



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN CIENCIAS AGRARIAS Y BIOECONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA - BIOLOGIA VEGETAL

***Efecto del envejecimiento sobre la estabilidad bioquímica
durante el almacenamiento de semillas de cebolla***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a: Durga Pérez Morales

Tutor/a: Sara Mira Pérez

Noviembre de 2023

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Evaluación de la calidad de las semillas almacenadas	8
1.2. Factores que afectan a la longevidad de las semillas y mecanismos de envejecimiento	10
1.3. Objetivos.....	12
2. MATERIAL Y MÉTODOS	13
2.1. Almacenamiento de semillas.....	13
2.1.1. Material Vegetal.....	13
2.1.2. Condiciones de almacenamiento de la semillas.....	13
2.2. Germinación y determinación de la pérdida de viabilidad de las semillas	15
2.3. Actividad enzimática	17
2.3.1. Extracción de proteína.....	17
2.3.2. Cuantificación de proteínas.....	18
2.3.3. Actividad enzimática de la Superóxido dismutasa.....	19
2.3.4. Actividad enzimática de la Catalasa.....	20
2.3.5. Actividad enzimática de la Glutación reductasa.....	21
2.4. Descripción del experimento	22

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. Pérdida de viabilidad	23
3.1.1. Determinación del contenido de agua.....	23
3.1.2. Germinación y determinación de la pérdida de viabilidad de las semillas.....	24
3.2. Actividad enzimática	33
3.2.1. Cuantificación de proteínas.....	33
3.2.2. Superóxido dismutasa.....	35
3.2.3. Actividad de la catalasa.....	37
3.2.4. Glutación reductasa.....	40
4. CONCLUSIONES	45
5. BIBIOGRAFÍA	47

APÉNDICE:

I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina sérica bobina)
CAT	Catalasa
F	Prueba F de Fisher
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GL	Grados de Libertad
GR	Glutación Reductasa
GSSG	Glutación disulfuro (<i>Glutathione disulfide</i>)
HR	Humedad Relativa
ISTA	<i>International Seed Testing Association</i>
ITC	<i>International Trade Centre</i>
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio (<i>Nitroblue tetrazolium</i>)
p	probabilidad ($0 \leq p \leq 1$).
ps	sobre peso seco
R ²	Coefficiente de correlación
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
TMG	Tiempo Medio de Germinación
SC	Suma de los Cuadrados
SOD	Superóxido Dismutasa
wc	contenido de agua (<i>water content</i>)

RESUMEN

Durante el almacenamiento, las semillas se ven afectadas por una serie de factores fisiológicos, genéticos y ambientales que contribuyen al envejecimiento de las semillas y por consiguiente a la pérdida de calidad de las mismas. En el presente trabajo se han observado los cambios bioquímicos que se producen en semillas de *Allium cepa* L. almacenadas en dos contenidos de agua (14 y 8% sobre peso seco) a 35 °C. Se ha estudiado la viabilidad de las semillas y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión reductasa (GR) en diferentes etapas del envejecimiento.

Los resultados obtenidos indican que la actividad de las enzimas SOD y CAT no se vio afectada por el tiempo de almacenamiento en condiciones húmedas, al contrario de la GR, donde se observaron diferencias significativas. Por otro lado, la actividad de la CAT y GR se vio influenciada por el tiempo de almacenamiento en condiciones secas. Se evidenció que cuando la viabilidad de las semillas disminuyó hasta un 25%, se produjo un cambio bioquímico que resultó en un aumento en la actividad de CAT y GR. Por último, la actividad enzimática de SOD experimentó un aumento significativo en condiciones húmedas en todos los períodos de almacenamiento en comparación con el almacenamiento en seco. En el caso de la CAT, se observó un incremento en condiciones húmedas en comparación con las condiciones secas, especialmente en lotes de semillas que habían alcanzado un P50, lo que indica una reducción del 50% en su viabilidad. Estos hallazgos resaltan la relevancia de las condiciones de humedad durante el almacenamiento y la existencia de mecanismos de envejecimiento distintos en condiciones húmedas y secas.

ABSTRACT

During storage, seeds are affected by a number of physiological, genetic and environmental factors that contribute to seed aging and consequently to the loss of seed quality. In this work, the biochemical changes that occur in seeds of *Allium cepa* L. stored in two water contents (14 and 8% on dry weight) at 35 °C have been observed. Seed viability and the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) were studied at different stages of aging.

The results obtained show that the activity of SOD and CAT enzymes was not affected by storage time under wet conditions, in contrast to GR, where significant differences were observed. On the other hand, the activity of CAT and GR was influenced by storage time under dry conditions. It was evidenced that when seed viability decreased up to 25%, a biochemical change occurred resulting in an increase in CAT and GR activity. Finally, SOD enzyme activity experienced a significant increase under wet conditions in all storage periods compared to dry storage. In the case of CAT, an increase was observed under wet conditions compared to dry conditions, especially in seed lots that had reached P50, indicating a 50% reduction in viability. These findings highlight the relevance of moisture conditions during storage and the existence of different aging mechanisms under wet and dry conditions.

1. INTRODUCCIÓN

Allium cepa L., la cebolla, es una especie vegetal monocotiledónea de la familia Amaryllidaceae. Planta herbácea de ciclo bienal, se cultiva anualmente cuando se aprovecha el bulbo y como bienal cuando se quiere obtener semilla. Es una planta que se encuentra entre las más antiguas cultivadas por el hombre, ya que se cultiva desde hace más de 5000 años. Los registros más antiguos proceden de Egipto, donde fue introducida por las primeras dinastías (3200-2780 a.C) (MAPA).

A nivel mundial, la cebolla se encuentra entre uno de los cultivos hortícolas más importantes, con una producción total de más de 106 millones de toneladas en el año 2021 (FAOSTAT). Actualmente, España ocupa el puesto número 17 a nivel mundial con una producción de más de 1,2 millones de toneladas de cebollas totales en el año 2022 (MAPA). En relación con el comercio exterior, España es un país mayoritariamente exportador, con un volumen de exportación en 2022 de unas casi 491 000 toneladas, ocupando el cuarto puesto después de China, India y Países Bajos (ITC), siendo el mercado tradicional la Unión Europea a las que envían más del 96% de la cebolla exportada (MAPA).

En España, dentro de los cultivos hortícolas, la cebolla es el tercer cultivo con mayor producción después del tomate y el pimiento y el quinto en cuanto a superficie cultivada, con más de 23.000 hectáreas en el año 2022, cultivadas en su mayoría en regadío y al aire libre (MAPA). En España, las variedades de cebolla más cultivadas son las de tipo Babosa, Valenciana, Liria, Grano de oro y Recas, variedades originarias de la región de Levante cuyo cultivo se ha extendido por sus buenas características: precocidad, gran rendimiento, relativamente dulces en sabor, buena resistencia a la subida a flor y buena aptitud para la conservación del bulbo. La consecuencia de ello es que esas cinco

variedades representan el 80-85 % de las variedades de cebolla cultivadas en España (Carravedo and Mallor, 2007).

La propagación por semillas es el medio más común de multiplicación de especies vegetales anuales o bienales como la cebolla, teniendo la ventaja de ser el método de multiplicación menos costoso. Sin embargo, las semillas de los cultivos hortícolas tienen precios elevados y han sufrido un incremento considerable en los últimos años debido a la situación económica mundial y al aumento del coste de la energía (Wageningen Centre for Development Innovation, 2020). Además, distintas predicciones auguran una subida del precio de las semillas de cebolla en los próximos años (Straitresearch, 2023; Eastfruit, 2023).

Para que la propagación por semillas sea exitosa es necesario que la semilla almacenada no pierda calidad con el tiempo. La longevidad de las semillas durante el almacenamiento es además crucial para la conservación a largo plazo de variedades en bancos de semillas. En el caso de cebolla, *Allium cepa* es una especie cuyas semillas se conoce que tienen una baja longevidad en bancos de semillas (Walters et al., 2005). Esta especie tiene una amplia representación en las colecciones de germoplasma del Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF-INIA) (<http://wwwx.inia.es/coleccionescrf>) y en los últimos trabajos de control periódico de viabilidad se ha podido constatar que algunas accesiones de cebolla han sufrido descensos importantes de germinación a lo largo de tres décadas de conservación (Martín et al., 2014). En almacenes agrícolas y semilleros, las semillas de cebolla se pueden almacenar por un periodo máximo de un año antes de que reduzcan su viabilidad significativamente, y las fluctuaciones en temperatura y humedad relativa, sobre todo las altas temperaturas y humedades durante el almacenado, son causa principal de su mala capacidad de almacenamiento (Thirusendura Selvi and Saraswathy, 2018; Brar et al., 2019; Kumar et al., 2021). Es por ello que conocer cuándo las semillas

empiezan a deteriorarse durante su almacenamiento es de gran relevancia para los productores de semillas y para la conservación del germoplasma. La baja longevidad de las semillas de cebolla y su pérdida de viabilidad durante el almacenamiento supone pérdidas económicas debido a la necesidad de controles de germinación, práctica habitual tanto en bancos de semillas como en empresas productoras de semillas y en semilleros, que son muy costosas tanto económicamente como en tiempo y personal (Contreras, 2002). Además, cuando las semillas almacenadas han perdido viabilidad, la regeneración de esta especie es costosa y complicada por su polinización cruzada y por el inconveniente adicional de ser una planta bienal que requiere dos ciclos de cultivo para la obtención de semillas.

Por lo tanto, la disponibilidad de semillas de alta calidad es importante para todos los sectores de la agricultura, siendo crucial asegurar la viabilidad de las semillas almacenadas de manera que se mantenga su germinación y una correcta evolución de las plántulas. Este trabajo estudia la pérdida de viabilidad de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) a lo largo del tiempo de almacenamiento y evalúa distintos parámetros germinativos y bioquímicos durante el envejecimiento.

1.1. Evaluación de la calidad de las semillas almacenadas

El mantenimiento de la calidad de las semillas durante el almacenamiento es muy importante para la producción de cultivos agrícolas y hortícolas. La calidad de la semilla reúne rasgos importantes que definen el rendimiento germinativo de un lote de semillas y la longevidad. Las características que definen el grado de excelencia en el rendimiento germinativo de las semillas incluyen: alto porcentaje de germinación final, germinación rápida y simultánea, y producción de plántulas normales (Finch-Savage y Bassel, 2016).

Identificar los parámetros óptimos de medición del rendimiento germinativo es, pues, crucial para la evaluación de la calidad de semillas almacenadas.

Las normas internacionales de conservación de bancos de semillas establecen que las semillas deben tener una germinación inicial $\geq 85\%$ para la mayoría de las especies cultivadas (FAO, 2014). También se establece que cuando una accesión de semillas reduzca su viabilidad por debajo del 85% debe ser regenerada. Las semillas viables son aquellas que son capaces de producir plántulas normales en un ensayo de germinación bajo condiciones favorables (ISTA, 2003). Los ensayos de germinación realizados en condiciones controladas de humedad, temperatura, aireación e iluminación constituyen el método mejor conocido y más comúnmente empleado para estimar la viabilidad de un lote de semillas almacenadas (Durán e Hier, 1993).

La *International Seed Testing Association* (ISTA, 2003) considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación. La primera expresión de este proceso suele ser la emergencia de la radícula. En los ensayos realizados para comprobar el poder germinativo de las semillas se pretende, ante todo, conocer el valor potencial de éstas para la siembra. Así, la germinación queda definida como la capacidad de nascencia y desarrollo que presentan las semillas para transformarse en plántulas normales, con todas sus estructuras esenciales, cuando se las somete a determinadas condiciones favorables para su crecimiento, demostrando capacidad de producción (Lovato 1981).

La germinación de las semillas es un proceso dinámico que para ser caracterizada en profundidad requiere tener en cuenta distintos parámetros cuantitativos que permitan la medición del tiempo, la velocidad, la sincronía y la homogeneidad del

proceso (Baskin y Baskin 2014). Estos parámetros caracterizan, pues, lo que denominamos vigor de un lote de semillas. Para calcularlos se utilizan distintas expresiones matemáticas que pueden tener en consideración factores como el porcentaje de germinación final, el tiempo necesario para la germinación o velocidad de germinación y su homogeneidad. Identificar los parámetros que mejor caracterizan la calidad de un lote de semillas debe ajustarse a cada especie, y existe cierta controversia sobre cuales deberían utilizarse para determinar el vigor y la velocidad de germinación (Soltani et al., 2015).

1.1. Factores que afectan a la longevidad de las semillas y mecanismos de envejecimiento

La longevidad de las semillas es un rasgo importante de la calidad de las semillas que se define como el intervalo de tiempo durante el cual las semillas son capaces de mantener su viabilidad (Arc et al., 2011; Hay et al., 2019). El envejecimiento de las semillas durante el almacenamiento se ve afectado por el contenido de humedad y la temperatura, pero también por la calidad inicial de la semilla y sus características genéticas y fisiológicas (Ellis y Roberts, 1981; Walters, 1998). Sin embargo, la relación entre la longevidad de las semillas, la temperatura y la humedad es compleja y, en consecuencia, predecir la combinación óptima de condiciones de almacenamiento, así como la longevidad que tendrá un lote de semillas durante el almacenamiento, resulta difícil (Walters et al., 2005; Probert et al., 2009; Mira et al., 2015).

En general, el envejecimiento de las semillas provoca un deterioro progresivo de su calidad: en muchas especies al principio se observa como un retraso en la velocidad de germinación, más tarde como una pérdida de viabilidad y vigor, hasta que conduce a la

muerte de todas las semillas del lote (Argerich et al., 1989; Ratajczak et al., 2019). Este proceso degenerativo natural e irreversible se produce con el paso del tiempo, incluso en condiciones óptimas de almacenamiento.

Numerosos cambios fisiológicos y bioquímicos se han asociado con el envejecimiento de las semillas, siendo el principal causante la peroxidación lipídica y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que desencadena daños oxidativos y cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes (Kibinza et al., 2006; Kranner et al., 2010; Mira et al., 2010). La reducción en el rendimiento germinativo de las semillas de cebolla ha sido atribuida a una composición química con un alto contenido de lípidos (22-26%) que favorece una mayor peroxidación lipídica y acumulación de ROS (Amalfitano et al., 2019).

En las plantas, las ROS desempeñan un papel ambivalente. Por un lado, tienen un papel importante en las redes de señalización que controlan procesos como la germinación, el crecimiento, y el alivio de la dormición de las semillas (Foyer y Noctor, 2005; El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; Kumar et al., 2015). Por otro lado, la acumulación de ROS se asocia con frecuencia a los procesos de deterioro de las semillas, ya que interaccionan con biomoléculas celulares y provocan graves daños oxidativos en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Halliwell et al., 2015).

En tejidos sanos, los efectos dañinos de las ROS son neutralizados por el sistema antioxidante enzimático, principalmente catalasa (una de las principales vías de eliminación intracelular de H_2O_2), superóxido dismutasa (SOD), y glutatión reductasa (GR) (Bailly, 2004; Kranner et al., 2006). La SOD cataliza la conversión del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, la CAT convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, y la GR cataliza la reducción del glutatión oxidado con la

respectiva oxidación del NADPH a NADP⁺. Cuando comienzan los procesos de envejecimiento, la acumulación de ROS puede ser equilibrada y controlada por el sistema antioxidante enzimático; pero cuando el envejecimiento ya se encuentra en una fase avanzada, el sistema antioxidante enzimático falla, la acumulación de ROS aumenta, y conduce a daños en los constituyentes celulares y a la reducción de la viabilidad de las semillas (Merritt et al., 2003; Mira et al., 2011). Estudiar la actividad de los enzimas antioxidantes en semillas de cebolla nos permitirá caracterizar los procesos bioquímicos que se producen durante el almacenamiento e identificar marcadores de envejecimiento.

1.2. Objetivos

En este trabajo se pretende determinar el efecto del almacenamiento en la viabilidad de las semillas y en su estrés oxidativo. Se desarrollarán dos objetivos específicos. El primero de ellos es (1) el estudio de la influencia de las condiciones de humedad durante el almacenamiento en la pérdida de viabilidad de las semillas. Y el segundo objetivo es (2) estudiar los cambios bioquímicos producidos durante el almacenamiento de semillas debido al envejecimiento. Para ello se trabajará con semillas de la especie *Allium cepa*, como especie de interés por su baja longevidad y sus problemas de conservación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Almacenamiento de semillas

2.1.1. Material Vegetal

Los experimentos se llevaron a cabo con semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) variedad Cebolla Babosa Valenciana Temprana proporcionada por Semillas Fitó (Barcelona, España). Las semillas se almacenaron a 4 °C, en condiciones de baja humedad (7% HR, contenido de agua $4,3 \pm 0,0\%$ sobre peso seco) y oscuridad hasta su uso. Estas semillas se utilizaron como control en todos los experimentos.

2.1.2. Condiciones de almacenamiento de las semillas

Los experimentos consistieron en ajustar el contenido de agua de las semillas, sellarlas en sobres de aluminio herméticos y almacenarlas a 35 °C. El contenido de agua de las semillas se ajustó equilibrándolas en una atmósfera controlada mediante una solución saturada de NaCl (75% HR) (ambiente húmedo) o MgCl₂ (33% HR) (ambiente seco) a 20 °C (Rockland, 1960; Vertucci y Roos, 1993; Mira et al., 2015) (Figura 1). El equilibrado de las semillas se controló periódicamente utilizando el peso fresco, y se consideró que las semillas estaban equilibradas a una humedad relativa determinada cuando el peso se mantenía estable en el tiempo. El tiempo de equilibrado fue de 4 días en 75% HR y de 10 días en 33% HR.

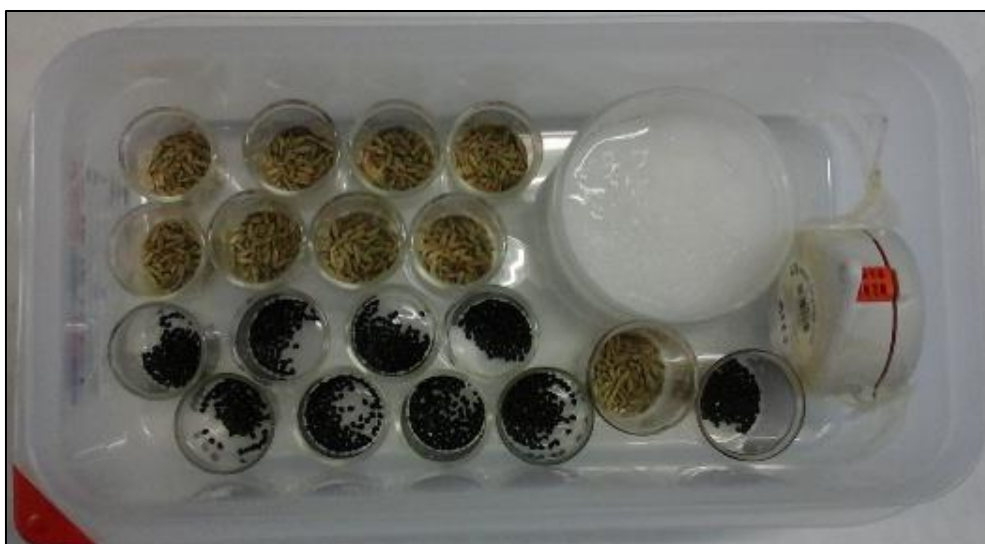


Figura 1. Muestras de semillas de cebolla (y centeno) durante el equilibrado en una atmósfera controlada mediante una solución saturada de NaCl (75% HR) a 20°C.

Tras el equilibrado, las distintas muestras de semillas se sellaron en sobres herméticos de 125 μm de espesor de capas de poliéster, aluminio y polietileno (S-156, Valsem Industries SAS, Lachelle, Francia) utilizando un termosellador Audionvac VMS 123 (Audion Elektro) (Figura 2).



Figura 2. Termosellado hermético de sobres de aluminio para el almacenamiento de semillas de cebolla.

El experimento se inició almacenando los sobres de aluminio con muestras de semillas en una cámara a 35 °C. En periodos de tiempo que se establecieron en función de la viabilidad esperada para cada tratamiento, las semillas almacenadas fueron sometidas a test de viabilidad mediante pruebas de germinación y ensayos bioquímicos

de la actividad de distintas enzimas antioxidantes. Para ello se utilizaron dos réplicas (dos sobres) por cada condición de almacenamiento (humedad y tiempo de almacenamiento).

Para comprobar que los sobres termosellados mantenían su hermeticidad durante todo el experimento de almacenamiento, se evaluó el contenido de agua de las semillas al inicio del experimento y periódicamente durante el tiempo de almacenamiento. El contenido de agua (wc) se determinó por comparación del peso de la muestra antes y después del secado (peso seco, ps) a 103°C a 17 h (ISTA, 2017), con 2 réplicas y se expresa como porcentaje sobre ps.

2.2. Germinación y determinación de la pérdida de viabilidad de las semillas

Durante el almacenamiento de las semillas se testó periódicamente la germinación para evaluar la pérdida de viabilidad. Para ello, a distintos tiempos se extrajeron del almacenamiento dos sobres de aluminio y 50 semillas de cada sobre se utilizaron en dos repeticiones de germinación. Se obtuvieron así 4 réplicas de 25 semillas para cada tiempo de almacenamiento evaluado. Cada réplica de germinación consistió en 25 semillas sembradas en placas Petri de 15 cm de diámetro sobre dos discos de papel de filtro con 10 ml de agua destilada (Figura 3). El ensayo de germinación duró 21 días. Los papeles de filtro se rehumedecieron regularmente con agua destilada según fuera necesario. Las condiciones de incubación fueron de 20 °C con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, proporcionado por tubos fluorescentes blancos fríos con una irradiancia de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La emergencia de la radícula se consideró el criterio de germinación.

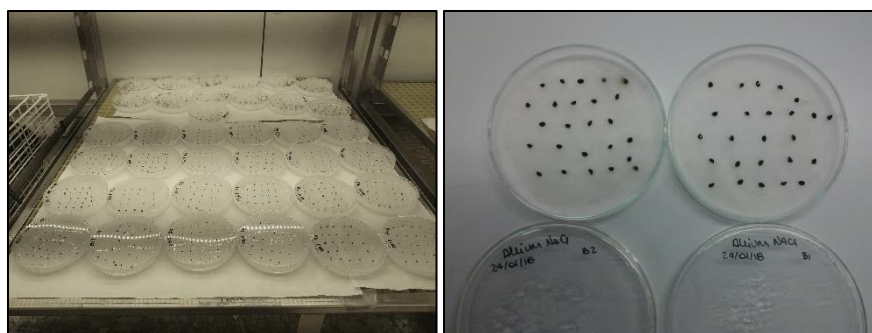


Figura 3. Ensayos de germinación de semillas de cebolla a 20°C y 16/8h fotoperiodo.

Las curvas de pérdida de viabilidad de las semillas en términos de porcentaje de germinación como respuesta al tiempo de almacenamiento se modelaron utilizando la función glm con una distribución binomial disponible en el paquete estadístico R (Core Team R, 2020). Se determinaron los tiempos para que el porcentaje de germinación disminuyera hasta el 75%, 50% y 25% de la germinación máxima (es decir, P75, P50, P25) para cada humedad de almacenamiento utilizando la función dose.p disponible en R. Se utilizó ANOVA para comparar las curvas de pérdida de viabilidad con el estadístico de prueba para las pruebas F. Se estudiaron tres etapas de deterioro P75, P50, P25, ya que P75 marca aproximadamente el final de la etapa asintótica de la curva de pérdida de viabilidad inversa-sigmoidal, P50 es el parámetro utilizado habitualmente para comparar la longevidad entre tratamientos o especies, y P25 indica el final de la fase de mortalidad rápida.

La velocidad de germinación de las semillas almacenadas se calculó mediante distintos parámetros (Soltani et al. 2015). Se calculó el tiempo medio de germinación (TMG) según la fórmula de Ellis y Roberts (1980): $\sum(n,t) / \sum n$; donde t es el tiempo desde el inicio del ensayo de germinación en términos de horas, y n es el número de semillas recién germinadas en el tiempo t . Se determinaron el tiempo necesario para que la germinación acumulada alcance el 50% de su máximo (T50 max), así como el tiempo que

tardan las semillas en alcanzar el 50% el 20% exacto de germinación (T50 y T20); utilizando el paquete “drc” disponible en R (Ritz et al. 2015; R core Team 2020).

2.3. Actividad enzimática

2.3.1. Extracción de proteínas

Se realizó una extracción de proteínas de semillas a distintos tiempos de almacenamiento para evaluar la actividad enzimática durante la pérdida de viabilidad. Para ello, a distintos tiempos se extrajeron del almacenamiento dos sobres de aluminio y de cada sobre se realizaron dos repeticiones de extracción de proteínas. Se obtuvieron así cuatro réplicas de extracción de proteínas para cada tiempo de almacenamiento estudiado.

La extracción de proteínas se realizó según el protocolo establecido por Bailly y Kranner (2011). Para ello, 0,2 g de semillas (unas 60 semillas) se molieron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 0,5 g de Polivinilpolipirrolidona y 5 ml de tampón fosfato potásico (0,1 M, pH 7,8) con 2 mM de ditioneitol (Sigma), 0,1 mM de EDTA (Sigma) y 1,25 mM de polietilenglicol 4000 (Sigma) mezclados primero manualmente durante 5 min y posteriormente mediante vórtex durante 1 min. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 8.000 x g durante 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes resultantes se filtraron a través de columnas Sephadex™ G-25 M (GE Healthcare). Los extractos de proteínas se almacenaron a -20 °C.

2.3.2. Cuantificación de proteínas

El contenido proteínico de los extractos se determinó mediante el método Bradford desarrollado en 1976. Se utilizó el reactivo Coomasie, que se obtuvo diluyendo 50 ml de reactivo concentrado (5x, BioRad) en 200 ml de agua destilada. Se disolvió la mezcla en un vaso de precipitados mediante agitación en oscuridad y finalmente se filtró con dos papeles filtro y un embudo, en una campana de gases en oscuridad para posteriormente guardarlo a 4°C. Diariamente se determinó la absorbancia del reactivo Coomasie preparado para asegurar su estado.

La albúmina sérica bovina (BSA) se utilizó para elaborar la curva patrón, curva necesaria para poder calcular posteriormente la concentración de proteínas de nuestras muestras. Las muestras de la curva patrón utilizada se muestra en la Tabla 1.

Para la cuantificación de proteínas se utilizaron 1000 µl de Coomasie y 20 µl de las muestras a cuantificar. Se determinó la cantidad de proteínas en dos réplicas por muestra. En el caso de las extracciones de semilla de cebolla almacenadas, para cada tiempo de almacenamiento estudiado se evaluó la cantidad de proteínas de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto.

Se determinó de la absorbancia de las soluciones un espectrofotómetro Thermo Scientific BioMate 3S a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó como blanco de todas las medidas el buffer utilizado en la extracción de proteínas.

Tabla 1. Cálculo del volumen a utilizar de la proteína patrón (albúmina sérica bovina, BSA) y otras medidas relacionadas para la realización de la curva patrón.

Muestra	Concentración inicial BSA (mg/ml)	Volumen BSA (µl)	Volumen diluyente (µl)	Volumen final (µl)	Concentración final BSA (mg/ml)
0	-	-	20	0	0
1	2	20	0	20	2,0
2	2	15	5	20	1,5
3	2	10	10	20	1,0
4	2	5	15	20	0,5
5	2	2	18	20	0,2

2.3.3. Actividad enzimática de la Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se midió a partir del protocolo de Bailly y Kranner (2011) modificado. La mezcla de reacción para la medida de SOD contenía 1,2 µM de riboflavina, 11,9 mM de metionina, 60 µM de nitroazul de tetrazolio (NBT) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8), en un volumen final de reacción de 3,15 ml. Se añadieron 200ul del extracto de proteínas.

Las muestras se incubaron a 25 °C con iluminación fluorescentes con una irradiancia de 35 µmol m² s⁻¹. Muestras incubadas en oscuridad sirvieron como blancos. Tras 15 minutos de iluminación, se midió la absorbancia a 560 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific BioMate 3S. Una unidad de SOD se definió como la actividad enzimática que inhibe la fotorreducción de NBT a formazán azul en un 50%. La actividad de SOD se expresa como unidades SOD * mg proteína⁻¹. Para cada tiempo de almacenamiento estudiado se evaluó la actividad de SOD de tres extractos distintos

con una réplica por extracto. Los datos se sometieron a una comparación estadística ANOVA (Modelo Lineal General, SPSS v29).



Figura 4. Ensayos de determinación de la actividad enzimática de SOD en extractos de proteínas obtenidos de semillas de cebolla almacenadas en distintas condiciones.

2.3.4. Actividad enzimática de la Catalasa

La actividad de la catalasa se determinó siguiendo el protocolo de Bailly y Kranner (2011). El ensayo enzimático contenía 3.125 mM de H_2O_2 en tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), en un volumen final de reacción de 1 ml. Se ajustó la concentración de proteína a $0,175 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La actividad catalasa se estimó por la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a 240 nm. Los resultados se expresaron como actividad específica, es decir, como $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ descompuesto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$. Para cada tiempo de almacenamiento estudiado se evaluó la actividad de CAT de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto. Los datos se sometieron a una comparación estadística ANOVA (Modelo Lineal General, SPSS v29).

2.3.5. Actividad enzimática de la Glutación reductasa

La actividad de glutación reductasa se determinó mediante el protocolo de Morscher et al. (2015). La mezcla de reacción para la medida de SOD contenía 1,2 μM de riboflavina, 11,9 mM de metionina, 60 μM de nitroazul de tetrazolio (NBT) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8), en un volumen final de reacción de 810 μl . Se ajustó la concentración de proteína a 0,131 mg * ml⁻¹

La actividad enzimática se estimó siguiendo la tasa de oxidación de NADPH registrando el descenso de la absorbancia del NADPH a 340 nm durante 7 minutos por espectrofotometría. Para cada tiempo de almacenamiento estudiado se evaluó la actividad de GR de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto. Los datos se sometieron a una comparación estadística ANOVA (Modelo Lineal General, SPSS v29).

2.4. Descripción del experimento

Las semillas de cebolla se equilibraron en dos condiciones diferentes de humedad relativa (75% y 33% HR, a 20 °C) y se almacenaron a 35 °C (Figura 5). Estas semillas posteriormente se han utilizado para evaluar la viabilidad mediante ensayos de germinación y para extraer proteínas con el fin de determinar la actividad de las enzimas CAT, SOD y GR en diferentes etapas durante el envejecimiento.

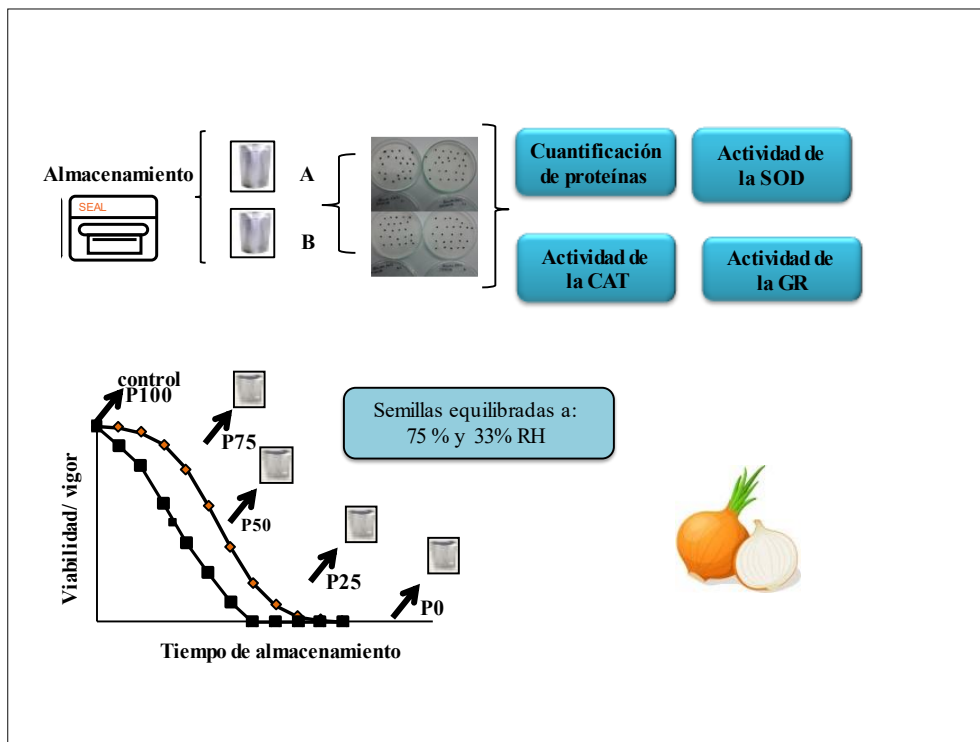


Figura 5: Esquema del experimento realizado en este Trabajo Final de Grado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Pérdida de viabilidad

3.1.1. Determinación del contenido de agua

Las semillas de *Allium cepa* equilibradas a 75% HR (ambiente húmedo) alcanzaron un contenido de agua medio del $14,0 \pm 0,4\%$ ps (Figura 6, Tabla 2). El contenido de agua de las semillas no varió significativamente durante el tiempo de almacenamiento (hasta 32 días) y se mantuvo entre 13 - 16% ps.

En el caso de las semillas equilibradas a 33% HR (ambiente seco) alcanzaron un contenido de agua del $7,5 \pm 0,1\%$ ps (Figura 7, Tabla 2). Como observamos en la figura 7, el contenido de agua de las semillas se mantuvo entre los valores 7-8% ps durante todo el tiempo de almacenamiento (hasta 1507 días).

Por lo tanto, no se observaron cambios en el contenido de agua a lo largo del tiempo de almacenamiento en las condiciones estudiadas, lo que indica que los sobres de aluminio permanecieron herméticamente cerrados durante todo el ensayo.

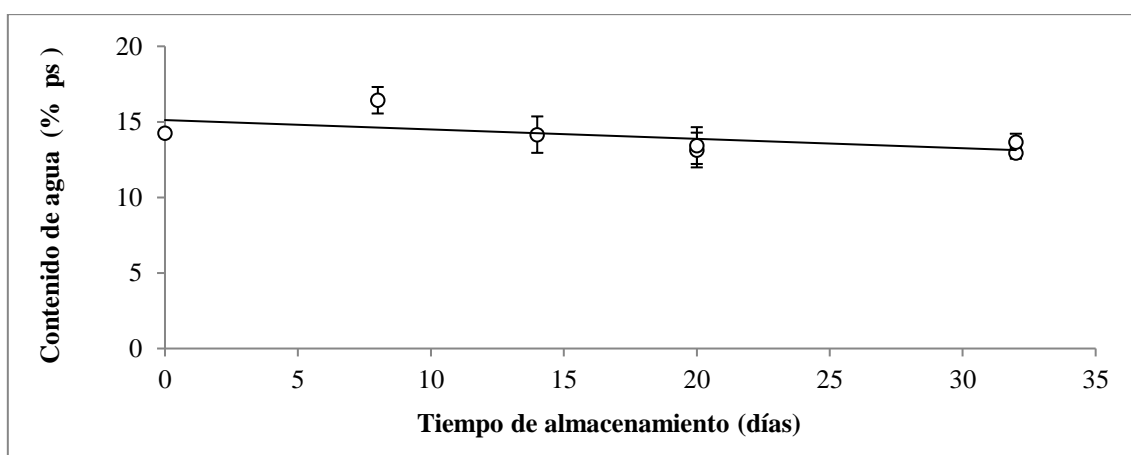


Figura 6. Contenido de agua de semillas de cebolla equilibradas a 75% HR (ambiente húmedo) durante su almacenamiento a 35°C en sobres de aluminio termosellados durante 32 días. La ecuación de la recta correspondiente es $y = -0,0621x + 15,119$ y $R^2 = 0,3892$.

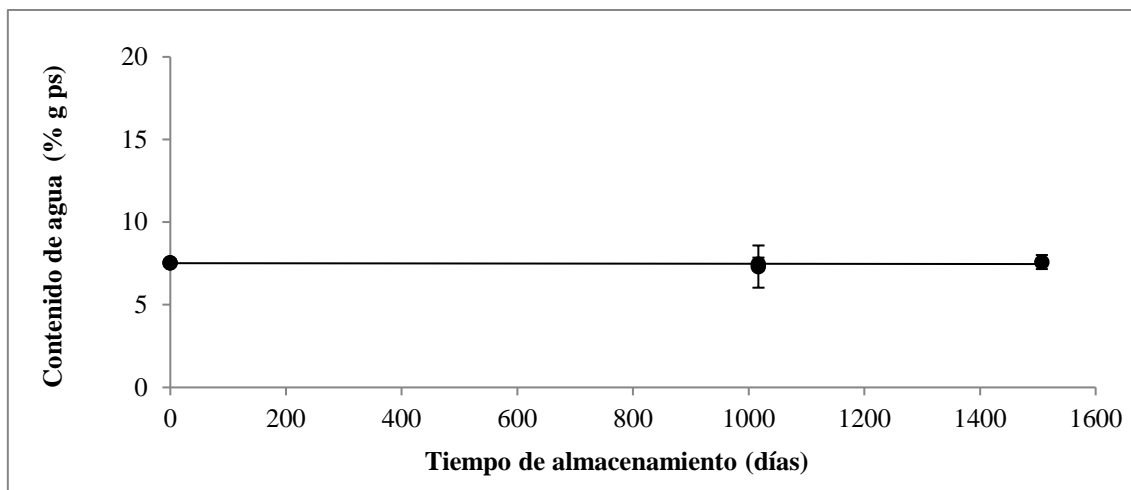


Figura 7. Contenido de agua de semillas de cebolla equilibradas a 33% HR (ambiente seco) durante su almacenamiento a 35°C en sobres de aluminio termosellados durante 1507 días. La ecuación de la recta correspondiente es $y = -3E-05x + 7,5168$ y $R^2 = 0,0466$.

3.1.2. Germinación y determinación de la pérdida de viabilidad de las semillas

Las semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas (14% ps, equilibradas a 75% HR) perdieron su viabilidad con el tiempo de almacenamiento siguiendo el curso temporal inverso-sigmoidal característico (Figura 8). Las semillas alcanzaron P75 a los 7 días, P50 a los 17 días, P25 a los 26 días (Tabla 2) y perdieron completamente su capacidad de germinación tras más de 40 días, mostrando, como era de esperar, una alta significación ($p < 0,001$) del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la germinación.

Las semillas almacenadas en condiciones secas (8% ps, equilibradas a 33% HR) perdieron también su viabilidad a lo largo del tiempo siguiendo un curso temporal inverso-sigmoidal, formando una curva más prolongada en el tiempo (Figura 9). Las semillas alcanzaron P75 a los 622 días, P50 a los 1055 días, P20 a los 1488 días (Tabla 2), perdiendo su viabilidad completamente tras más de 2000 días, con un efecto del tiempo de almacenamiento sobre la germinación significativo ($p < 0,001$).

Cuando las semillas se almacenaron en condiciones húmedas la pérdida de viabilidad fue mucho más rápida que cuando las semillas se almacenaron en condiciones secas, como era de esperar (Figuras 8 y 9). Una reducción del contenido de agua de las semillas durante el almacenamiento de aproximadamente un 6% (de 14% a 8%) supuso un aumento de longevidad de las semillas de casi 60 veces más (P50 de 17 a 1055 días). Estos datos recalcan la importancia del control de la humedad durante el almacenamiento de semillas para el mantenimiento de la calidad de los recursos genéticos en plantas.

Además, tanto en condiciones húmedas como secas la curva de pérdida de viabilidad tiene una forma muy parecida, lo que podría indicar que la tasa de cambios bioquímicos producidos durante el envejecimiento es semejante, pese a que estos cambios serán distintos en húmedo y seco ya que los mecanismos de envejecimiento difieren debido a las diferencias fisiológicas derivadas del distinto contenido de agua (Walters et al. 2005; Mira et al. (2010).

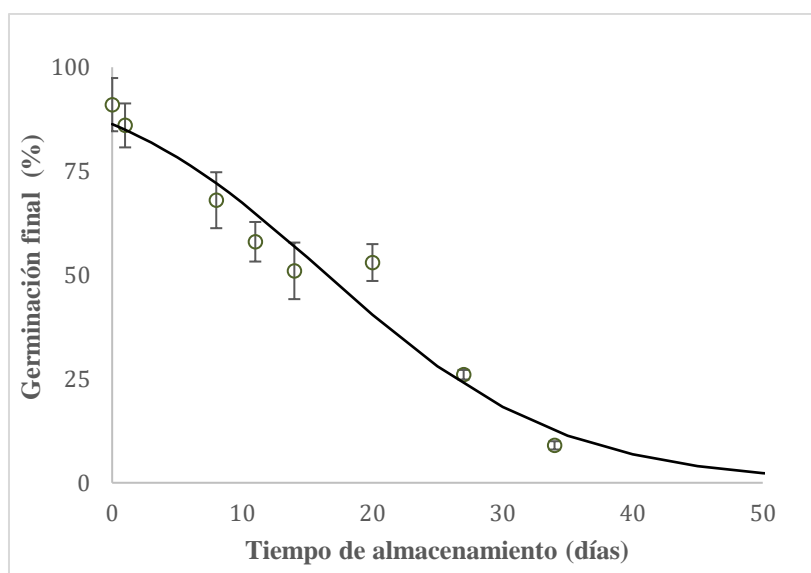


Figura 8. Curva de pérdida de viabilidad de semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas a 14% ps y 35°C. Cada punto representa la media de cuatro réplicas de germinación \pm error estándar. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión logística y se calcularon los valores para 75, 50 y 25% de germinación de semillas (P75, P50 y P25).

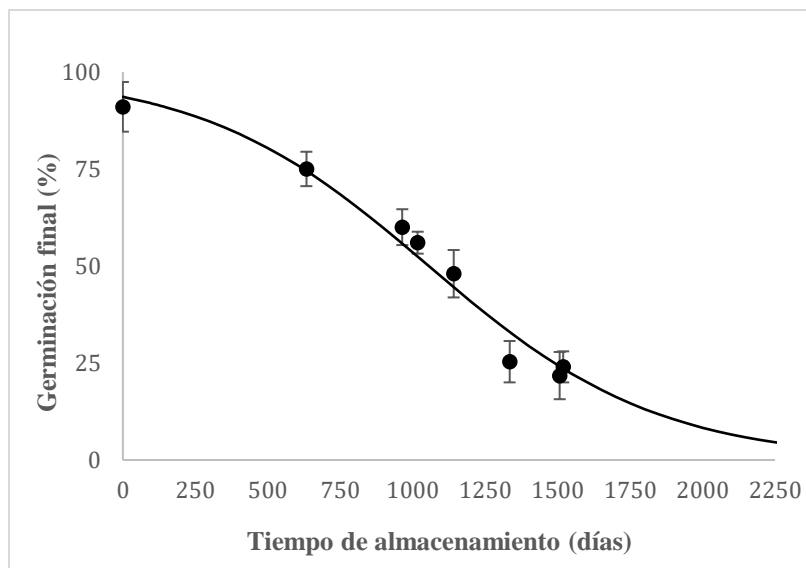


Figura 9. Curva de pérdida de viabilidad de semillas de cebolla almacenadas en condiciones secas a 35°C y 8% ps. Cada punto representa la media de cuatro réplicas de germinación \pm error estándar. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión logística y se calcularon los valores para 75, 50 y 25% de germinación de semillas (P75, P50 y P25).

Tabla 2. Parámetros de longevidad y contenido de agua en semillas de cebolla almacenadas a 35°C y condiciones húmedas o secas (14% o 8% ps de contenido de agua). Los datos se expresan mediante valores medios \pm error estándar.

Condiciones de almacenamiento		Parámetros de longevidad de las semillas (días)		
Humedad relativa de equilibrio (%)	Contenido de agua (% ps)	P75	P50	P25
75	14,0 \pm 0,4	7 \pm 2	17 \pm 1	26 \pm 2
33	7,5 \pm 0,1	622 \pm 48	1055 \pm 30	1488 \pm 45

El efecto del almacenamiento en la velocidad y tasa de germinación de las semillas de cebolla puede observarse en las figuras 10 y 11. El tiempo de almacenamiento tanto

en condiciones húmedas como secas tuvo un efecto tanto sobre la germinación final alcanzada como sobre la velocidad de germinación. A mayor tiempo de almacenamiento, las semillas que germinaban lo hacen de forma más lenta, tardando más horas desde que se inicia el ensayo de germinación en romper la cubierta seminal y observarse la radícula. En semillas control, no almacenadas (T 0), se alcanza una germinación final de 91%, la primera germinación se observa a las 24h y todas las semillas que germinan lo hacen antes de las 150 horas. En cambio, en semillas almacenadas en condiciones secas durante 1334 días (T 1334), por ejemplo, se alcanza solo un 25% de germinación, y el inicio de la primera germinación se retrasa hasta las 144 h, extendiéndose el periodo de observación de nuevas germinaciones hasta casi las 250 horas de incubación (Figura 11). El retraso en el inicio y la velocidad de germinación en semillas envejecidas durante el almacenamiento es algo que se ha observado en distintas especies (Mira et al. 2019), y pone de manifiesto la importancia del almacenamiento de semillas en condiciones óptimas para mantener la calidad y el vigor del material vegetal conservado.

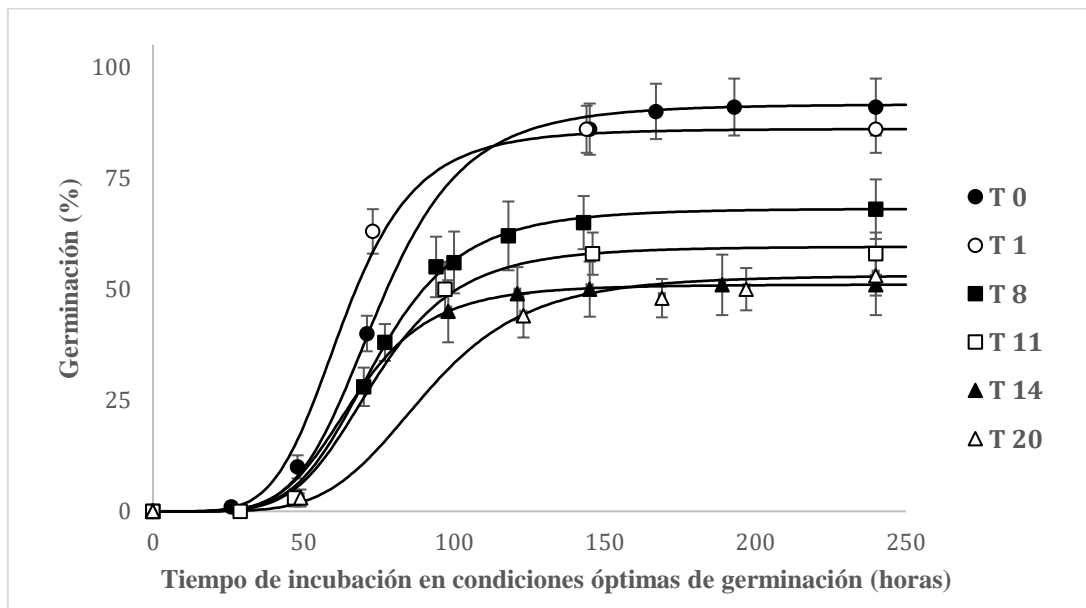


Figura 10. Curvas de germinación de semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas a 14% ps y 35°C durante 0 (T0), 1 (T1), 8 (T8), 11 (T11), 14 (T14) y 20 (T20) días. Cada punto representa la media de cuatro réplicas de germinación \pm error estándar. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión logística y se calcularon distintos parámetros de velocidad de germinación.

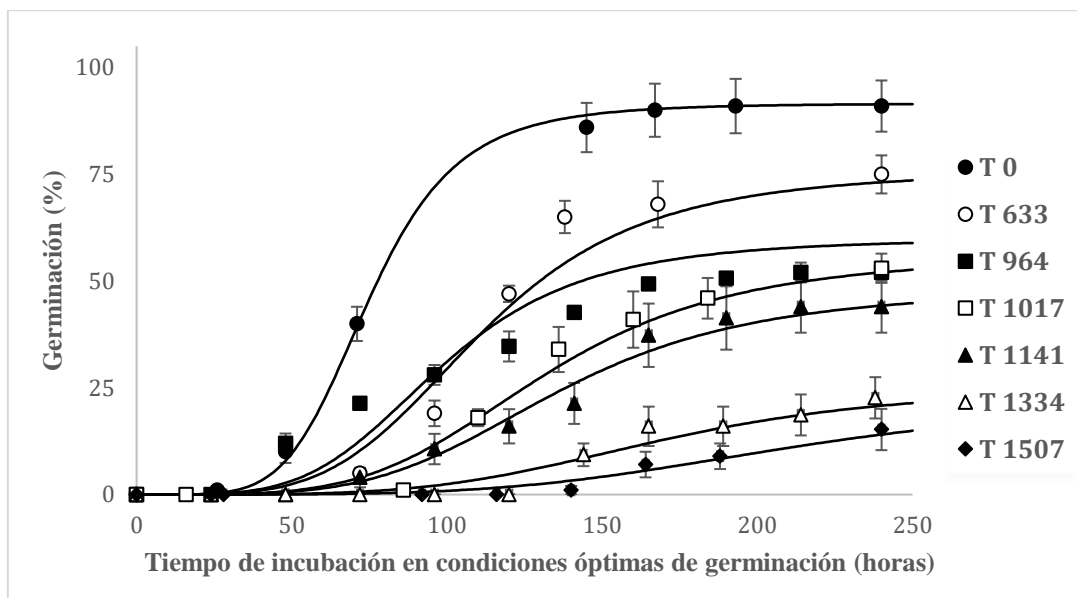


Figura 11. Curvas de germinación de semillas de cebolla almacenadas en condiciones secas a 8% ps y 35°C durante 0 (T0), 633 (T633), 964 (T964), 1017 (T1017), 1141 (T1141), 1334 (T1334) y 1507 (T1507) días. Cada punto representa la media de cuatro réplicas de germinación \pm error estándar. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión logística y se calcularon distintos parámetros de velocidad de germinación.

El porcentaje de germinación final por sí solo no puede explicar completamente el comportamiento germinativo de las semillas. En nuestro trabajo hemos podido identificar lotes de semillas con semejante porcentaje de germinación pero que difieren en velocidad de germinación. Las semillas almacenadas 1 día en condiciones de humedad no vieron afectada negativamente su viabilidad ya que tuvieron un porcentaje final de germinación muy parecido a las semillas control (Figura 10). Sin embargo, su germinación fue más rápida, pasando el T50 de 75h a T0 a 62h en T1, probablemente debido a que la cantidad de agua adquirida tras el equilibrado a 75% HR ha favorecido el inicio de los procesos de germinación (Tabla 3).

Existen numerosos parámetros para evaluar la germinación de semillas puesto que un lote de semillas puede diferir en el tiempo de inicio, la velocidad, la uniformidad y el porcentaje final de la germinación (Soltani et al. 2015). En este trabajo se han calculado distintos parámetros de caracterización de la velocidad de germinación (TMG, T50 max,

T50 y T20), con la intención de identificar aquellos que serán más útiles para evaluar el vigor de lotes de semillas de cebolla almacenadas. En todos los parámetros calculados observamos una tendencia a que se reduzca la velocidad de germinación con el envejecimiento, necesitando más tiempo las semillas para germinar cuanto más tiempo han estado almacenadas (Tabla 3). Sin embargo, no todos los parámetros permiten identificar diferencias significativas entre los distintos tiempos de almacenamiento.

El TMG se define como la tasa de germinación de una muestra de semillas y la distribución temporal de su germinación, indicando el período de retraso para cada semilla entre el inicio de la imbibición y la germinación (Matthews y Khajeh-Hosseini 2007; Bewley et al. 2013). Calculado según la fórmula de Ellis y Roberts (1980) ($\frac{\sum(n,t)}{\sum n}$), no es, por lo tanto, y pese a su nombre, un índice real de tiempo medio de germinación, sino un índice de velocidad de germinación, y no muestra el tiempo hasta un porcentaje de germinación específico. Se ha utilizado en numerosas ocasiones en la evaluación de lotes de semillas de cebolla (Morillo-Coronado et al. 2022; Jagosz 2015). En nuestro trabajo, el TMG varía significativamente con el tiempo de almacenamiento ($p < 0,01$, Tabla 3), sin embargo, y pese a una ligera tendencia al alza, el incremento no es lineal respecto al tiempo de almacenamiento ni en condiciones húmedas ni secas (Tabla 3). Los valores que se obtienen aplicando la fórmula establecida del TMG no indican el tiempo hasta un porcentaje de germinación específico, por lo que la comparación de diferentes TMG es en realidad una comparación de lotes a distintos niveles de germinación, lo que conduce a errores en la interpretación. Por ejemplo, si comparamos los lotes almacenados en condiciones húmedas a tiempo 0 y 14 (T0 y T14) observamos que tienen valores de TMG que no son significativamente diferentes, sin embargo, tras 14 días de almacenamiento se ha reducido el porcentaje de germinación final en un 40%. Estos resultados nos indican que el TMG no es el más adecuado para comparar lotes de

semillas de cebolla almacenados, puesto que no permite identificar diferencias en lotes con distintos niveles de envejecimiento.

El T50 max nos indica el tiempo que tarda el lote de semillas en alcanzar la mitad de su germinación máxima. Este índice ha sido llamado por algunos autores como T50, por o que la terminología es a veces contradictoria (Kumar et al. 2021). Este valor de porcentaje de germinación máximo será distinto para cada lote, y además podemos observar en nuestros datos como no siempre aumenta correlativamente junto al envejecimiento del lote. En nuestro trabajo, el T50 max no permitió identificar diferencias significativas entre los lotes de semillas envejecidos en condiciones de humedad, solamente tras 20 días de almacenamiento el índice aumentó significativamente (Tabla 3). En condiciones secas sí se detectaron diferencias entre los tiempos de almacenamiento, pero estos no se correlacionaban con los resultados obtenidos de porcentaje de germinación final. Por ejemplo, semillas almacenadas en condiciones secas 633 y 964 días alcanzaron germinaciones finales distintas (75% y 60%), pero los valores calculados de T50 max indican una germinación más rápida a 964 días.

Índices como el T50 o el T20 comparan el tiempo que los lotes tardan en alcanzar el mismo valor de germinación (50% o 20% exactamente). Con nuestros datos, estos índices sí nos han permitido observar diferencias en la velocidad de germinación debido al envejecimiento tanto en condiciones húmedas como secas. Un lote de semillas de cebolla pasa de alcanzar un 50% de germinación en 79h a necesitar 164h tras 20 días de almacenamiento en condiciones húmedas y 210h tras más de 1000 días de almacenamiento en condiciones secas (Tabla 3). Además, los valores de T50 y T20 muestran un aumento progresivo con el tiempo de almacenamiento.

Según nuestros resultados, los índices T50 max y TMG no son los más recomendables para comparar lotes de semillas de cebolla almacenadas, algo que había sido anteriormente señalado en otras especies (Soltani et al. 2015). En semillas almacenadas de cebolla, Kumar et al. (2021) identificaron que el TMG y el T50 max (llamado T50 por los autores) sobreestimaban la velocidad de germinación de semillas envejecidas respecto al control y no se correlacionaban con los datos obtenidos de porcentaje de germinación final. Sin embargo, estos autores no testaron el T50 ni el T20, parámetros utilizados en nuestro trabajo. Estos parámetros, que permiten comparar lotes que han alcanzado niveles fisiológicos semejante, un 50% de germinación exacto en el caso del T50, nos han permitido identificar diferencias entre lotes con poca diferencia en el envejecimiento. En el caso de lotes que no alcancen el 50% de germinación, se podría utilizar índices distintos como el T20, que según nuestros datos también permite una buena caracterización de la velocidad de germinación de los lotes de semillas. Nuestros datos concluyen que el tiempo hasta el cincuenta por ciento de germinación (T50) sería el mejor parámetro para la evaluación de la germinación.

Tabla 3. Parámetros de medida de la tasa de germinación de semillas de cebolla almacenadas a 35°C y 75% o 33% de HR. T50: tiempo que tardan las semillas en alcanzar el 50% de germinación; T20: tiempo que tardan las semillas en alcanzar el 20% de germinación; T50 max: tiempo necesario para alcanzar el 50% de la germinación máxima; TMG: tiempo medio de germinación según la fórmula de Ellis y Roberts (1980); TI: índice de Timson modificado según Ranal y Santana (2006). Los datos se expresan mediante valores medios \pm error estándar.

Condiciones de almacenamiento		Parámetros de velocidad de germinación				
Contenido de agua (% g H ₂ O g ⁻¹ ps)	Tiempo almacenamiento (días)	TMG (horas)	T50 max (horas)	T50 (horas)	T20 (horas)	
Condiciones húmedas	14	0	111 \pm 3 b	75 \pm 3 a	79 \pm 4 a	57 \pm 3 ab
	14	1	92 \pm 3 a	63 \pm 4 b	62 \pm 3 b	44 \pm 3 a
	14	8	92 \pm 4 a	74 \pm 4 a	92 \pm 5 ac	60 \pm 3 bc
	14	11	101 \pm 2 ab	74 \pm 5 a	105 \pm 7 c	63 \pm 4 cd
	14	14	102 \pm 2 ab	67 \pm 7 ab	148 \pm 15 d	56 \pm 6 abcd
	14	20	135 \pm 1 c	91 \pm 7 a	164 \pm 12 d	79 \pm 6 d
Condiciones secas	8	0	111 \pm 3 a	75 \pm 3 a	79 \pm 4 a	57 \pm 3 a
	8	633	130 \pm 4 ab	111 \pm 6 b	129 \pm 6 b	88 \pm 4 b
	8	964	104 \pm 8 a	98 \pm 8 b	141 \pm 10 c	84 \pm 6 b
	8	1017	150 \pm 9 ab	132 \pm 8 c	210 \pm 12 c	115 \pm 6 c
	8	1141	143 \pm 9 ab	136 \pm 10 c	--	125 \pm 8 c
	8	1334	174 \pm 15 bc	169 \pm 16 d	--	225 \pm 20 d
	8	1507	210 \pm 22 c	212 \pm 20 e	--	342 \pm 31 e

Nota 1: Diferentes letras minúsculas en una columna indican diferencias significativas (test de Tukey, $\alpha = 0,05$). Significancia: nivel de significancia para cada tiempo de almacenamiento ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

3.2. Actividad enzimática

3.2.1. Cuantificación de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas en semillas de cebolla tras su almacenamiento en condiciones de humedad y en seco para evaluar posteriormente la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión reductasa (GR). Se cuantificó la cantidad de proteínas extraída utilizando la recta patrón que se describe en la Tabla 1. Previamente se testaron distintos métodos a la hora de preparar las diluciones patrón: 1) dilución directa en la cubeta, y 2) dilución previa y congelación a -20°C (Figura 11). No se observaron diferencias entre ambos métodos por lo que se decidió utilizar el método de realizar las diluciones directamente en la cubeta por su rapidez y facilidad.

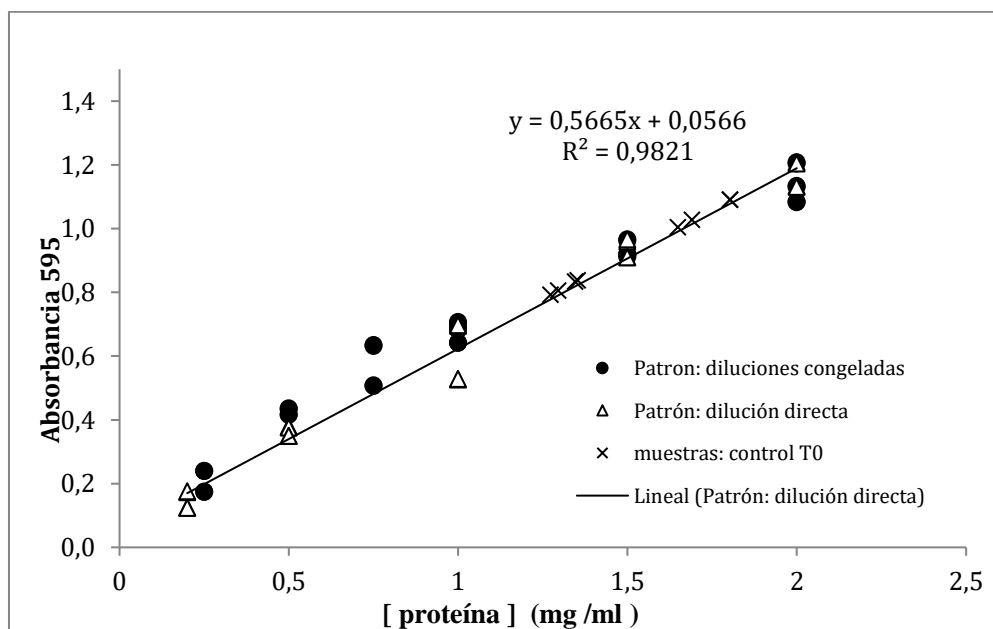


Figura 11. Recta patrón para la cuantificación de proteínas. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar.

Antes del almacenamiento, la cantidad inicial de proteínas extraídas de semillas control fue de $1,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, mientras que las cantidades de proteínas extraídas en las semillas almacenadas fueron similares a lo largo del tiempo, con una media de $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ tanto en condiciones de humedad como en seco (Figura 12 y 13). Los resultados

obtenidos muestran que no hay una disminución significativa de la cantidad de proteínas en semillas que podamos relacionar con el tiempo de almacenamiento.

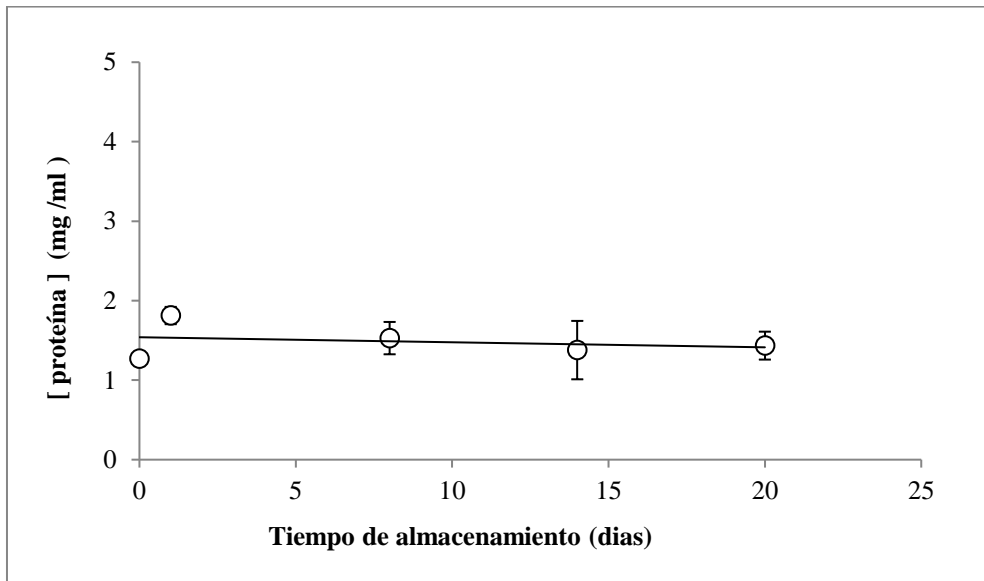


Figura 12. Concentración de proteínas extraídas de semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = -0,0208x + 1,7624$ y $R^2 = 0,7677$

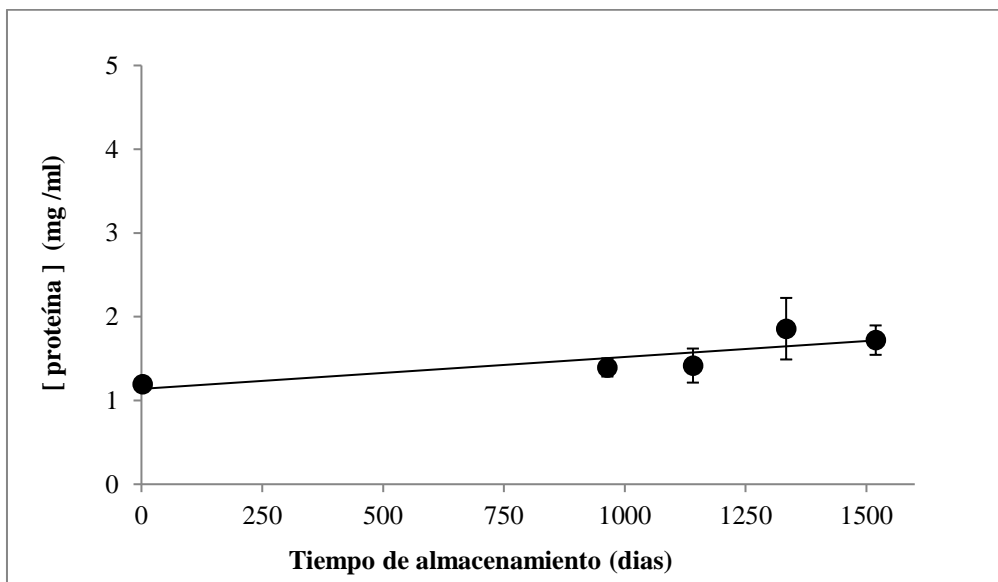


Figura 13. Concentración de proteínas extraídas de semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones secas (8% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = 0,0004x + 1,1383$ y $R^2 = 0,7072$.

3.2.2. Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa en semillas no almacenadas muestran valores iniciales de 2,3 unidades SOD * mg proteína⁻¹. En semillas almacenadas en condiciones húmedas los valores de SOD se incrementan hasta 9,1 – 9,9 unidades SOD * mg proteína⁻¹ (Fig. 14), mientras que en almacenamiento en seco los valores se mantienen entre 2,1 – 2,7 unidades SOD * mg proteína⁻¹ a lo largo del tiempo de almacenamiento (Fig. 15). Este aumento de la actividad de la SOD se explicaría por el hecho de que las semillas almacenadas en húmedo tienen una actividad metabólica mayor que en condiciones secas. Durante el almacenamiento en húmedo o en seco, los valores de actividad enzimática de SOD se mantienen estables a lo largo del tiempo, no pudiéndose observar un efecto del envejecimiento de las semillas ($p = 0,982$ y $p = 0,859$, para húmedo y seco respectivamente; Fig. 14 y 15). Cuando se comparó la actividad de SOD entre semillas almacenadas que presentaban un nivel de pérdida de viabilidad similar (P75 o P50), se encontraron diferencias significativas entre el almacenamiento en húmedo o seco ($p < 0,01$; Fig. 16). Sin embargo, en una misma condición de almacenamiento, no se encontraron diferencias significativas entre lotes de semillas que habían reducido su germinación hasta el 75% o hasta el 50% de la germinación máxima (es decir, P75 y P50) ($p = 0,692$ y $p = 0,826$, para húmedo y seco respectivamente). Por lo tanto, no se observa ninguna relación entre la actividad SOD y la viabilidad de las semillas, ya que esta última disminuye con el tiempo de almacenamiento, mientras que la actividad SOD se mantiene con valores casi constantes.

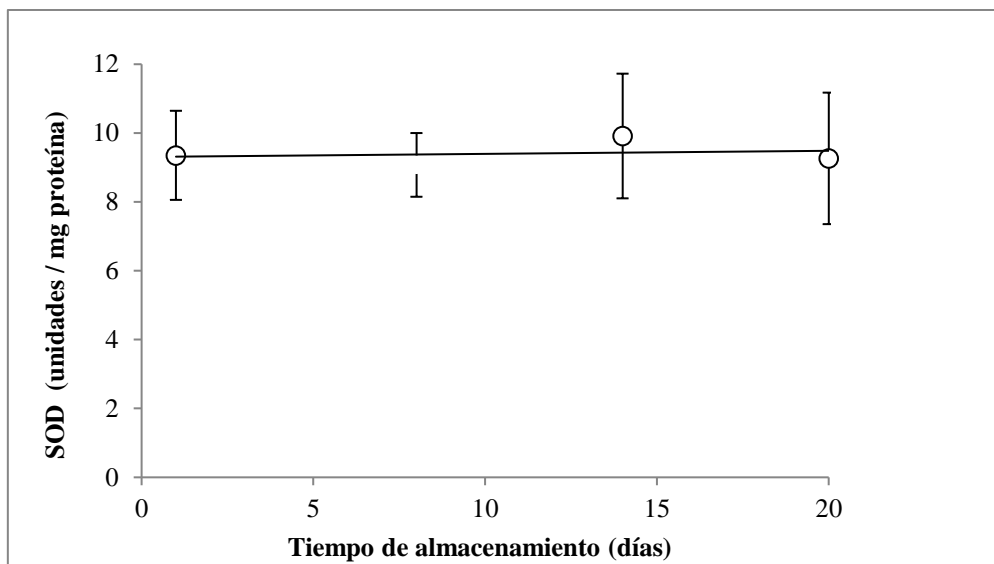


Figura 14. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = 0,0089x + 9,3062$ y $R^2 = 0,0404$.

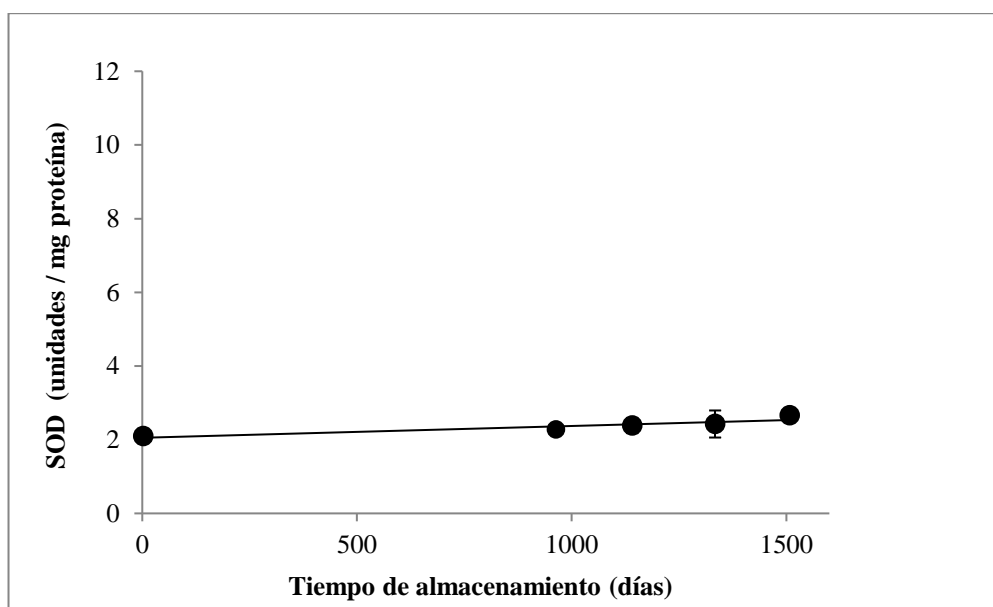


Figura 15. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones secas (8% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = 0,0003x + 2,0527$ y $R^2 = 0,8242$.

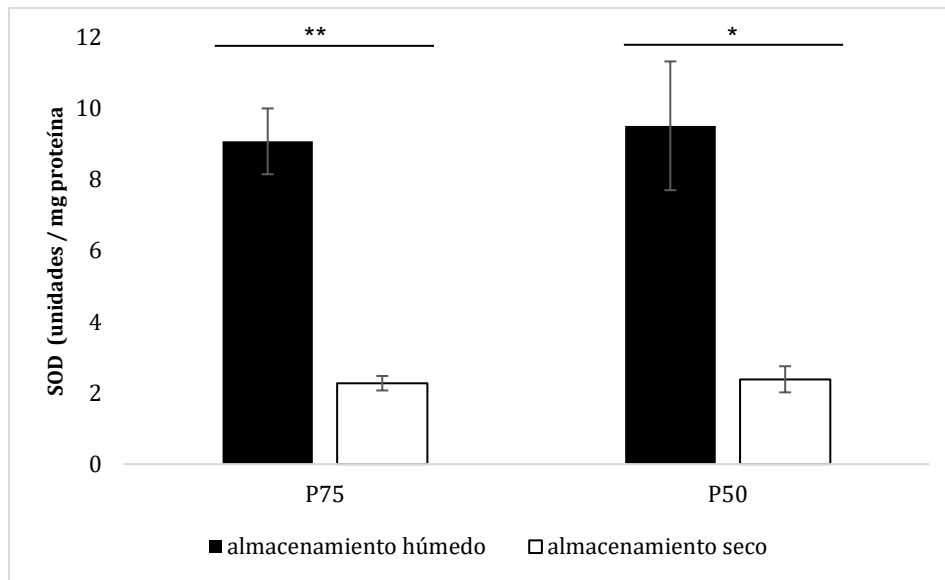


Figura 16. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en semillas de cebolla en dos niveles de envejecimiento: P75 y P50. Las semillas fueron almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) o secas (8% ps). Los valores representan la media de tres extractos distintos \pm error estándar. Significancia: nivel de significancia para cada comparación *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

3.2.3. Actividad de la catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT) en semillas no almacenadas muestran valores iniciales de $2 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 * \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. En semillas almacenadas en condiciones húmedas los valores de CAT se mantienen entre $2,3 - 2,7 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 * \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Fig. 17), mientras que en almacenamiento en seco los valores se mostraron entre $1,3$ y $2,6 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 * \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ a lo largo del tiempo de almacenamiento (Fig. 18).

Durante el almacenamiento en húmedo, los valores de actividad enzimática de CAT se mantienen estables a lo largo del tiempo, no pudiéndose observar un efecto del envejecimiento de las semillas ($p = 0,902$; Fig. 17). En almacenamiento en seco, pese a no observarse diferencias significativas entre lotes almacenados a distintos tiempos ($p = 0,242$), la actividad de la CAT disminuye ligeramente en los primeros tiempos de

almacenamiento, hasta que se incrementa considerablemente tras 1507 días de almacenamiento, cuando la viabilidad ha descendido a un 22% (Fig. 18).

Cuando se comparó la actividad de CAT entre semillas que presentaban un nivel de pérdida de viabilidad similar (P75 o P50), no se encontraron diferencias significativas entre el almacenamiento en húmedo o en seco en el nivel de P75 ($p = 0.099$; Fig. 19), pero sí se encontraron diferencias significativas en P50 ($p < 0,05$) donde la actividad enzimática aumento significativamente en almacenamiento húmedo. Estos resultados, en consonancia con los obtenidos en este mismo trabajo en SOD, indican que la actividad enzimática se ve influenciada por el estado hídrico de las células, que afectará a su metabolismo. Esto resalta la importancia del estado hídrico de la célula durante el almacenamiento y la existencia de diferentes mecanismos de envejecimiento en condiciones húmedas y secas.

Además, en una misma condición de almacenamiento, no se encontraron diferencias significativas entre lotes de semillas que habían reducido su germinación hasta el 75% o hasta el 50% de la germinación máxima (es decir, P75 y P50) ($p = 0,724$ y $p = 0,130$, para húmedo y seco respectivamente). Por lo tanto, no se observa ninguna relación entre la actividad de CAT y la viabilidad de las semillas almacenadas en húmedo, ya que la actividad CAT se mantiene con valores casi constantes pese a la pérdida de viabilidad de las semillas. En almacenamiento en seco, cuando las semillas alcanzan una pérdida de viabilidad de un P25 parece producirse un cambio de estado bioquímico que afecta a distintos parámetros. Por un lado, la velocidad de germinación, medida como T20 se incrementa considerablemente respecto a valores anteriores. Por otro, la actividad de la CAT también aumenta. Sin embargo, la actividad de la CAT no presenta diferencias significativas a distintos tiempos de almacenamientos en niveles de envejecimiento previos al P25, no observándose diferencias en P75 o P50 (Fig. 19). Esto nos indica que,

aunque la actividad de la CAT y la velocidad de germinación nos pueden indicar el nivel de envejecimiento tardío de un lote de semillas, no servirían para identificar los primeros estadios del envejecimiento.

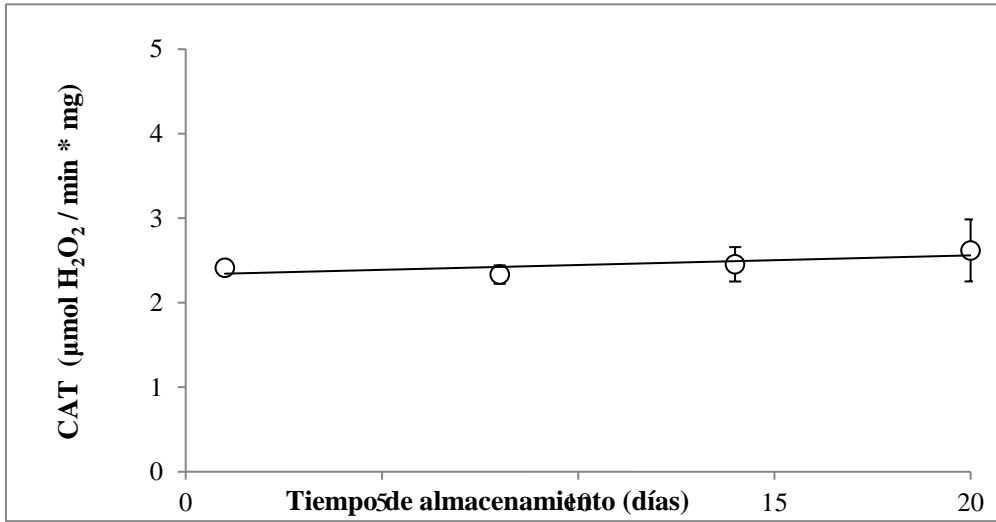


Figura 17. Actividad de la catalasa (CAT) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = 0,0114x + 2,3323$ y $R^2 = 0,593$.

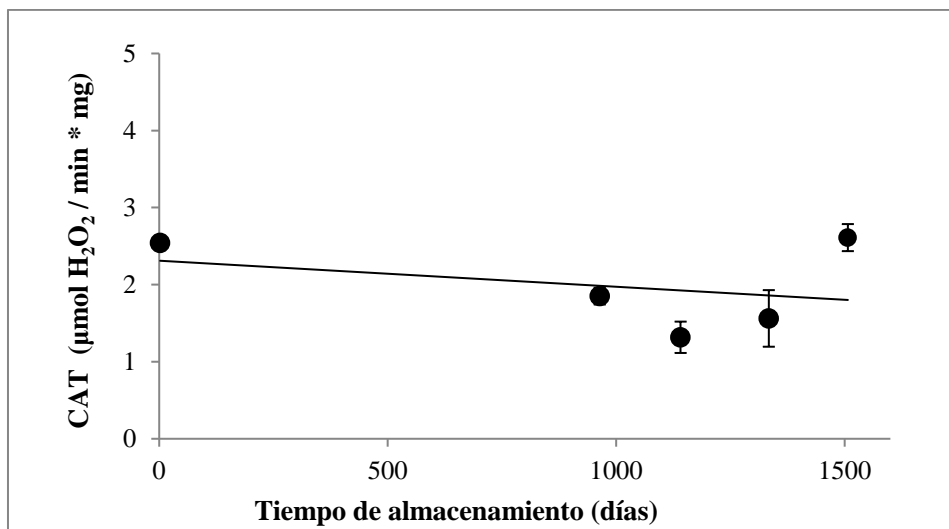


Figura 18. Actividad de la catalasa (CAT) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones secas (8% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. La ecuación de la recta correspondiente es $y = -0,0003x + 2,3107$ y $R^2 = 0,1179$.

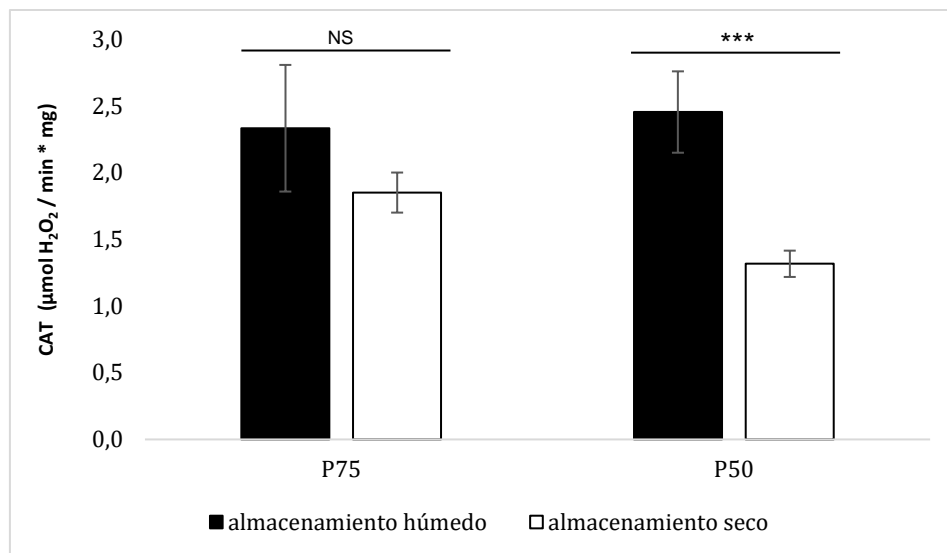


Figura 19. Actividad de la catalasa (CAT) en semillas de cebolla en dos niveles de envejecimiento: P75 y P50. Las semillas fueron almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) o secas (8% ps). Los valores representan la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. Significancia: nivel de significancia para cada comparación *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, NS = no significativo.

3.2.4. Glutación reductasa

La actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en semillas no almacenadas muestran valores iniciales de de $14,7 \text{ nmol} * \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. En semillas almacenadas en condiciones húmedas los valores obtenidos varían entre $13,4$ y $17,1 \text{ nmol} * \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 20), y en condiciones secas entre $11,6$ y $16,5 \text{ nmol} * \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 21).

A diferencia de lo observado en SOD y CAT, durante el almacenamiento en húmedo, los valores de actividad enzimática de GR muestran diferencias significativas a lo largo del tiempo, aunque no ha podido observarse un patrón temporal que nos permita identificar el nivel de envejecimiento de las semillas ($p < 0,05$; Fig. 20). En almacenamiento en seco, la actividad de la GR se incrementa considerablemente tras 1334

días de almacenamiento, cuando la viabilidad ha descendido a un nivel de P25, siendo su germinación exacta un 25% ($p < 0,001$; Fig. 21).

Cuando se comparó la actividad de GR entre semillas que presentaban un nivel de pérdida de viabilidad similar (P75 o P50), no se encontraron diferencias significativas entre el almacenamiento en húmedo o en seco ($p = 0.268$ y $p = 0.155$ respectivamente para P75 y P50; Fig. 22). Además, en una misma condición de almacenamiento, no se encontraron diferencias significativas entre lotes de semillas que habían reducido su germinación hasta el 75% o hasta el 50% de la germinación máxima (es decir, P75 y P50) ($p = 0,516$ y $p = 0,158$, para húmedo y seco respectivamente).

Por lo tanto, se observan diferencias significativas en la actividad enzimática de GR durante el almacenamiento en húmedo y en seco. En almacenamiento en seco, tras estar almacenadas las semillas 1334 días, la actividad de la GR parece aumentar, sin embargo, vuelve a bajar tras 1507 días, por lo que no se detecta una tendencia clara (Fig. 21). Esto nos indica que, aunque la actividad de la GR nos puede indicar el nivel de envejecimiento tardío de un lote de semillas, no servirían para identificar los primeros estadios del envejecimiento ni podremos establecer la viabilidad exacta del lote.

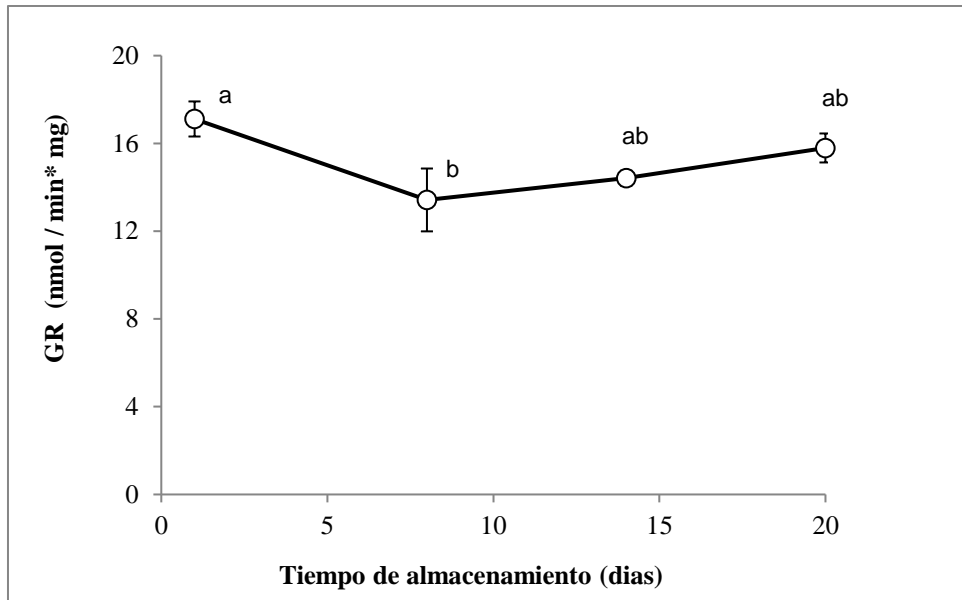


Figura 20. Actividad de la glutatión reductasa (GR) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. Diferentes letras junto a un símbolo indican diferencias significativas (test de Tukey, $\alpha = 0,05$).

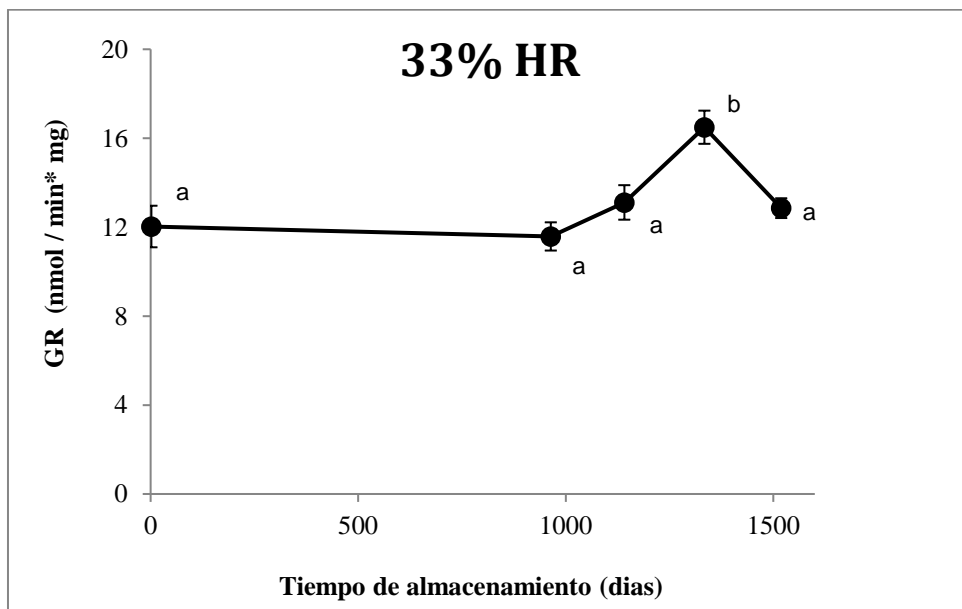


Figura 21. Actividad de la glutatión reductasa (GR) en semillas de cebolla almacenadas a 35°C en condiciones secas (8% ps) a distintos tiempos de almacenamiento. Cada punto representa la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar. Diferentes letras junto a un símbolo indican diferencias significativas (test de Tukey, $\alpha = 0,05$).

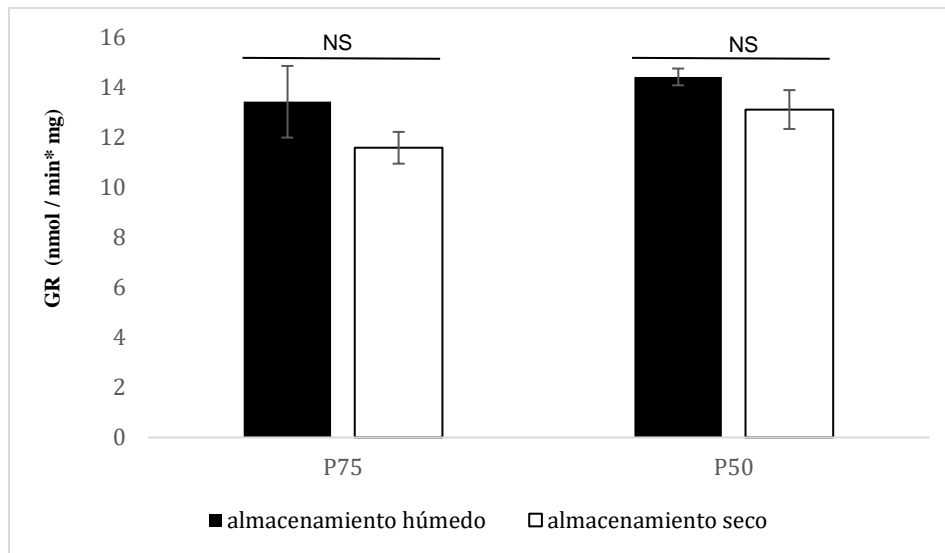


Figura 12. Actividad de la glutatión reductasa (GR) en semillas de cebolla en dos niveles de envejecimiento: P75 y P50. Las semillas fueron almacenadas a 35°C en condiciones húmedas (14% ps) o secas (8% ps). Los valores representan la media de tres extractos distintos con dos réplicas por extracto \pm error estándar.

En distintos cultivares de cebolla almacenadas se observó que la actividad enzimática de SOD y CAT disminuyó junto con el descenso de la viabilidad de las semillas, mostrando así una relación entre la pérdida de viabilidad y la actividad de esta enzima (Rao et al., 2006; Demikaya et al., 2010; Brar et al., 2019). Sin embargo, estos ensayos se realizaron en distintas condiciones de almacenamiento a las aquí estudiadas. En semillas de centeno almacenadas en las mismas condiciones a las estudiadas en este trabajo, no se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo de almacenamiento en la actividad de SOD y CAT (Pirredda, 2022). Nuestros resultados en cebolla sugieren que pudieran existir diferencias entre cultivares de una misma especie a la hora de su respuesta al estrés oxidativo, así como diferencias derivadas de las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas. En esta línea, hemos observado que la actividad de SOD y CAT es mayor en almacenamiento en húmedo que en seco, lo que nos indica que la humedad de almacenamiento determina el metabolismo oxidativo producido durante el almacenamiento.

Respecto a la actividad de GR, los resultados obtenidos en cebolla en condiciones húmedas son similares a los observados en semillas de girasol por De Paula (2001) y Bailly et al. (1996), donde se identificó un descenso de la actividad de la GR durante el envejecimiento en condiciones de alta humedad y temperatura (~45° C y 75% de HR). También, Pukuoka y Ratajczak (2005) observaron una disminución en la actividad de la GR en semillas de haya (*Fagus sylvatica* L.) durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (4, 20 y 30 °C) y niveles de humedad relativa (45% y 75% HR) durante 9 semanas. Esto nos permite concluir que el envejecimiento en estas condiciones produce una disminución importante de los niveles de GR.

4. CONCLUSIONES

- El índice T50 es el parámetro más adecuado para la evaluación de la velocidad de germinación en lotes de semillas de cebolla almacenadas. Este índice permite identificar diferencias entre lotes con poca diferencia en su pérdida de viabilidad debida al envejecimiento. En el caso de lotes que no alcancen el 50% de germinación, se podría utilizar índices distintos como el T20, que según nuestros datos también permite una buena caracterización de la velocidad de germinación de los lotes de semillas.
- De los distintos índices de velocidad de germinación habitualmente utilizados en semillas de cebolla, nuestros datos indican que T50 max y TMG no reflejan adecuadamente los cambios que se producen en lotes de semillas almacenadas debido al envejecimiento.
- El tiempo de almacenamiento en condiciones húmedas no tuvo un efecto en la actividad de las enzimas SOD y CAT.
- Se identificaron diferencias significativas en la actividad de GR durante el almacenamiento en condiciones húmedas.
- El tiempo de almacenamiento en condiciones secas tuvo un efecto sobre la actividad de CAT y GR. Este cambio no siguió un patrón lineal, pero se pudo observar que cuando las semillas reducen su viabilidad hasta un 25% parece producirse un cambio de estado bioquímico que produce un aumento, a veces puntual, de la actividad de CAT y GR. Por lo que estos parámetros nos permitirán identificar lotes de semillas con un nivel de envejecimiento tardío, aunque no servirían para identificar los primeros estadios del envejecimiento.
- La actividad enzimática de SOD se incrementó significativamente en condiciones húmedas a todos los tiempos de almacenamiento respecto al almacenamiento en

seco. La CAT aumentó en condiciones húmedas respecto a secas cuando se compararon lotes de semillas que habían alcanzado un P50, reducido su viabilidad en un 50%. Estos resultados recalcan la importancia del estado hídrico de la célula durante el almacenamiento y la existencia de diferentes mecanismos de envejecimiento en condiciones húmedas y secas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Arc, E., Ogé, L., Grappin, P., & Rajjou, L. (2011). Plant seed: a relevant model to study aging processes. In: Olgun, A. (Ed.): *The Field of Biological Aging: Past, Present and Future*, Transworld Research Network, Kerala, pág: 87–102.
- Amalfitano, C., Golubkina, N. A., Del Vacchio, L., Russo, G., Cannoniero, M., Somma, S., ... & Caruso, G. (2019). Yield, antioxidant components, oil content, and composition of onion seeds are influenced by planting time and density. *Plants*, 8: 293.
- Argerich, C. A., Bradford, K. J., & Tarquis, A. M. (1989). The effects of priming and ageing on resistance to deterioration of tomato seeds. *J. Exp. Bot.*, 40: 593–598.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., & Côme, D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant.*, 97:104-110.
- Bailly, C., & Kranner, I. (2011). Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination, Kermode Allison R: *Seed Dormancy: Methods and Protocols*, Humana Press, Clifton, pág:343-367.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2014). What kind of seed dormancy might palms have?. *Seed Sci. Res.*, 24: 17-22.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki H. (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York.
- Brar, N. S., Kaushik, P., & Dudi, B. S. (2019). Assessment of natural ageing related physio-biochemical changes in onion seed. *Agriculture*, 9: 163.
- Carravedo, M.; Maloor, C. (2007). *Varietades Autóctonas de Cebollas Españolas*. Litocian, S.L., Aragón.
- Contreras, S. (2002). The international seed industry, McDonald M. y Contreras S.: *Proceedings International Seed Seminar: Trade, Production and Technology*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Macul, pág. 1-9.
- Core Team R. (2020): *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Consultado: 11/11/2023.
- de Paula Ruiz, M. M. (2001). Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (" *Helianthus annuus*" L, cv. Peredovik) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

- Demirkaya, M., Dietz, K. J., & SIVRITEPE, H. O. (2010). Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, 38: 49-52.
- Durán, J.M.; Hierro, J. (1993). La viabilidad de semillas y su estimación en condiciones de laboratorio. *Agricultura*, 734: 762-765.
- Ellis, R.H., Roberts E.H. (1980). Towards a rational basis for testing seed quality, Hebblethwaite P.D.: Seed production, Butterworths, Londres, pág: 605–635.
- Ellis, R.H., Roberts E.H. (1980b) Towards a rational basis for testing seed quality. In PD Hebblethwaite, ed., *Seed Production*. Butterworths, London, pp 605–635.
- Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1981). The quantification of aging and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. Technol.*, 9: 373-409.
- Eastfruit. (2023). Onion seed shortage could suggest a bad year ahead. <https://eastfruit.com/en/trending/onion-seed-shortage-could-suggest-a-bad-year-ahead/>. Consultado: 11/11/2023
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.*, 3: 175–182.
- FAOSTAT. (2021). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Consultado: 1/11/2023.
- Finch-Savage, W. E., & Bassel, G. W. (2016). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J. Exp. Bot.*, 67: 567–591.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28: 1056–1071.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, New York.
- Hay, F. R., Valdez, R., Lee, J. S., & Cruz, P. C. S. (2019). Seed longevity phenotyping: recommendations on research methodology. *J. Exp. Bot.*, 70: 425–434.
- ISTA. (2003). *Flower Seed Testing Workshop*, International Seed Testing Association, Budapest.
- ISTA. (2017). *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- ITC, Trade Map. (2023). https://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0703%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c2%7c1%7c1 Consultado: 1/11/2023.
- Jagosz, B. (2015). Improving onion seed germination using priming treatments. *Infra. and eco. of rur. are.*, 4: 1437-1447.

- Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C., & Corbineau, F. (2006). Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiol. Plant.*, 128: 496–506.
- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R. P., & Seal, C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.*, 188: 655–673.
- Kumar, S. P. J., Prasad, S. R., Banerjee, R., & Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Ann. Bot.*, 116: 663–668.
- Kumar, S., Basu, S., Anand, A., Lal, S. K., & Tomar, B. S. (2021). Identification of the best germination indices represents seed quality status in unaged and aged onion seeds. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci*, 10: 1-9.
- Lovato, A. (1981). *Advances in Research and Technology of Seeds Part 6*, Pudoc, Wageningen.
- MAPA. (2023): Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2177>: Consultado: 1/11/2023.
- Martín, I., Sánchez, S., Guerrero, M., Laina, C., Navarro, S., De la Cuadra, C. (2014). Viabilidad de semillas de diferentes especies cultivadas después de 30 años de conservación en la colección base del CRF-INIA, Álvarez J.M., Garcés A., Espiáum, Mallor C., Rubio M.J., Socías R.: *Actas de Horticultura 69*, Sociedad Española de Ciencias Horícolas, Zaragoza, pág: 35-36.
- Matthews S., Khajeh-Hosseini M. (2007). Length of the lag period of germination and metabolic repair explain vigour differences in seed lots of maize (*Zea mays*). *Seed Sci. Technol.*, 35: 200–212.
- Merritt, D. J., Senaratna, T., Touchell, D. H., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2003). Seed ageing of four Western Australian species in relation to storage environment and seed antioxidant activity. *Seed Sci. Res.*, 13: 155-165.
- Mira, S., Estrelles, E., & González-Benito, M. E. (2015). Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. *Plant Biol.*, 17: 153–162.
- Mira, S., Estrelles, E., Gonzalez-Benito, M. E., & Corbineau, F. (2011). Biochemical changes induced in seeds of Brassicaceae wild species during ageing. *Acta. Physiol. Plant.*, 33: 1803-1809.
- Mira, S., González-Benito, M. E., Hill, L. M., & Walters, C. (2010). Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *J. Exp. Bot.*, 61: 3915–3924.

- Mira, S., Veiga-Barbosa, L., & Pérez-García, F. (2019). Seed dormancy and longevity variability of *Hirschfeldia incana* L. during storage. *Seed Sci. Res.*, 29: 97-103.
- Morillo-Coronado, A. C., Martínez-Anzola, H. G., Velandia-Díaz, J. D., & Morillo-Coronado, Y. (2022). Effects of static magnetic fields on onion (*Allium cepa* L.) seed germination and early seedling growth. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.*, 39: 30-41.
- Morscher, F., Kranner, I., Arc, E., Bailly, C., & Roach, T. (2015). Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Ann. Bot.*, 116: 669-678.
- Pirredda, M. (2021). Effect of ageing on biochemical, genetic and epigenetic stability during seed storage, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Probert, R. J., Daws, M. I., & Hay, F. R. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Ann. Bot.*, 104: 57-69.
- Pukacka, S., & Ratajczak, E. (2005). Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *J. Plant Physiol.* 162: 873-885.
- Ranal, M.A. & Santana, D.G. 2006. How and why to measure the germination process?. *Rev. Bras. Bot.*, 29:1-11.
- Rao, R. G. S., Singh, P. M., & Rai, M. (2006). Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. *Sci. Hortic.*, 110:1-6.
- Ratajczak, E., Małecka, A., Ciereszko, I., & Staszak, A. M. (2019). Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1568.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R PLOS ONE. CRC Press.
- Rockland, L. B. (1960). Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40° C. *Anal. Chem.*, 32: 1375–1376.
- Soltani, E., Ghaderi-Far, F., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2015). Problems with using mean germination time to calculate rate of seed germination. *Aust. J. Bot.*, 63: 631-635.
- Straitresearch. (2023). Onion seed market. <https://straitresearch.com/report/onion-seed-market>. Consultado: 11/11/2023.

- Thirusendura Selvi, D., & Saraswathy, S. (2018). Seed viability, seed deterioration and seed quality improvements in stored onion seeds: a review. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 93: 1-7.
- Vertucci, C. W., & Roos, E. E. (1993). Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Sci. Res.*, 3: 201–213.
- Wageningen Centre for Development Innovation. (2020). Seed Alerts-Synthesis, Number 1. https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/b/a057c5ec-c309-4534-a606-c42566568252_Seed%20Sector%20Alert%20-%20June%20-%20Synthesis.pdf. Consultado el 11/11/2023.
- Walters, C. (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.*, 8: 223-244.
- Walters, C., Hill, L. M., & Wheeler, L. J. (2005). Dying while dry: Kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integr. Comp. Biol.*, 45: 751-758.
- Walters, C., Wheeler, L. J., & Grotenhuis, J. M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci. Res.*, 15:1-20.

APÉNDICE I: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la SOD en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,173	3	,391	,055	,982
Dentro de grupos	56,734	8	7,092		
Total	57,906	11			

Tabla 5: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la SOD en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones secas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,525	5	,105	,371	,859
Dentro de grupos	3,395	12	,283		
Total	3,920	17			

Tabla 6: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la CAT en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,527	3	,176	,190	,902
Dentro de grupos	18,480	20	,924		
Total	19,007	23			

Tabla 7: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la CAT en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones secas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,708	4	,927	1,468	,242
Dentro de grupos	15,788	25	,632		
Total	19,496	29			

Tabla 8: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la GR en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones húmedas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	46,711	3	15,570	3,205	,045
Dentro de grupos	97,175	20	4,859		
Total	143,887	23			

Tabla 9: Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad de la GR en las semillas de cebolla almacenadas en condiciones secas según el tiempo de almacenamiento (días). Gl, grados de libertad; F, prueba F de Fisher y Sig, significancia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	89,792	4	22,448	7,102	<,001
Dentro de grupos	79,018	25	3,161		
Total	168,811	29			