó 1 ml de agua destilada sobre el papel Whatman que se mantuvo húmedo. Por cada experimento se colocaron cinco placas de Petri con 10 semillas cada una en una cámara oscura teniendo especial cuidado con el mantenimiento de las condiciones de esterilidad para evitar la proliferación de microorganismos.

La temperatura de incubación utilizada fue de 22 ± 2 °C de acuerdo a las especificaciones técnicas recomendadas para *Raphanus sativus* en el ISTA - Handbook on Seedling Evaluation; Third Edition (Don, Kahlert, & McLaren, 2013). Las semillas se observaron a partir de las 12 hs. de imbibición durante los 7 días posteriores (168 horas) registrándose el número de semillas que mostraron ruptura de la cubierta seminal. Las semillas que mostraron ruptura de la cubierta seminal se contabilizaron como indicador positivo de germinación. Para la definición de germinación, proceso que incluye los eventos que comienzan con la captación de agua por parte de la semilla quiescente y termina con la elongación del eje embrionario, se ha tenido en cuenta la bibliografía clásica para el tema (Bewley & Black, Seeds - Physiology of Development and Germination, 1994). En este caso se trabajó con el concepto de “germinación visible” tal como lo han descripto dichos autores.

Se calculó el porcentaje de germinación como el número de semillas germinadas multiplicado por 100 y dividido por el número total de semillas tratadas. Para una primera evaluación del crecimiento radicular, las semillas se colocaron sobre papel milimetrado y se midieron las longitudes alcanzadas por las radículas (fig. 1b).

El agua utilizada durante este trabajo en los lavados de las semillas y la imbibición de las mismas fue agua purificada por destilación. Para determinar el grado de pureza, fue analizada mediante el uso del principio de espectroscopia de fluorescencia de rayos X de reflexión total (TXRF) con un equipo de la marca Bruker modelo S2 PICOFOX. Se hallaron bajas concentraciones de los siguientes elementos: Calcio (≤ 0.20 mg/L), Potasio (≤ 0.10 mg/L), Titanio (≤ 0.05 mg/L), Arsénico (≤ 0.01 mg/L), Cromo (≤ 0.01 mg/L), Cobre (≤ 0.01 mg/L), Hierro (≤ 0.01 mg/L), Manganeseo (≤ 0.01 mg/L), Níquel (≤ 0.01 mg/L), Rubidio (≤ 0.01 mg/L), Estroncio (≤ 0.01 mg/L), Vanadio (≤ 0.01 mg/L) y Zinc (≤ 0.01 mg/L).

El pH del agua utilizada fue de 6.7 ± 0.01 el cual se midió con un medidor de pH profesional de mesada. El valor del pH del agua utilizada, estuvo comprendido dentro del rango aceptado y que no afecta los resultados de la germinación en esta especie de acuerdo a las recomendaciones halladas en el ISTA - Handbook on Seedling Evaluation; Third Edition (Don, Kahlert, & McLaren, 2013).

Histología

Se preparó un fijador (FAA) con: formaldehído (Merck), alcohol etílico 96% (extra-neutro Porta), ácido acético (Cicarelli) y agua destilada en una proporción de 10:50:5:35. Se fijaron

semillas secas y semillas con 20 y 45 horas de imbibición. El volumen de fijador empleado fue aproximadamente igual o mayor a 10 veces el volumen aproximado del tejido vegetal que se debía fijar. Se conservaron fijadas a temperatura ambiente hasta su inclusión en parafina y corte histológico de 4 μm de espesor y luego se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los mismos se capturaron en imágenes con un microscopio óptico con magnificaciones de 40X y de 100X.

Para la descripción de las estructuras se utilizó la siguiente nomenclatura: *Ti* indica el tegumento interno (tegmen) y *Te* el tegumento externo o testa de la cubierta seminal (*Cs*). Se utilizó *Co* para indicar los cotiledones del embrión. Con *R* el tejido de la radícula. *E* señala la epidermis y *S* la sub-epidermis. *Pal* una capa de células pigmentadas que se organizan en empalizada y con *Par* se marca una capa de células parenquimatosas (se explica también en la leyenda de las figuras). La nomenclatura empleada es la que figura en la bibliografía correspondiente (Zeng, Wu, & Wang, 2006) (Di Santo, Cardinali, & Thevenon, 2012).

RESULTADOS

Morfología y Microscopía Electrónica de Barrido

Las semillas de *Raphanus sativus* variedad Sparkler White tip se caracterizan por tener forma esférica irregular u ovoide de aproximadamente 3 milímetros de diámetro. El color de la cubierta seminal está entre los pardos claros. La longitud media (y desvío estándar: SD) fue 3.11 (0.35) mm y el ancho medio (SD) de las semillas fue 2.59 (0.42) mm (fig. 1a).

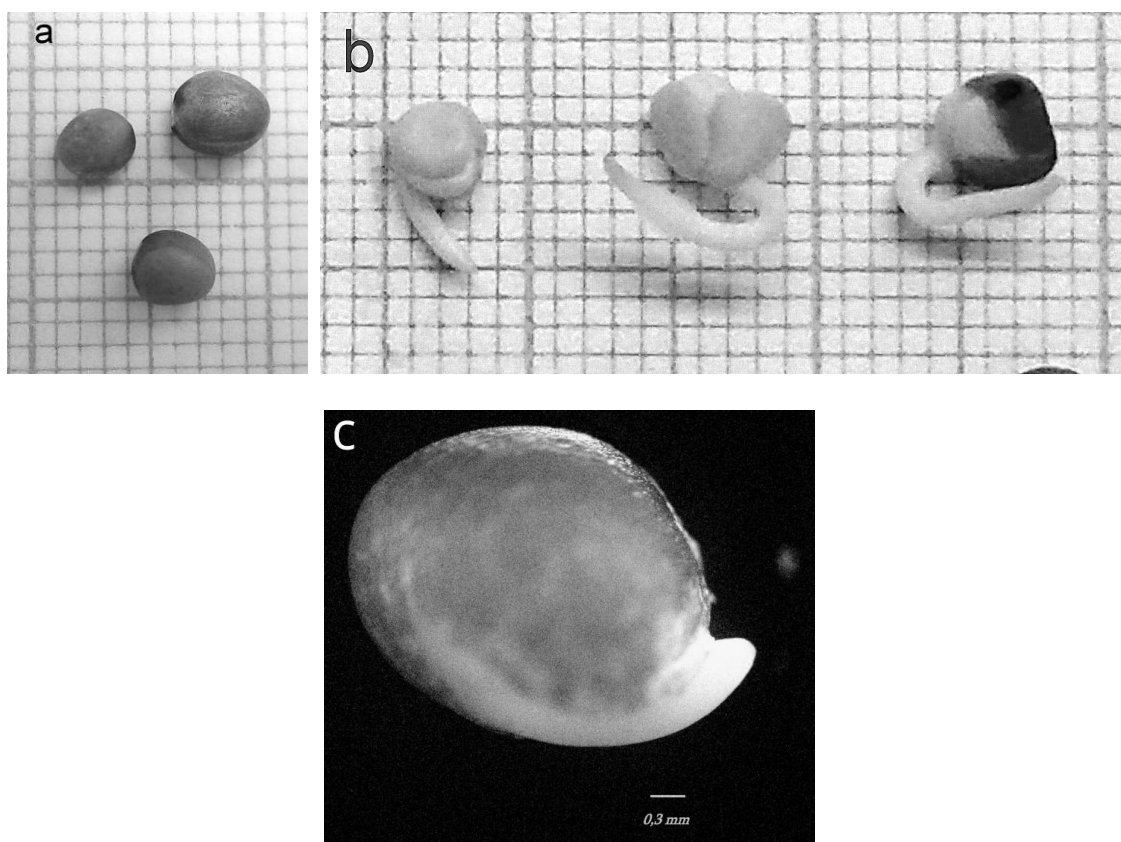


Fig. 1. a. Semillas secas de *Raphanus sativus*. b. Crecimiento de la radícula a las 48 horas de imbibición (22 ± 2 °C). c. Aspecto típico de una semilla de *Raphanus sativus* que ha roto la cubierta seminal con 20 horas de imbibición (magnificación 20X).

El análisis realizado por microscopía electrónica de barrido (MEB) permitió observar la morfología y el patrón de ornamentación de la cubierta seminal (*Cs*). La cubierta presenta un patrón básico de ornamentación en la superficie. Las semillas maduras y secas se caracterizaron por presentar una ornamentación que corresponde al denominado patrón de ornamentación reticulado según lo descrito por (Zeng, Wang, Liu, & Wu, 2004). Este es el patrón más común que presentan las semillas del género *Brassica* que pertenecen a la misma familia que *Raphanus sativus*: *Brassicaceae*. No presenta pelos seminales y toda la superficie es uniforme (fig. 2a y 2b).

Cubierta seminal (*Cs*) e Histología

La cubierta seminal es delgada (mide entre 40 y 50 micrones) y se desprende con facilidad al embeber las semillas. La observación del corte transversal de la semilla con MEB permite apreciar una lámina externa que corresponde a la presencia de mucílago (*m*), una epidermis/subepidermis (*E/S*) y una capa de células parenquimatosas (*Par*) (fig. 2c y 2d). En los cortes histológicos de la cubierta seminal se observan cuatro capas de células. En la zona externa la epidermis (*E*) y subepidermis (*S*) cuyas células presentan cierta dificultad para diferenciarlas. La parte interna está formada por una capa de células en empalizada pigmentada (*Pal*) y hacia el interior se presenta una capa parenquimatosa (*Par*) (fig. 3).

La ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula ocurren en las semillas a partir de las 20 horas de imbibición (fig. 1c) y a las 45 horas casi todas las semillas viables han germinado. En la figura 2e se muestra el detalle de los cotiledones (*Co*) la cubierta seminal (*Cs*) y la radícula en crecimiento (*R*). Las secciones longitudinales realizadas a través del extremo de la raíz de *R. sativus* a las 20 y 45 horas de imbibición muestran claramente la morfogénesis de los tejidos. En las imágenes obtenidas por MO (Microscopía óptica) las células de la radícula en crecimiento se observan de forma cilíndrica y vacuoladas (fig. 3d y 3e) mientras que el ápice meristemático (*am*) presenta células pequeñas con contenido denso y núcleos grandes. A su vez, el ápice meristemático se encuentra cubierto por la cofia (fig. 2e y 2f).

Germinación

A las 45 horas de imbibición, las semillas de *R. sativus* analizadas presentaron un 93% de germinación. (N=100). Las semillas que no presentaron ruptura de la cubierta seminal (N=7) hasta las 45 horas de imbibición tampoco mostraron signos de germinación a las 168 hs. (7 días). Se consideró que un 7% de las semillas resultaron inviables en las condiciones experimentales descritas debido a que no se observó la aparición de la radícula al finalizar la experiencia a las 168 horas. Observamos la longitud de la radícula alcanzada a las 45 horas de imbibición. En algunos casos la misma llegó a medir hasta 40 mm mientras que en otros sólo alcanzó los 2 mm (fig. 1b). Estas observaciones preliminares, indican que la muestra de semillas utilizadas presenta una gran heterogeneidad en relación a la velocidad de crecimiento de la radícula durante la primera semana de desarrollo.

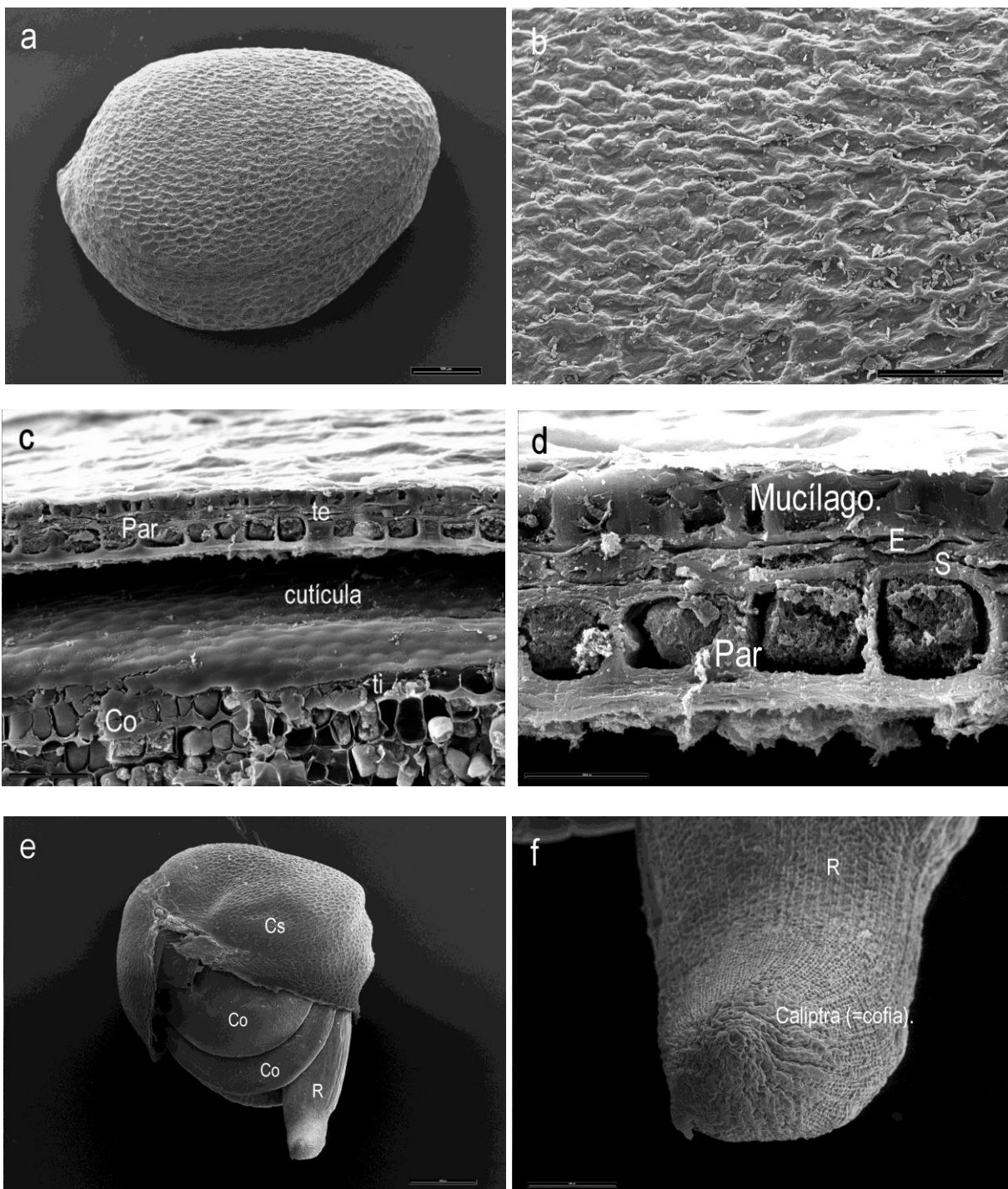


Fig. 2. a. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de una semilla de *Raphanus sativus* (escala = 500μm). b. Detalle de la superficie de la cubierta seminal de la semilla ilustrada en la figura 2a (escala= 200μm). c. Detalle del tegumento. Se observan el tegumento externo (te), el tegumento interno (ti), la cutícula y las células del tejido de los cotiledones (Co). Par= capa de células parenquimatosas. Escala= 50 μm). d. Detalle de la capa externa del tegumento E = Epidermis, S=Subepidermis, Par= capa de células parenquimatosas (escala= 0,02μm). e. Semilla de *Raphanus sativus* con 45 horas de imbibición (22 ± 2 °C) donde se observan claramente los cotiledones y la radícula emergida a través del tegumento. R= radícula, Co=cotiledones, Cs=cubierta seminal. Escala= 1×10^3 μm. f. Ápice de la radícula (R) en crecimiento (detalle de la radícula de la figura 2e).

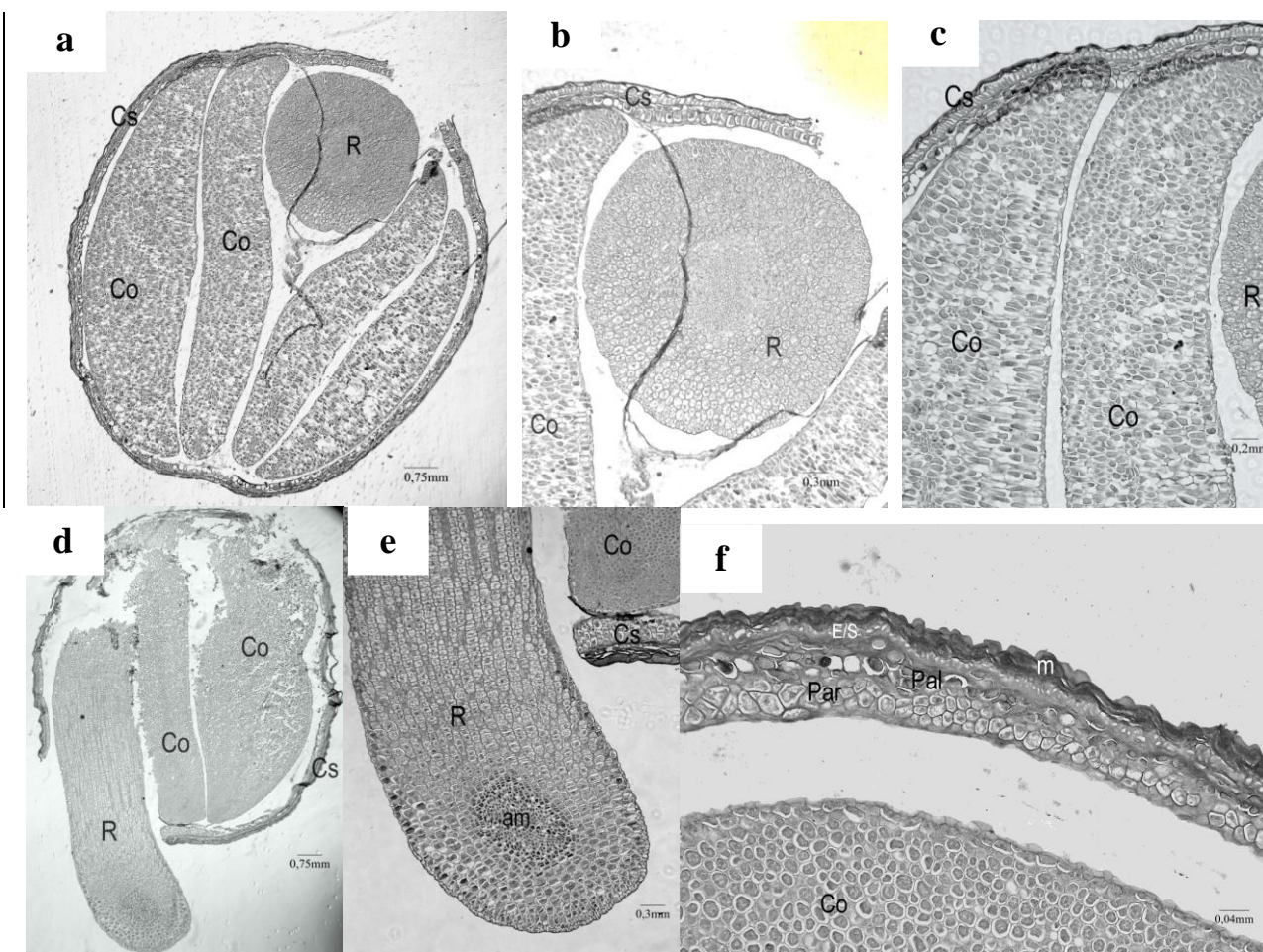


Fig. 3. a. Vista general en corte de la semilla luego de 20 horas de imbibición ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Se observa el embrión y el tegumento o cubierta seminal (CS). Del embrión se observan el tejido de la radícula (R) y los tejidos cotiledonales (Co). b. El mismo corte de la figura 3a mostrando en detalle la radícula en expansión emergiendo a través del tegumento seminal. c. Detalle del tejido de los cotiledones. d. Corte histológico donde se puede observar la radícula en crecimiento a las 45 horas de imbibición ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Co = cotiledones; R = radícula; Cs = Cubierta seminal. e. Detalle del tejido de la radícula en crecimiento de la figura 3d (Co = cotiledones; R = radícula; am = ápice meristemático; Cs = Cubierta seminal). f. Cubierta seminal en corte donde se observan las capas de células y el mucílago que las recubre (m = mucílago; E = epidermis; S = sub epidermis; Par = capa de células parenquimatosas; Pal = capa de células en empalizada pigmentadas; Co = tejido de los cotiledones).

DISCUSIÓN

Se halló una publicación donde se describen semillas adjudicadas a la misma especie: *Raphanus sativus* (Kasem, Ghareeb, & Marwa, 2011). Los autores informaron para las semillas colectadas en Egipto una medida de 0.8 x 1 mm con un aspecto de la cubierta seminal observado por MEB muy similar a la hallada en nuestra muestra de semillas. Es muy infrecuente que semillas de la misma especie muestren una diferencia de tamaño tan grande. Los factores que pueden influenciar el tamaño de las semillas son tanto genéticos como ambientales y en este caso nos resulta difícil explicar a qué se podría deber tal diferencia de tamaño.

El porcentaje de germinación hallado podría ser una subestimación de la viabilidad de estas semillas en comparación con otros casos como el de las semillas de Colombia. Esto podría deberse a factores endógenos de las semillas, a efectos ambientales de nuestras condiciones experimentales o a una sub estimación por la forma de observación empleada. La viabilidad podría estimarse de otro modo mediante el uso de otras técnicas con fines comparativos. Mediante el test de tetrazolio, algunos autores han señalado una viabilidad del 99% y 97% para las semillas de *Raphanus sativus* colectadas por ellos en Colombia (Salazar Mercado, Quintero Caleño, & Urbano, 2019). Dado que para realizar un test de germinación con el objetivo de establecer fitotoxicidad, las semillas se exponen a condiciones controladas, los posibles efectos de dormición de las semillas no afectarían los resultados de un test realizado con fines ecotoxicológicos. Creemos que habrá que refinar el modelo de semillas a utilizar para estudios futuros y avanzar en la caracterización genética de las mismas. Las semillas de *Raphanus sativus* pueden germinar fácilmente de acuerdo al método empleado en el presente estudio, en la oscuridad y con una temperatura de entre 20°C (mínima) y 24°C (máxima). En este trabajo la germinación se realizó en la oscuridad por lo cual las observaciones son independientes del posible efecto del estímulo lumínico. Hay autores que mencionan la existencia de fotoinhibición en la germinación en *R. sativus*. Se ha descrito que la luz tiene un efecto inhibitorio de la germinación en esta especie (Schopfer & Plachy, 1993); (Gül & Levent, 2008). Como se ha mencionado, recientemente en la literatura científica se ha demostrado que la luz redujo la germinación en semillas de *R. sativus* silvestres y la fotoinhibición persistió en semillas almacenadas en seco incluso después de 30 meses (Vercellino, Pandolfo, Cerrota, & Cantamutto, 2019). Por ello se conjetura que estas semillas sólo deben utilizarse para estudios de fitotoxicidad si se las somete a la oscuridad para la germinación.

Sethy & Ghosh (2013) analizaron los efectos deletéreos que tienen los metales pesados sobre las semillas y el proceso de germinación. Previamente Stanton (1984) había indicado que en semillas de *Raphanus sativus* silvestres, no hay una correlación sencilla entre el tamaño de las semillas el tiempo de germinación y la elongación radicular durante las primeras horas luego de la rotura de la testa. Se ha demostrado que el contenido de azúcares reductores aumenta en los cotiledones cuando la germinación de *R. sativus* ocurre en un ambiente iluminado (Huff & Ross, 1975). Las hormonas como ABA tienen efecto inhibitorio de la germinación en semillas de *Raphanus sativus* (Schopfer, Plachy & Frahy, 2001). Sin embargo la fisiología de la inhibición de la germinación, que sabemos está relacionada a los efectos de la luz y vinculada a "especies reactivas al oxígeno", no ha sido completamente descrita hasta el momento. Considerando que hay diversos factores moleculares que afectan a la germinación como por ejemplo quinasas que actúan como "checkpoint" o puntos de control del ADN y que los vínculos entre el "stress" genotóxico y el envejecimiento de las semillas son complejos (Waterworth, Footitt, Bray, Finch-Savage, & West, 2016) en este trabajo nos concentramos en hacer una observación preliminar de la germinación de las semillas a las cuales tenemos acceso localmente.

CONCLUSIONES

Este trabajo se realizó en el marco de un proyecto que tiene como objetivo la evaluación de efectos de toxicidad ocasionada por nano-partículas. Como resultado de las observaciones realizadas concluimos que las semillas de *Raphanus sativus* son útiles como biomarcadores de estrés en ecotoxicología debido a que tienen una alta viabilidad (alto porcentaje de germinación) y las características de su morfología como el tipo de superficie de la cubierta seminal son ideales para ser utilizadas tanto en test de germinación como en análisis de interacciones entre las semillas y las sustancias tóxicas. Por lo analizado en nuestro trabajo experimental y por las referencias bibliográficas halladas en la literatura científica como el trabajo de Kostka-Rick & Manning, (1993) concluimos que las semillas de esta especie son aptas para modelizar en estudios de ecotoxicología permitiendo la realización de un test en menos de 48 horas. Podríamos criticar la calidad o pureza genética del material utilizado, sin embargo se proyecta continuar con la caracterización genética de nuestro material de semillas que se encuentran disponibles a nivel local.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer especialmente a Fabián G. Tricárico a cargo del Servicio de Microscopia del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. También agradecemos muy especialmente a Beatriz G. Galati cuyas observaciones enriquecieron nuestro trabajo y a muchos otros colegas que desinteresadamente hicieron sus aportes para que este trabajo pueda ser comunicado. El trabajo se realizó sin financiación específica. Agradecemos al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por los recursos aportados para la realización del mismo.

LITERATURA CITADA

- Banihani, S. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and Diabetes. *Nutrients* , 9 (9), 1014.
- Baskin, J. M., & Baskin, C.C. (2004). A Classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* , 14: 1-16.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2005). Underdeveloped embryos in dwarf seeds and implications for assignment to dormancy class. *Seed Science Research* , 15, 357–360.
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, (American Society of Plant Physiologists). Vol. 9, 1055-1066.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds - Physiology of Development and Germination. *Springer Science & Business Media*. New York: Plenum Press. 445pp.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., & Delmer, D. P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* , 205, 1144 - 1147.
- Copeland, L. O., & Mc Donald, M. B. (2001). *Seed Germination. Chap. 5 In: Principles of Seed Science and Technology*. Boston, MA: Springer.pg.: 59-100
- Cheng, F., Liang, J., Cai, C., Cai, X., Wu, J., & Wang, X. (2017). Genome sequencing supports a multi-vertex model for Brassicaceae species. *Curr Opin Plant Biol* , 36, 79-87.
- Choudhary, S. P., Oral, H. V., Bhardwaj, R., Yu, J.-Q., & Tran, L. S. (2012). Interaction of Brassinosteroids and Polyamines Enhances Copper Stress Tolerance in *Raphanus sativus*. *Journal of Experimental Botany* , 63 (15), 5659-75.
- Di Santo, M. E., Cardinali, F. J., & Thevenon, M. A. (2012). Estudio anatómico y distribución de las reservas proteicas y lipídicas en semillas de diferentes tamaños de *Cuphea glutinosa* (Lythraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* , 47 (3-4), 341-350.

- Don, R., Kahlert, B., & McLaren, G. (2013). *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. Third Edition with amendments. Bassersdorf: International Seed Testing Association (ISTA), Germination Committee.-.
- Gül, E. O., & Levent, A. (2008). Determining the best sprouting conditions for germination of radish (*Raphanus sativus*) seeds consumed as vegetables. *Journal of food, agriculture & Environment* , 6 (1), 123-127.
- Hasterok, R., Wolny, E., Hosiawa, M., Kowalczyk, M., Kulak-Ksiazczyk, S., Ksiazczyk, T., Heneen, W.K.; Maluszynka, J. (2006). Comparative Analysis of rDNA Distribution in Chromosomes of Various Species of Brassicaceae. *Annals of Botany* , 97 (2), 205-216.
- Hladun, K. R., Parker, D. R., & Trumble, J. T. (2015). Cadmium, Copper, and Lead Accumulation and Bioconcentration in the Vegetative and Reproductive Organs of *Raphanus sativus*: Implications for Plant Performance and Pollination. *Journal of Chemical Ecology* , 41 (4), 386-395.
- Huff, A. K., & Ross, C. W. (1975). Promotion of Radish Cotyledon Enlargement and Reducing Sugar Content by Zeatin and Red Light1. *Plant Physiol* (56), 429-433.
- Husen, A., & Siddiqi, K. S. (2014). Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: characterization and application. *Journal of Nanobiotechnology* (12): 28.
- Jaykaran. (2010). “Mean \pm SEM” or “Mean (SD)”? *Indian Journal of Pharmacology* , 42 (5), 329.
- Kasem, W. T., Ghareeb, A., & Marwa, E. (2011). Seed Morphology and Seed Coat Sculpturing of 32 Taxa of Family Brassicaceae. *Journal of American Science* , 7 (2): 166-178.
- Kitashiba, H., Li, F., Hirakawa, H., Kawanabe, T., Zou, Z., Hasegawa, Y., Tonosaki, K., Shirasawa, S., Fukushima, A., Yokoi, S., Takahata, Y., Kakizaki, T., Ishida, M., Okamoto, S., Sakamoto, K., Shirasawa, K., Tabata, S., & Nishio, T. (2014). Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 21(5), 481–490
- Kostka-Rick, R., & Manning, W. J. (1993). Radish (*Raphanus sativus* L.): A model for studying plant responses to air pollutants and other environmental stresses. *Environmental Pollution* , 82 (2), 107-138.
- Lane, S. D., & Martín, E. S. (1982). An Ultrastructural Examination of Lead Localisation in Germinating Seeds of *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzensphysiol. Bd.* , 107 (1), 33-40.
- Mun, J. H., Chung, H., Chung, W. H., Oh, M., Jeong, Y. M., Kim, N., Ahn, B. O., Park, B. S., Park, S., Lim, K. B., Hwang, Y. J., & Yu, H. J. (2015). Construction of a reference genetic map of *Raphanus sativus* based on genotyping by whole-genome resequencing. *Theoretical and applied genetics (TAG)*. 128(2), 259–272.
- Nie, S., Li, C., Xu, L., Wang, Y., Huang, D., Muleke, E. M., Sun, X., Xie, Y., & Liu, L. (2016). De novo transcriptome analysis in radish (*Raphanus sativus* L.) and identification of critical genes involved in bolting and flowering. *BMC genomics* (17), 389.
- Pirdosti, K.M., Movahedi, Z., & Rostami, M. (2018). Effect of cadmium stress on morpho-physiological traits in garden cress and radish in an aeroponic system. *Iranian Journal of Plant Physiology* , 9 (1), 2591-99.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 59 (8), 3485-98.
- Salazar Mercado, S.A., Quintero Caleño, J. D., & Urbano, B. (2019). Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* , 15 (2), 7-15.
- Schopfer, P., Plachy, C. (1993). Photoinhibition of radish (*Raphanus sativus* L) seed germination: control of growth potential by cell-wall yielding in the embryo. *Plant, Cell and Environment* 16, 223-229.
- Schopfer, P., Plachy, C., & Frahy, G. (2001). Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin and Abscissic Acid. *Plant Physiology* , 125 (4), 1591-1602.

Recibido:
11/marzo/2020

Aceptado:
9/febrero/2021

- Sethy, S. K., Ghosh, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med.* 4 (2), 272-275.
- Siddiqi, K. S., Husen, A. (2017). Plant Response to Engineered Metal Oxide Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* , 12, 92.
- Stanton, M. (1984). Seed variation in Wild Radish: Effect of Seed Size on Components of Seedling and adult Fitness. *Ecology* , 65 (4), 1105-1112.
- Tanaka, Y., Tsuda, M., Yasumoto, K., Yamagishi, H., & Terachi, T. (2012). A complete mitochondrial genome sequence of Ogura- type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics* , 13, 352 - .
- Tricault, Y., Matejcek, A., Darmency, H. (2018). Variation of seed dormancy and longevity in *Raphanus raphanistrum* L. *Seed Science Research* , 28, 34-40.
- Tripathi, D.K., Tripathi, A., Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S.; Singh, V.K.; Mishra, R.K.; Upadhyay, R.G.; Dubey, N.K.; Lee, Y. & Chauhan, D.K.. (2017). Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants and Heterotrophic Microbes: A Concentric Review. *Front. Microbiol* , 8 (7).
- Vercellino, R. B., Pandolfo, C. E., Cerrota, A., Cantamutto, M.; Presotto, A. (2019). The role of light and the pericarpon on seed dormancy and germination in feral *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Weed Research* , 59 (5), 396-406.
- Wang, W., & Keturi, P. H. (1990). Comparative seed Germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water Air Soil Pollut* , 369-376.
- Waterworth, W. M., Footitt, S., Bray, C.M, Finch-Savage, W. E., & West, C. E. (2016). DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *PNAS* , 113 (34), 9647-9652.
- Weitbrecht, K.; Müller, K.; Leubner - Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot.* , 62 (10), 3289-309.
- Wu, S.G.; Huang, L.; Head, J.; Chen, D-R.; Kong, I. Ch.; & Tang, Y. J. (2012). Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles is Related to Both Dissolved Metals Ions and Adsorption of Particles on Seed Surfaces. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* (3), 126.
- Zeng, C. L.; Wang, J. B.; Liu, A. H.; Wu, X. M. (2004). Seed coat microsculpturing changes during seed development in diploid and amphidiploid Brassica species. *Annals of Botany* , 93 (5), 555-566.
- Zeng, C. L., Wu, X. M., & Wang, J. B (2006). Seed coat development and its evolutionary implications in diploid and amphidiploid Brassica species. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botánica* , 48 (2), 15-25.
- Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta -Videa, J. R., Gardea -Torresdey, J. L. (2016). Effects of Silver Nanoparticles on Radish Sprouts: Root Growth Reduction and Modifications in the Nutritional Value. *Frontiers in plant science* , 7 (90).
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernández-Viezcás, J. A., Bonilla-Bird, N., López-Moreno, M. L., Komárek, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses- A review. *Plant Physiol and Biochemistry* (110): 236-264.