

29
84



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Efecto del Deterioro de Semillas sobre los
Sistemas de Síntesis de Proteínas en Maíz

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a :

MARCELA MURO RICO



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I.- INTRODUCCION

- 1.1 Generalidades del maíz
- 1.2 Germinación
- 1.3 Bioquímica de la germinación
 - 1.3.1 Síntesis de proteínas
 - 1.3.2 Síntesis de ARN
- 1.4 Factores que afectan la integridad de la semilla. Viabilidad y vigor.
- 1.5 Bases bioquímicas del deterioro
 - 1.5.1 Daño al ADN
 - 1.5.2 Efecto del deterioro de las semillas en la síntesis de ATP y en la respiración.
 - 1.5.3 Deterioro de los sistemas de síntesis de proteínas.
- 1.6 Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre viabilidad e integridad de los sistemas de síntesis de ADN en ejes embrionarios de maíz.

II. HIPOTESIS

III. OBJETIVO

IV. MATERIALES Y METODOS

- 4.1 Materiales
 - 4.1.1 Material biológico
 - 4.1.2 Soluciones amortiguadoras y reactivos-
empleados
- 4.2 Métodos
 - 4.2.1 Curva de imbibición

- 4.2.2 Determinación de humedad en las semillas.
- 4.2.3 Curva de síntesis de proteínas.
- 4.2.4 Determinación de proteínas totales.
- 4.2.5 Curva de síntesis de ARN.

V. RESULTADOS

- 5.1 Determinación de la capacidad de imbibición de ejes embrionarios de semillas de Zea mays deterioradas.
- 5.2 Determinación del porcentaje de humedad de las semillas.
- 5.3 Capacidad de síntesis de proteínas durante las primeras 15 horas de imbibición en maíz por medición de la incorporación de (³H) metionina a material in soluble en ácido tricloroacético in vivo.
- 5.4 Contenido de proteínas totales en ejes embrionarios de semillas de Zea mays deterioradas.
- 5.5 Capacidad de síntesis de ARN durante las primeras - 15 horas de imbibición en maíz por medición de la - incorporación de (³H) uridina a material insoluble en ácido tricloroacético in vivo.

VI. DISCUSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

A3REVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ARN	Acido ribonucleico.
ARN _m	Acido ribonucleico mensajero.
ARN _r	Acido ribonucleico ribosomal.
ARN _t	Acido ribonucleico de transferencia.
ASB	Albúmina sérica bovina.
ATP	Adenosina 5'-trifosfato.
cpm	Cuentas por minuto.
DOC	Desoxicolato de sodio.
EF	Factor de elongación.
TCA	Acido tricloroacético.
Tris	(Tris - (hidroximetil) - amino metano)

I. INTRODUCCION.

1.1 Generalidades del maíz.

El maíz, cuyo nombre botánico es Zea mays Linnæus pertenece a la familia de las gramíneas; es una planta monoica y nativa de América donde su importancia económica es notable desde hace siglos.

La semilla tiene su origen en un óvulo fertilizado y a medida que éste se desarrolla, pueden distinguirse sus estructuras constitutivas básicas:

- a) Testa o cubierta externa
- b) Endospermo
- c) Embrión

La testa es una barrera física que protege y conserva la integridad de la semilla; el endospermo constituye la reserva de nutrientes que serán utilizados al iniciarse la germinación y el embrión, formado por el eje embrionario y el escutelo, dará origen a la nueva planta. (2, 19).

El maíz es la segunda planta alimenticia más importante del mundo, desde el punto de vista de producción. Con el reciente descubrimiento de dos mutantes de maíz, con alto contenido de lisina, el maíz juega un papel aún más importante en la nutrición humana y animal (2,19).

El almidón es el carbohidrato principal que constituye a la semilla de maíz (aproximadamente 72% del peso seco). Los azúcares libres constituyen del 1 al 3% del peso seco del grano, siendo la sacarosa el más abundante. El contenido en fibra varía entre el 2.1 al 2.3%. El almidón del

maíz ordinario contiene el 25% de amilosa y 75% de amilopectina.

Las proteínas del maíz están principalmente en el endospermo y en el embrión. La distribución de nitrógeno en la semilla de maíz normal es de 81.2% en el endospermo y 15.5% en el embrión. El primer aminoácido limitante en el maíz es la lisina, seguida por el triptófano.

Con respecto a los lípidos cerca del 85% de ellos son triglicéridos de ácidos grasos en la semilla de maíz y el 10% de la energía del maíz proviene del metabolismo de lípidos. Debido a que el ingrediente principal del aceite de maíz es el ácido graso esencial (ac. linoleico), el grano completo de maíz satisface los requerimientos de este ácido graso esencial. Del contenido mineral del maíz, el potasio (K) y el fósforo (P) son los elementos más abundantes (0.35%) y el constituyente mineral más escaso es el calcio (Ca) (0.03%) (2,19,39).

1.2 Germinación

Las semillas son el resultado de la reproducción sexual y constituyen en sí una planta embrionada en un estado disecado en el cual existe muy poca o nula actividad metabólica. Con la semilla se inicia la independencia de la nueva generación de la planta a la que dará origen; la semilla está equipada estructural y fisiológicamente con mecanismos para mantenerse viable y cuenta además con reservas de nutrientes que sostienen a la planta joven hasta que ésta sea autosuficiente.

La semilla posee importantes propiedades tales como la resistencia a variaciones en las condiciones ambientales que la rodean, siempre y cuando no sean extremas. La

semilla también tiene la capacidad de resistir al paso del tiempo conservándose viable o sea manteniendo su capacidad de germinar cuando se le proporcionen el agua y el medio ambiente adecuado.

Una de las propiedades fisiológicas y bioquímicas más sorprendentes en la semilla es que ésta se mantiene viable aunque esté prácticamente deshidratada; el contenido de agua de una semilla puede decaer hasta aproximadamente 10% de su peso y en esta situación muchos de sus organelos celulares se vuelven inactivos. En este estado de semideshidratación es cuando la semilla resiste las agresiones del medio ambiente y en un momento dado puede llevar a cabo una actividad metabólica máxima, crecer y desarrollarse cuando las condiciones sean apropiadas.

Generalmente la actividad metabólica de una semilla se reanuda al imbibirla con agua. En otros casos se requieren de factores ambientales adicionales o bien cambios internos para reactivar la maquinaria metabólica (semillas latentes).

Cuando una semilla viable se moja y absorbe agua, se inician la respiración, síntesis de proteínas y otras actividades metabólicas; después de cierto tiempo el embrión emerge de la semilla y se dice que la semilla ha germinado. Para que se lleve a cabo este suceso debe haber suficiente oxígeno para permitir la respiración y una temperatura adecuada para que los procesos metabólicos involucrados en la germinación se lleven a cabo a una velocidad óptima. El agua es esencial para la rehidratación, la cantidad de agua absorbida por una semilla imbibida depende de factores como la integridad y tamaño de la semilla, el porcentaje de hidratación de la misma, la temperatura, etc.(2).

El patrón de absorción de agua por la semilla presenta 3 fases. El consumo inicial de agua en la fase I es una consecuencia de las fuerzas de hidratación de las paredes celulares de la semilla; esta absorción de agua ocurre de la misma manera si la semilla esta latente o no, y si es o no viable.

La fase I (imbibición) ocurre igualmente bien en tejidos muertos o vivos y por lo tanto es independiente de la actividad metabólica de la semilla, a pesar de que el metabolismo comienza rápidamente como consecuencia de esta hidratación.

La fase II es un periodo lag de absorción de agua; las semillas muertas y las latentes mantienen el nivel de hidratación típico de la fase II, pero a diferencia de las semillas viables no entran a la fase III, la cual esta asociada con germinación visible. La fase II de absorción de agua es un periodo de metabolismo activo en las semillas latentes, de inercia en las semillas muertas y de metabolismo activo en preparación para la germinación en semillas no latentes.

La fase III de absorción de agua esta asociada solamente con germinación y el crecimiento subsecuente, y durante este último periodo la actividad metabólica está incrementada.

La duración de cada una de las fases depende de ciertas propiedades de la semilla como contenido de sustratos que pueden ser hidratados, permeabilidad de las cubiertas de la semilla, el consumo de oxígeno, el tamaño de la semilla, etc.

Las fases del consumo de agua observadas en el total de las semillas son un promedio de todas las partes de la semilla y por lo tanto no se pueden relacionar solamente a la

actividad metabólica del eje embrionario. En semillas pequeñas o embriones aislados el promedio refleja más fielmente los estadios del consumo de agua por todas las células (2,3).

1.3 Bioquímica de la germinación

1.3.1 Síntesis de proteínas

La semilla es considerada un estado intermedio del ciclo vital de las plantas superiores y la habilidad de ésta para germinar determina la propagación de esta planta. La germinación es un proceso muy complejo en el cual toda la maquinaria metabólica de la semilla en reposo es activada. En la semilla, a pesar de su extrema deshidratación, el contenido de humedad desciende de 80-90% a 10% al establecerse, todas las células del embrión y de la aleurona permanecen vivas. El único requerimiento para renovar la actividad de síntesis y la reiniciación del crecimiento del embrión y su desarrollo es la adición de agua.

La desecación cambia radicalmente la subsecuente actividad bioquímica de las células vivas del embrión. Algunas proteínas sintetizadas durante el desarrollo de la semilla dejan de producirse y cuando la semilla entra en contacto con agua nuevamente, otras proteínas esenciales para la germinación son producidas (12).

Debido a que la germinación implica elongación y división celular, es obvio que se requiere síntesis de proteínas para que se lleve a cabo este proceso. Por consiguiente, y basándonos en la afirmación anterior, la síntesis de ADN es indispensable así como su transcripción y traducción. Actualmente se sabe que la síntesis de ADN es un evento ligeramente tardío en la germinación y es precedido por

síntesis de proteínas y ARN, eventos que ocurren a una velocidad considerable en los estadios más tempranos de la germinación del embrión de la semilla (12).

La síntesis de proteínas no se lleva a cabo en la semilla seca; pero comienza cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el ARN mensajero.

La iniciación de la síntesis proteica en el embrión de trigo, que es el sistema que se ha estudiado más extensamente en plantas, consiste en la unión de la subunidad ribosomal pequeña (40S) y la molécula de transferencia iniciadora (metionil-tRNA) al sitio de iniciación con el mRNA. Después de la formación de este complejo de iniciación, se une la subunidad ribosomal grande (60S) y comienza la síntesis de proteínas. La formación del complejo de iniciación requiere de factores protéicos solubles (presentes en el citoplasma de células de embrión de trigo-semillas secas) GTP y quizás ATP. Otros factores solubles de naturaleza proteica se requieren para la transferencia de los aminoacil-tRNA a sus codones apropiados en el complejo ribosomal-ARNm, y mover el mensaje a través del ribosoma; éstos son los factores de transferencia o elongación, los cuales necesitan GTP para su actividad (2).

La síntesis de proteínas se ha detectado pocos minutos después de iniciada la imbibición de las semillas en algunas especies, pero en otras se ha detectado después de horas. Puesto que las técnicas más usadas para la detección de síntesis de proteínas dependen de la incorporación de aminoácidos radiactivos (usualmente con ^{14}C o ^3H) a las cadenas polipeptídicas en crecimiento, es claro que la disponibilidad de los aminoácidos en los sitios de síntesis en la semi-

lla puede ser un factor limitante. En las semillas grandes intactas el tiempo que transcurre para la imbibición con agua y la subsecuente distribución de los precursores radioactivos exógenos a través de todos los tejidos puede considerarse mayor que el tiempo que toma esto en semillas más pequeñas, en embriones extraídos o bien en ejes embrionarios. La permeabilidad de las capas de las semillas y otras estructuras que las rodean es también un factor que afecta el consumo de los precursores radiactivos.

Ejes embrionarios de Phaseolus benalvus, Phaseolus vulgaris y embriones aislados de centeno, arroz y trigo comienzan síntesis de proteínas entre los 30 y 60 minutos después de introducidos en agua. Los polisomas y polirribosomas considerados como el complejo activo de síntesis de proteínas compuesto de varios ribosomas unidos a mRNA están ausentes de los tejidos de la semilla seca, y su formación en la imbibición se acompaña de una disminución en el número de ribosomas libres o sin unir. La actividad de polisomas en embriones de trigo se ha determinado mediante la medición de la habilidad de una fracción ribosomal extraída (que contiene ribosomas libres y polisomas) para catalizar la síntesis protéica in vitro. Se ha encontrado que el sedimento o botón ribosomal extraído de embriones secos es incapaz de llevar a cabo síntesis protéica en sistemas libres de células. La absorción de agua por el embrión de trigo ocurre rápidamente y después de sólo 10-15 min. se manifiesta la capacidad de síntesis protéica. Ribosomas libres y no polisomas son los que están presentes en el embrión seco; y los polisomas se forman a los 15 min. de imbibición. Las fracciones citoplásmicas o post-ribosomales obtenidas de semillas secas de cacahuete y trigo

pueden efectuar síntesis de proteínas in vitro al añadir ribosomas y mRNA (polisomas) y ATP/GTP; de ésto se concluye que los componentes citoplásmicos esenciales para la síntesis de proteínas (ej. factores de iniciación y elongación, tRNA, aminoácidos, aminoacil tRNA) deben estar presentes en la semilla seca en suficientes cantidades que permitan la reanudación de la síntesis de proteínas en las semillas al imoibir (2,3.).

1.3.2 Síntesis de ARN

La interrogante acerca de si la síntesis de proteínas de la semilla recién imoibida precede o no a la síntesis de ARN, particularmente el mensajero, ha llevado a los investigadores a estudiar estos sistemas más a fondo. Se ha obtenido una fracción celular a partir de embriones secos de trigo, la cual puede estimular la síntesis de proteínas in vitro, tiene características de mRNA y se ha llamado la fracción mensajera. Durante los primeros minutos de imoibición hay un aumento en la actividad de la fracción mensajera (FM) en el embrión, la cual declina rápidamente hasta ausentarse por completo en embriones imoibidos por tres horas. A medida que la actividad de FM decrece, los polisomas aumentan. Lo anterior nos indica que el mRNA almacenado está presente en el embrión seco en FM (probablemente asociado a proteínas), y que éste se une rápidamente a ribosomas durante la imoibición temprana, formando el complejo de polisoma activo que sintetiza proteínas y por ésto se observa el decremento de actividad de mRNA en FM. (2,6,-10,15,25).

Otra posibilidad es que la FM sea degradada al mismo tiempo que se forman complejos polisomales con mRNA

recién sintetizado. Aún más, se ha demostrado que embriones de trigo pueden sintetizar mRNA momentos después de que se inició la imbibición, y el análisis de un extracto ribosomal/polisomal de embriones de trigo imbibidos por 0.5 a 1.5 horas en amortiguador con uridina radiactiva demuestra que existe mRNA de novo asociado a polisomas. Pero a pesar de estas observaciones, el hecho que los polisomas se formen cuando se inhibe en un 90% la síntesis de ARN con inhibidores químicos, nos hace pensar que la síntesis de novo de mRNA no es esencial para reanudar la síntesis de proteínas durante la primera hora de imbibición. Se ha observado que para la activación de mRNA recién sintetizado antes de que intervenga en síntesis de proteínas es necesaria la presencia de secuencias de residuos de ácido poliadenílico (poli A). La cordicepina (droga que inhibe síntesis de ARN, suprime la reacción de poliadenilación, evita la activación de mRNA y su asociación con ribosomas para formar polisomas) en concentraciones efectivas durante la imbibición de embriones de trigo, no evita la formación de polisomas; de lo que se concluye que el mRNA almacenado en el embrión seco, se usa para la síntesis temprana de proteínas, está activado y no requiere adenilación.

Spiegel y Marcus (1975)(35) demostraron que el incremento rápido inicial en la síntesis de proteínas en ejes embrionarios de trigo que ocurre durante la imbibición, es independiente de mRNA sintetizado de novo. Esta conclusión se obtuvo mediante experimentos usando cordicepina o α -amanitina a niveles suficientes para inhibir transcripción y poliadenilación, y el hecho de adicionar estas sustancias no evitó el incremento del contenido de polirribosomas durante la imbibición. Estos investigadores también conclu-

yeron que la síntesis de novo de proteínas al iniciarse la germinación (los primeros 40 min.) en embriones de trigo está mediada por mRNA preformado que fue transcrito durante la embriogénesis.

En resumen, en los ejes de trigo recién imbibidos hay síntesis de novo y activación de mRNA pero la síntesis de proteínas se puede llevar a cabo sin que se presenten estos hechos. Se desconoce aún a partir de qué momento la síntesis de mRNA se vuelve esencial para la síntesis de proteínas. (2,6,10,15,25).

Sen y colaboradores (1975) trabajaron con embriones de centeno y mediante técnicas de extracción y purificación, seguidas por fraccionamiento electroforético en geles de poliacrilamida, detectaron la presencia de distintos tipos de ARN a medida que el tiempo de imbibición avanzaba: a los 10 min encontraron ARN heterogéneo 4S y 5S (sensible a ribonucleasas); a los 40 min ARN 31S, 25S y 22S y a los 60 minutos ARN 18S. (33,34).

Haciendo uso de técnicas autorradiográficas Sen y Osborne (1977) detectaron incorporación de (³H) uridina en ARN nuclear después de 10 minutos de iniciada la hidratación en las células de la coleoriza de los embriones de centeno. Sin embargo, a pesar de que a los 10 minutos de imbibición hay ARN de novo en el núcleo, éste se detecta en el citoplasma hasta los 15 minutos de iniciada la germinación (S. Sen - Mandi; datos no publicados). (34).

Cheung, Wu y Suhaldonik (1979) (11), teniendo como antecedentes reportes que afirmaban que la velocidad relativa de la síntesis de proteínas se incrementa 2.5 a 3 veces durante el periodo lag de imbibición (40 min a 5.5 horas) y al mismo tiempo no había un cambio apreciable en la síntesis

sis de ARN después de los primeros 40 minutos de germinación de embriones de trigo, estudiaron la síntesis de ARN después de los primeros 40 minutos de germinación y obtuvieron resultados que les hace afirmar lo contrario a lo establecido en los antecedentes. (35,36).

Cheung y colaboradores (1979) (11) encontraron un incremento de dos a tres veces en la velocidad de síntesis de ARN durante el periodo lag de germinación en embriones de trigo; este aumento junto con el incremento en la síntesis de proteínas, les llevo a sugerir la posibilidad de que la síntesis de proteínas pueda depender de la síntesis de ARN después de los 40 minutos de iniciada la imbibición.

Al igual que Sen y colaboradores (1975), Cheung, Wu y Suhaldonik (1979) estudian el efecto de inhibidores de síntesis de ARN en la velocidad de síntesis de proteínas pero en embriones de trigo a diferencia de lo hecho por Sen y colaboradores (1975) (33). Los resultados vienen a confirmar que la síntesis de novo de proteínas depende de la síntesis de novo de ARN sólo después de 3 a 4 horas.

Con respecto al maíz, no hay muchos antecedentes; un estudio acerca de la síntesis de ARN durante la germinación se realizó en 1981 por Sánchez de Jiménez, Aguilar y López (32). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la síntesis de proteínas en maíz está respaldada por ARNm preformado durante los estadios tempranos de la germinación. Se concluye que la traducción de mRNA sintetizado de novo está retardado con respecto a estudios realizados en trigo, puesto que el efecto de α -amanitina en ejes embrionarios de maíz es notable hasta las 18 a 24 horas de imbibición, mientras que en embriones de trigo se detecta después de 5 horas de imbibición.

Van de Walle y colaboradores (1976) (37) realizaron un estudio de síntesis de ARN durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Ellos utilizaron métodos bioquímicos y autorradiográficos y reportaron que la mayoría de las moléculas de ARN sintetizadas en la radícula durante la primera hora fueron ARN heterogéneo. Las autorradiografías obtenidas les sugieren que una fracción de ARN heterogéneo nuclear recién sintetizado después de iniciada la imbibición es rápidamente procesado y traslocado al citoplasma y quizá incorporado a los polisomas.

Fue hasta 1983, cuando Domes y Van de Walle aclararon y confirmaron su suposición anterior al determinar el tiempo aproximado en el que el mRNA recién sintetizado aparecía en el aparato traductor de los ejes embrionarios de maíz al germinar. Dos horas después de iniciada la imbibición en presencia de uridina radiactiva, se pudieron encontrar moléculas de ARN marcadas en los polisomas; se determinó en una electroforesis en gel que su tamaño correspondía a 16S y cerca del 60% de estas moléculas estaban poliadeniladas. Se demostró también que moléculas de ARN polisomal poliadenilado son ARNm al ser capaces de servir como template en un sistema de traducción libre de células dependiente de ARNm. Por lo tanto, concluyeron que se trataba de ARNm sintetizado de novo; los resultados indican también que ARN heterogéneo nuclear, que es la especie de ARN más abundante durante las primeras horas de germinación del maíz, es rápidamente procesado a ARNm funcional, traslocado al citoplasma y traducido. Este proceso ocurre muy pronto después de iniciada la imbibición y antes de que se termine el periodo inicial de absorción de agua por ejes embrionarios de maíz, que lleva cerca de 3 a 4 horas.

Otro hallazgo importante de estos investigadores, es que el tiempo requerido para la llegada de ARN ribosomal sintetizado de novo al citoplasma es mayor que el requerido para el ARNm, puesto que se detecta la traducción de ARNm sintetizado de novo cuando existen muy pocos ribosomas preformados incorporados a los polisomas (15).

Los resultados obtenidos por estos investigadores sugieren que el ARNm sintetizado de novo es traducido - mucho antes de lo determinado por experimentos usando inhibidores de la traducción. Una posible explicación de la diferencia entre los resultados obtenidos por Sánchez de Jiménez y col. (1981) (32) y los obtenidos por Dommes y col. (1983) (15) es el hecho de que las técnicas utilizadas fueron diferentes y por lo tanto su sensibilidad también.

1.4 Factores que afectan la integridad de la semilla. Viabilidad y vigor.

Una semilla que no germina cuando se le proporciona agua y ambientes adecuados para su reactivación, ha perdido viabilidad. La pérdida de viabilidad en semillas en estado seco es un hecho que se refleja en la germinación a través de un vigor y un porcentaje de germinación disminuidos. Durante el periodo en que la semilla permanece seca, - se llevan a cabo cambios lentos en las células vivas, que - dan como resultado una pérdida de vigor y viabilidad del embrión, que se dice son efectos del envejecimiento de la semilla.

Los factores que influyen sobre la longevidad - de las semillas en almacenamiento son la temperatura, la humedad y la presión de oxígeno. En general, a menor temperatura y humedad es mayor el periodo de viabilidad de la semi

lla y para muchas especies a mayor presión de oxígeno es menor el periodo de viabilidad (3).

Relación entre la pérdida de viabilidad y ambiente de almacenamiento:

1.- Por cada 1% de disminución en el contenido de humedad de la semilla, la vida (en almacenamiento) de la semilla se duplica (según Roberts es por cada 2% de decremento de humedad) (3).

2.- Por cada 5.0% de decremento en la temperatura de almacenamiento de la semilla, la vida de almacenamiento se duplica.

3.- La suma aritmética de la temperatura (°F) y el porcentaje de humedad relativa de almacenamiento no debe exceder de 100 y la temperatura no debe exceder a la mitad de la suma.

Las semillas son bastantes resistentes a condiciones externas extremas, siempre y cuando estén en estado de desecación y como resultado de éste conservan íntegra su viabilidad o capacidad de germinar. El tiempo que la semilla se conserve viable dependerá de su información genética, y de las condiciones de almacenamiento. En general la viabilidad se conserva mejor bajo condiciones en que la actividad metabólica de las semillas esté más reducida, ejemplos: bajas temperaturas y elevada concentración de CO₂. Los factores ambientales tienen un efecto decisivo en la duración de la vida de la semilla; éstos determinarán si la semilla se conserva viable el periodo fijado genéticamente o bien pierde la viabilidad en un tiempo más corto (20).

Los tratamientos a los que está sometida la semilla durante la cosecha y post-cosecha afectan y dan lugar a la pérdida de viabilidad. Los daños mecánicos durante la

cosecha pueden reducir considerablemente la viabilidad de algunas semillas que son más susceptibles, otras como el arroz y trigo son más resistentes a este tipo de daño, seguramente debido a su capa protectora más resistente. Las semillas esféricas y pequeñas tienden a estar más protegidas al daño durante la cosecha que aquellas semillas alargadas o de forma irregular. Durante el almacenamiento, - las zonas dañadas o perforadas de las semillas sirven como centro para infecciones y provocan un envejecimiento a celerado. Esto también promueve el decaimiento y muerte temprana de los tejidos vecinos normales. Temperaturas elevadas durante el secado de la semilla o bien un secado muy rápido o excesivo puede reducir la viabilidad (20,38).

1.5 Bases bioquímicas del deterioro

En centeno, como en la mayoría de las gramíneas, la germinación ocurre más rápidamente mientras menor tiempo de cosechada tenga la semilla. La velocidad de síntesis de proteínas por embriones aislados (medidas por incorporación de precursores radiactivos en las primeras horas de imbibición) es mayor en este material recién cosechado. Si la semilla es almacenada o sometida a condiciones no favorables como alta temperatura y humedad, la germinación de la semilla se retrasa y la capacidad del embrión para sintetizar proteína se reduce (25).

En términos bioquímicos la pérdida de vigor se debe a un decremento en la actividad mitocondrial, actividad disminuida de las enzimas respiratorias y una baja producción de ATP. Estos sucesos se pueden relacionar a cambios estructurales de una gran variedad de membranas en la célula. A pesar de que estas alteraciones son factores que contribuyen -

a la pérdida de vigor en semillas almacenadas, una lesión mayor es el fallo progresivo del sistema de síntesis de proteínas (Sen y Osborne 1977) (34).

El deterioro en semillas, resultado de tratamientos post-cosecha, entre ellos almacenamiento en condiciones adversas, trae como consecuencia la producción de semillas (envejecidas) con síntomas de deterioro como son cambio de color de la semilla o del embrión, retardo del surgimiento de la radícula, disminución en el porcentaje de germinación, disminución en la tolerancia a condiciones no óptimas durante la germinación y/o el crecimiento, aumento en el número de semillas anormales, baja tolerancia a condiciones adversas de almacenamiento, mayor sensibilidad a tratamientos de radiación, etc. (34).

1.5.1 Daño al ADN

De Vries (1901) fué el primero que se preguntó si la causa de una germinación disminuída pudiera ser un cambio en el ADN. Posteriormente se relacionaron una serie de aberraciones cromosomales con plantas originadas de semillas de baja viabilidad y semillas envejecidas (9,13).

En centeno, el contenido total de ADN por embrión seco y por núcleo en las células de embriones secos ha sido examinado por distintas técnicas, y los resultados indican que el contenido total de ADN se conserva a través de la pérdida de viabilidad en la semilla seca y no hay pérdida detectable de ADN total por núcleo en embriones de 0% de viabilidad (24). A pesar de que los niveles totales de ADN permanecían constantes con el tiempo, estudios del peso molecular del ADN extraídos de embriones de centeno muestran cambios progresivos en la integridad del ADN con la

pérdida de viabilidad. A través de la técnica de extracción de núcleos, seguida de lisis y fraccionamiento de ADN en un gradiente alcalino de densidad de sacarosa demostraron claramente que el ADN de embriones con baja viabilidad sedimenta a una posición de peso molecular menor en dicho gradiente. La presencia de fragmentos de ADN de peso molecular bajo en el núcleo de embriones de 0% de viabilidad comparados con los de 95% de viabilidad también puede ser detectado a través de migración de ADN en geles de poliacrilamida, se encontró una fragmentación extensa en el ADN de embriones de 0% de viabilidad durante las primeras 18 horas de imbibición en condiciones desnaturalizantes (urea 7M) (24,25). Para comprobar que los cortes en la cadena sencilla no son resultado de una actividad de endonucleasa en los procesos de extracción y fraccionamiento de ADN, se demostró la presencia de los cortes en el ADN nuclear en centeno durante la pérdida de viabilidad usando la técnica de Modak y Bollum (1972), en donde se agregan (^3H) dCTP y 3'-OH desoxinucleotidil transferasa a secciones microscópicas de tejido imbibidas en cera (evitando acción de endonucleasa), y se sintetizan extremos de (^3H) poli (dC) en una cadena sencilla con 3'-OH terminal; se sigue el proceso de una autorradiografía y aparecen granos de plata reducida sobre el núcleo, en proporción al número de extremos o colas poli (C), y por lo tanto también en proporción al número de cortes en la cadena sencilla del ADN (22).

El daño a la integridad del ADN afectará la efectividad del genoma nuclear como un templete durante la transcripción para la formación del nuevo ARN cuando el embrión se imbebe con agua. Si el ADN está fragmentado y suponiendo que sea una secuencia única, se llevará a cabo una -

transcripción incompleta y por lo tanto la proteína para la cual este ARNm defectuoso codifica no será sintetizada o bien se sintetizará parcialmente. Si esta proteína resulta ser esencial para la reactivación metabólica de la semilla al imbibirse, la germinación no se llevará a cabo (17,24,-25).

Debido a que la pérdida de viabilidad es más rápida a altas temperaturas y humedades, se propone que la causa de esto es la activación de una nucleasa que rompe al ADN dando lugar a fragmentos de ADN de bajo peso molecular. Se ha detectado una actividad mayor de ADNasa en la fracción sobrenadante de embriones no viables con respecto a embriones viables (Cheah y Osborne 1978) (9,23).

El centeno contiene un ADN organizado en forma de nucleosomas (subunidades repetidas de núcleo proteínas - ADN e histonas -) y esta subestructura no se pierde en embriones no viables. Comparando la distribución del ADN del núcleo debido a su peso molecular en embriones no viables y viables, se observa que el ADN en los dos tipos de embriones migra casi igual, sin embargo en el ADN de los embriones no viables se observa un componente disperso adicional que no es ARN y es de mayor peso molecular que el monómero del nucleosoma y que migra en el gel más que la otra fracción. Este barrido es resultado de rupturas a cadenas sencillas o dobles de ADN. Por lo tanto, los nucleosomas están presentes en el núcleo de embriones no viables, pero el patrón de fragmentación irregular nos indica que el complejo histona-ADN no está intacto. Pruebas para nucleasas en embriones de centeno de diferentes grupos de semillas muestran que la actividad de ADNasa en sobrenadantes post-ribosomales de un mismo número de embriones es ma

yor en embriones no viables que en viables, a pesar de su contenido más bajo en proteínas (9,24).

Ya que hay evidencia de la ausencia de síntesis de proteína en estos embriones secos, la diferencia puede deberse a una forma de activación durante el almacenamiento de una enzima latente preformada, o que es más estable en embriones no viables. No se ha localizado la actividad de ADNasa en la célula de centeno, pero debido a que el ADN de embriones de centeno es roto en el núcleo, puede pensarse que la actividad de nucleasa está localizada en el núcleo (9,23,24).

Debido a que el ADN de peso molecular alto puede aislarse de núcleos de embriones no viables, aún después de ser imbibidos por 18 horas, estas nucleasas deben de tener una baja velocidad de actividad in vivo, por lo tanto la acumulación de cortes en el ADN de los embriones de semillas secas es un proceso lento y gradual.

1.5.2 Efecto del deterioro de las semillas en la síntesis de ATP y en la respiración.

La actividad mitocondrial en semillas, embriones y ejes embrionarios viables aumenta con el tiempo después de empezada la imbibición, así mismo un acoplamiento más eficiente en la síntesis de ATP y mayor consumo de oxígeno.

En embriones de centeno, arroz y maíz no viables, se observa una apariencia anormal en la ultraestructura de la mitocondria observándose un tamaño mayor y a los 2 ó 3 días ocurre una lisis completa. En cambio, estos organelos en embriones viables se vuelven más organizados en el proceso de germinación. Las semillas de maíz que no

puedan germinar consumen poco oxígeno; actualmente se ha que rido correlacionar la disminución en la actividad de enzimas respiratorias con un intercambio gaseoso reducido. Además, - las semillas de maíz no viables contienen niveles disminuí - dos de citocromo oxidasa, deshidrogenasa alcohólica y deshi - drogenasa láctica. No se conoce hasta qué punto la disminu - ción de actividad de enzimas respiratorias contribuye al de - terioro del proceso respiratorio; pero se ha observado ac - - tualmente que la producción de algunas enzimas e isoenzimas - respiratorias se lleva a cabo en embriones viables, pero no - en los no viables. Por lo tanto, la incapacidad de produ - - - cción y activación de enzimas respiratorias se asocia con la pérdida de viabilidad (3,34).

1.5.3 Deterioro de los sistemas de síntesis de proteínas

Además de las alteraciones descritas que ocurren en semillas no viables, y que contribuyen importantemente a la pérdida de vigor de semillas almacenadas, una de las le - siones principales es el deterioro del sistema de síntesis - de proteínas (34).

Roberts y Osborne (1973) (30) trabajaron con cen - teno (Secale cereale L.) y encontraron que la velocidad de síntesis de proteínas en las primeras horas de germinación - está íntimamente relacionada con la función y capacidad de - germinar de la semilla y puede considerarse como un índice de vigor del embrión.

Roberts, Payne y Osborne (1973) (29) detectaron - a través de la medición de la incorporación de aminoácidos - radioactivos a material insoluble en TCA, el tiempo aproxima - do de iniciación de síntesis de proteínas en embriones de - centeno y los resultados indican que ésto ocurre a los 10-15

minutos de inbibición. Usando análisis por autorradiografía (S. SenMandi; datos no publicados), pueden distinguirse - gránulos de plata en el citoplasma de las células de la coleoriza 10 minutos después de iniciada la imbibición.

Roberts, Payne y Osborne (1973) (31) teniendo como antecedente el hecho de que embriones de centeno no viables no eran capaces de incorporar aminoácidos a proteínas durante las primeras horas de germinación, decidieron estudiar la integridad de algunos de los componentes del sistema de síntesis de proteínas. Estos investigadores encontraron que componentes del sobrenadante post-ribosomal y de las fracciones ribosomales en embriones de centeno no viables - están alteradas pues no eran capaces de llevar a cabo síntesis de polifenilalanina en sistemas libres de células que - contenían poli (U). El daño en el sobrenadante no se encontraba en el ARNt o en la enzima aminoacil-tRNA sintetasa, - sino en la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, encontrándose fragmentación y degradación de ARNr 18S y 25S de los - ribosomas. (31). Por lo que concluyen que las lesiones en - la fracción sobrenadante y en los ribosomas son las causantes de la síntesis de proteínas defectuosa en las primeras horas de la germinación en centeno. Así mismo, sugieren que el desarrollo de estas lesiones durante el almacenamiento - del grano podrían contribuir al envejecimiento y pérdida de viabilidad de embriones de centeno.

Posteriormente, Sen y Osborne (1977) extienden el estudio anterior a síntesis de ARN. Confirman que una - disminución en la síntesis de proteínas y una germinación - lenta están relacionadas con pérdida de viabilidad en em -- briones de centeno. Sus resultados muestran que la incorporación de precursores a las clases más abundantes de ARN es

tá disminuída y que el procesamiento del precursor ARNr a - ARN 25S y 18S está retardado. Finalmente sugieren que el ARN sintetizado tempranamente en la germinación podría jugar un papel importante en la determinación de la capacidad de síntesis de proteína en las primeras horas de germinación, y - por lo tanto podría regular la velocidad de germinación (10, 27,36).

Otros estudios realizados en embriones de centeno (Secale cereale) no viables, con ejes embrionarios de - chícharo de campo (Pisum arvense), de soya y de roble in -- glés (Quercus robur) (3) no viales encontraron datos similares a los obtenidos por Roberts y col. (1973) (31).

Esta incapacidad de sintetizar proteínas es a - compañada por una gran pérdida de la capacidad de sinteti - zar ARN en embriones de centeno, soya y en ejes embriona - rios de chícharo (3).

En centeno, chícharo y soya, la pérdida de via - bilidad y capacidad de síntesis de proteínas es una conse - cuencia del mecanismo de transcripción errónea; por lo tanto es posiblemente una consecuencia del daño al ADN o bien de la ARN polimerasa.

Las fracciones sobrenadantes ribosomales y post-ribosomales, (ésta última contiene componentes citoplásmicos utilizados en la síntesis de proteínas, ej. factores de elon - gación e iniciación, y enzimas aminoacídicas) extraídas de embriones de centeno seco no viables poseen una capacidad re - ducida para catalizar síntesis de proteínas in vitro por un ARNm sintético (poli-U) comparada con fracciones similares de embriones viables.

La actividad de los ribosomas extraídos de em -- briones no viables se ve reducida a un 60% con respecto a --

los ribosomas de embriones viables; ésta reducción posible - mente es el resultado de modificaciones estructurales al ri - bosoma o por pérdida de una o más especies de ARNr o proteí - nas ribosomales (31,34).

Una lesión mayor se localiza en la fracción post - ribosomal, específicamente en la actividad de los factores - de elongación (EF). EF 1 actúa para enlazar el aminacil - tRNA al sitio de recepción (sitio A) de un ribosoma como - metido a la síntesis de proteínas, y EF 2 causa la transloca - ción de ARNm a través del ribosoma durante el proceso de tra - ducción (2,3).

En embriones de centeno seco no viables, la acti - vidad del EF 1 está ausente, mientras que la actividad de EF 2 es sólo del 50% de la de los embriones viables.

En trigo se encontró que la actividad EF 1 dismi - nuye en embriones durante el envejecimiento debido a modifi - caciones en sus propiedades moleculares (2,3,31,34).

Otra lesión encontrada en centeno es la reducción de síntesis de ATP (y posiblemente GTP) en semillas no via - bles, y este hecho puede afectar la síntesis de ARN y proteí - nas debido a la relación existente entre los niveles de nu - cleósido trifosfato en semillas y su capacidad para llevar a cabo las funciones metabólicas esenciales.

Finalmente, Blowers y colaboradores (1985) repor - taron estudios acerca de la integridad del aparato de síntesis de proteínas en embriones de alto y bajo vigor germina - dos a temperaturas subóptimas de 10°C, con el fin de identi - ficar las lesiones que contribuyen a la reducción en la velo - cidad de síntesis de proteínas observada en embriones de tri - go de bajo vigor durante los estadios tempranos de la germi - nación. La utilización de temperaturas subóptimas para la -

germinación se hizo con el fin de imitar un factor de stress común en la naturaleza y basado en los reportes de Blowers - (1980) en los que afirma que se provoca una disminución aún mayor en la síntesis de proteínas de embriones de bajo vigor cuando germinan a temperaturas subóptimas que el decremento observado a temperaturas normales; es decir, se acentúa la alteración en la maquinaria metabólica disminuyendo aún más la capacidad de síntesis de proteínas de las semillas dañadas. Estos investigadores concluyen que la reducción en la velocidad de síntesis de proteínas puede atribuirse en parte a la disminución considerable en la síntesis y niveles de ARN poli A⁺, las lesiones en la actividad e integridad de ribosomas y en la actividad de la aminoacil-tRNA sintetasa.(4).

Por lo tanto, puede concluirse que, el daño o alteración de un número importante de eventos metabólicos está asociado a la pérdida de viabilidad. Puede afirmarse también que el deterioro no se lleva a cabo sobre una función celular específica, pero se manifiesta en una variedad de formas que finalmente impiden una germinación óptima.

1.6 Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre viabilidad e integridad de los sistemas de síntesis de ADN en ejes embrionarios de maíz.

Miranda Man, L. (1984)(21) reporta que durante la pérdida de viabilidad de los ejes embrionarios de maíz - (variedad Chalqueño), se presenta fragmentación del ADN. Existe semejanza en cuanto a la falta de integridad del material genético entre los ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad y ejes embrionarios de semillas dañadas por luz ultravioleta. Se demostró también que hay un incremento en la síntesis temprana de ADN en ejes embrionarios de baja

viabilidad y en los dañados por luz ultravioleta, por lo que se sugiere que antes de iniciarse la replicación del ADN en estos ejes, existe un proceso de tipo reparativo del ADN durante las primeras horas de imbibición lo cual permite que la germinación pueda llevarse a cabo.

García Rendón, M. (1985) (16) reportó que tratamientos con temperatura y/o humedad altas producen deterioro en las semillas de maíz Chalqueño, que se refleja en disminución de viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas y parece estar relacionado con la integridad del ADN. Otro hallazgo importante es el hecho de que en semillas tratadas dos días a 60°C y seis días a 40°C con humedad saturante, se presenta una caída considerable en la incorporación de material radioactivo ((³H) Timidina) desde las primeras horas de germinación, por lo que sugieren que ha sido afectado el aparato de síntesis de ADN con los dos tratamientos de las semillas y que no hay reparación del daño durante las primeras 15 horas de germinación.

López, S. (1985) determinó la viabilidad, vigor, integridad y la síntesis de ADN en semillas de maíz Sonora V-524 y Sonora V-526 deterioradas por los tratamientos de dos días a 60°C y seis días a 40°C con humedad saturante, que de acuerdo con lo reportado por García Rendón, M. (1985), afectaban drásticamente las semillas de maíz Chalqueño.

Los resultados obtenidos muestran que el maíz variedad Sonora V-524 se ve afectado grandemente en su capacidad de síntesis de ADN cuando se le somete a tratamiento de 6 días a 40°C con humedad saturante. Curiosamente, este daño no se refleja en la viabilidad de la semilla, puesto que conserva una capacidad de germinar del 94%. El tratamiento que consiste en 2 días a 60°C no altera la curva de síntesis de

ADN de ejes embrionarios de maíz Sonora V-524 y su viabilidad es de 96% .

Con respecto al maíz Sonora V-526, los resultados indican que el tratamiento que más altera la síntesis de ADN es el de 2 días a 60°C (75% de disminución en la incorporación del precursor radioactivo a las 15 horas de iniciada la germinación) y en este caso la viabilidad es del 18%. Las semillas sometidas al tratamiento de 6 días a 40°C con humedad-saturante afecta la capacidad de síntesis de ADN en menor grado que el tratamiento anterior (30% de disminución en la incorporación del precursor radioactivo a las 15 horas de iniciada la germinación) y la viabilidad en este caso es del 78%.

Teniendo como antecedentes estos resultados, consideramos interesante el estudiar la capacidad de síntesis de ARN y de proteínas en las tres variedades estudiadas - Chal - queño, Sonora V-524 y Sonora V-526 -, para poder así tener un panorama más completo de los efectos del deterioro sobre los distintos procesos metabólicos que se desarrollan al iniciarse la germinación en tres variedades de maíz.

II. HIPOTESIS

En base a la información sobre la existencia de una relación entre ciertas lesiones bioquímicas y pérdida de viabilidad en variedades tales como centeno, chícharo de campo, soya, trigo y roble inglés, consideramos la posibilidad de que en maíz se presente relación entre la capacidad de síntesis de ARN y proteínas y la pérdida de viabilidad provocada por condiciones de deterioro artificiales.

Proponemos la existencia de un comportamiento de mayor resistencia al deterioro de las semillas provenientes de regiones de climas extremos con respecto de las originarias de regiones de climas templados.

III. OBJETIVO

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue conocer los cambios en la capacidad de síntesis de proteínas, de ARN y en el contenido protéico total en ejes embrionarios de maíz durante las primeras 15 horas de germinación como consecuencia de tratamientos de deterioro artificiales que pretenden imitar el deterioro que sufren las semillas sujetas a condiciones de almacenamiento inadecuadas. Otra meta es tratar de comprobar si existe o no una relación entre la resistencia a condiciones de deterioro artificial y el ambiente climatológico de las regiones de origen de las semillas.

El propósito del estudio de la capacidad de síntesis de proteínas es ampliar el conocimiento de los efectos del deterioro sobre los diferentes procesos metabólicos que se disparan en las etapas tempranas de la germinación en tres variedades de maíz.

Para el desarrollo de este proyecto los objetivos específicos son los siguientes:

- 1.- Determinación del patrón de absorción de agua de ejes embrionarios de semillas tratadas y no tratadas.
- 2.- Determinación del porcentaje de humedad de semillas tratadas y no tratadas.
- 3.- Determinación de curvas de síntesis de proteínas de ejes embrionarios de semillas tratadas y no tratadas.
- 4.- Cuantificación de proteínas totales de ejes embrionarios de semillas tratadas y no tratadas.
- 5.- Determinación de curvas de síntesis de ARN de ejes embrionarios de semillas tratadas y no tratadas.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Consiste en semillas de maíz correspondientes a tres variedades:

1. Chalqueño
2. Sonora V-524
3. Sonora V-526

Estas semillas fueron proporcionadas por PRO-NASE, SARH (Productora Nacional de Semillas) al Departamento de Bioquímica Vegetal de la DEPg de la Facultad de Química. En el presente estudio se sometió a las semillas de maíz de las tres variedades a dos tipos de tratamiento: 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con humedad saturante. Las viabilidades de las semillas * utilizadas son las siguientes:

<u>Variedad</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Viabilidad(%)</u>
Chalqueño	Ninguno (control)	95
Chalqueño	2 días 60°C	67
Chalqueño	6 días 40°C con humedad saturante	50
Sonora V-524	Ninguno (control)	100
Sonora V-524	2 días 60°C	96
Sonora V-524	6 días 40°C con humedad saturante	90
Sonora V-526	Ninguno (control)	96

* Datos proporcionados por López, S. (Depto. de Bioquímica Vegetal de la DEPg de la Facultad de Química).

<u>Variedad</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Viabilidad(%)</u>
Sonora V-526	2 días 60°C	18
Sonora V-526	6 días a 40°C con humedad saturante	78

4.1.2 Soluciones amortiguadoras y reactivos empleados

4.1.2.1 Solución amortiguadora para imbibición

KCl	50 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris-HCl	50 mM	pH 7.6
Sacarosa	2%	

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Cloranfenicol 10 µg/ml

(³H) Metionina 5 µCi/ml Actividad específica
74 Ci/µmol
(síntesis de proteínas)

(³H) Uridina 10 µCi/ml Actividad específica
30 Ci/µmol
(síntesis de ARN)

4.1.2.2 Líquido de centelleo

1,4-bis (2-(5 Feniloxazolil)) -benceno (M ₂ PPO) 0.1g	
2,5 Difeniloxazol (PPO)	5.0g
Tolueno	1000ml

4.1.2.3 Reactivos para la determinación de proteínas -
totales en extractos por el método modificado-
de Lowry (Peterson, 1977), (2o).

4.1.2.3.1 Reactivo A para la determinación de proteí-
nas totales por el método modificado de -
Lowry (Peterson, 1977).

Se mezclan partes iguales de una solución -
de NaOH 0.8 N. Dodecil sulfato de sodio al-

10%, agua destilada y solución base de cobre-tartrato-carbonato (CTC).

Solución de CTC

Na ₂ CO ₃	10%
Cu SO ₄ .5 H ₂ O	0.1%
Tartrato de sodio y potasio	0.2%

Estable por dos meses a temperatura ambiente.

4.1.2.3.2 Reactivo 3 para la determinación de proteínas en los extractos por el método modificado de Lowry (Peterson 1977).

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1 volumen
Agua destilada	5 volúmenes

4.1.2.3.3 Soluciones complementarias para la determinación de proteínas en los extractos por el método modificado de Lowry (Peterson 1977).

Desoxicolato de sodio	0.15%
Acido Tricloroacético	72.0%

4.1.2.3.4 Solución patrón proteica para construcción de la curva patrón de proteínas.

Solución stock de ASB	1 mg/ml
-----------------------	---------

4.2 Métodos

4.2.1 Curva de imbibición

4.2.1.1 Imbibición de ejes embrionarios.

Ejes embrionarios fueron extraídos de semillas secas de las siguientes variedades de maíz: Chalqueño, Sonora

V-524 y Sonora V-526 procedentes de lotes de semillas no tratadas, tratadas 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con humedad saturante. Cada muestra contenía 10 ejes embrionarios y fueron pesadas.

Los conjuntos de ejes embrionarios se colocan entre dos discos de papel filtro estériles dentro de tubos de cultivo o viales estériles y se les agrega 250 ul de amortiguador para imbibir (4.1.2.1) por muestra. Los ejes se incuban por los siguientes periodos: 0, 5, 10 y 15 horas a 27°C. A lo largo de la incubación los tubos permanecen cerrados con el fin de evitar la desecación.

Al cumplirse los distintos tiempos de incubación, se sacan los ejes embrionarios del tubo de cultivo donde se incubaron, se elimina el exceso de solución amortiguadora y se pesan.

4.2.2 Determinación de humedad en las semillas

Se formaron lotes de 20 semillas de raíz secas de cada variedad, las muestras se colocaron en cajas petri brevemente pesadas. Se pesó nuevamente las cajas conteniendo las semillas y se sometieron a una temperatura de 60°C al introducir las a un horno. Se mantuvieron dentro del horno hasta que el peso determinado fuera constante, lo cual tomó 5 días. Finalmente se calculó el porcentaje de humedad de las semillas de acuerdo al peso perdido durante su estancia en el horno.

4.2.3 Curva de síntesis de proteínas

4.2.3.1 Imbibición de ejes embrionarios

Lotes de ejes embrionarios de Zea mays de las tres variedades estudiadas de los lotes control y tratadas 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con humedad saturante fueron -

imbibidas entre dos discos de papel filtro agregando 250 μ l de solución amortiguadora para imbibición que contenía el precursor radioactivo (^3H) metionina (5 $\mu\text{Ci/ml}$). Los lotes se incubaron a 27°C por 0,5, 10 y 15 horas.

Al cumplirse el tiempo de incubación establecido para cada muestra se sacaron los ejes embrionarios y fueron lavados con etanol (80%, 10ml) frío que contenía metionina no radioactiva en una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se eliminó el exceso de solución de lavado de los ejes embrionarios y se procedió al procesamiento. Si esto no se realiza inmediatamente, los ejes embrionarios se pueden conservar congelados a -70 C.

4.2.3.2 Medición de incorporación de (^3H) metionina in vivo a material insoluble en ácido tricloroacético.

Los ejes embrionarios imbibidos se homogenizaron con 1.5 ml de etanol (80%) frío que contenía metionina (20 $\mu\text{g/ml}$) mediante un Polytron durante 20 segundos a una velocidad de 7 en la escala de este aparato. La homogenización se realizó en frío; al finalizar se verificó que la suspensión obtenida fuera homogénea y no quedaran restos de ejes embrionarios. El homogenado se pasó a otro tubo lavando el anterior con 0.5 ml de etanol (80%) frío que contenía metionina (20 $\mu\text{g/ml}$) y se vació los restos arrastrados con esta solución al nuevo tubo.

Se centrifugaron los tubos con el homogenado a 2000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón obtenido se resuspendió en una solución NaOH (1M, 0.5-ml) y se sometió a ebullición 3 minutos en baño maría. Se dejó enfriar y alcanzar la temperatura ambiente, se añadió-

ácido tricloroacético (10%, 2 ml). Los tubos se dejaron reposar en hielo 15 minutos y se centrifugaron a 500 rpm por 0.5 minutos. Posteriormente se realizó la filtración en un sistema de filtración Millipore usando filtros de fibra de vidrio-Whatman GF/A (2.4cm)- y se lavó el precipitado con ácido tricloroacético (5%, 7 ml) y etanol (95%, 7 ml). Los filtros se secaron perfectamente a temperatura ambiente por 24 horas y fueron colocados en viales apropiados para el contador de centelleo. A cada vial se le agregó 5 ml de líquido de centelleo (4.1.2.2) y se determinaron las cuentas por minuto de cada muestra en el contador de centelleo Packard, Tri Carb.

4.2.4 Proteínas totales

4.2.4.1 Imbibición de ejes embrionarios

Técnica descrita en 4.2.1.1

4.2.4.2 Obtención del extracto protéico

Al cumplirse los tiempos de incubación, se sacaron los ejes embrionarios de los tubos de cultivo donde se imbibieron y fueron lavados con etanol (80%, 10 ml) frío. Se eliminó el exceso de líquido. Los ejes embrionarios imbibidos se homogenizaron con etanol (80 %, 1.5 ml) frío mediante el Polytron (velocidad de 7 en la escala de este aparato) por 20 segundos y la suspensión homogénea fue transferida a otro tubo. Se lavan los restos remanentes en el primer tubo con etanol (80%, 0.5 ml) frío y se vacía al tubo que contiene el homogenado. Verificar que no permanezcan restos de ejes sin homogenizar. Se centrifugó el homogenado a 2000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspen -

dió en solución de NaOH (1M, 0.5 ml) y se sometió a ebullición 3 minutos en baño maría. Se dejó enfriar y ya a temperatura ambiente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 10 minutos. La determinación de proteínas se realizó en alícuotas de 10 ul del sobrenadante obtenido.

4.2.4.3 Determinación de proteínas totales

La técnica utilizada es el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Primeramente se construyó una curva patrón utilizando albúmina sérica bovina. Para la construcción de dicha curva se prepararon 12 soluciones estándares de ASB a partir de una solución stock de ASB de una concentración de 1 mg/ml utilizando para diluir agua destilada. El rango de concentraciones de esta curva va de 0 ug/ml a 220 ug/ml.

Las muestras problema (10 ul) fueron llevadas a un volumen final de 1 ml con agua destilada y fueron procesadas del mismo modo que los estándares de la curva patrón a partir de este momento.

A cada una de las muestras y estándares se le agregó DCG (0.15%, 0.1 ml) y se mezclaron. Se mantuvieron en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se le agregó ácido tricloroacético (72%, 0.1 ml) frío y se incubó por 15 minutos en hielo. Se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se desechó. Al precipitado se le añadió 1 ml de agua destilada y reactivo A (4.1.2.3.1, 1 ml), se mezcló y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. En seguida se le añadió reactivo B (4.1.2.3.2, 0.5 ml), se agitó y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, periodo en el cual se desarrolló el co -

lor.

Se leyó la absorbancia de las muestras a 750 nm. La curva patrón se ajustó por el método de mínimos cuadrados, graficándose en las abscisas la concentración de proteínas (ug/ml) y en las ordenadas la absorbancia a 750 nm. - La concentración de proteína total de los extractos proteícos problema fue determinada interpolando absorbancias determinadas a las muestras problemas en la curva patrón.

4.2.5 Curva de síntesis de ARN

4.2.5.1 Imbibición de ejes embrionarios

Técnica similar a la descrita en 4.2.1.1 , variando el precursor radiactivo en la solución amortiguadora de imbibición y su concentración; en este caso se utilizó - (³H) uridina en concentración de 10 uCi/ml, así como la solución de los ejes embrionarios empleada para los lavados - que en este caso era etanol al 80% frío.

4.2.5.2 Medición de incorporación de (³H) uridina - in vivo a material insoluble en ácido tricloroacético.

Proceso similar a la técnica descrita en 4.2.3-2, variando únicamente la solución para homogenizar los ejes embrionarios imbibidos en el Polytron, en este caso se utilizó etanol al 80% frío.

NOTA: CADA EXPERIMENTO SE REALIZO POR LO MENOS DOS VECES.

V. RESULTADOS

En el presente estudio se sometió a las semillas de maíz de tres variedades a dos tipos de tratamientos, que pretenden imitar las condiciones de almacenamiento inadecuadas del grano que provocan deterioro de las semillas y un envejecimiento acelerado.

En ejes embrionarios de estas semillas deterioradas se procedió a estudiar los patrones de imbibición, la capacidad de síntesis de proteínas y de síntesis de ADN, así como su contenido de proteínas totales durante las primeras horas de la germinación.

5.1 Determinación de la capacidad de imbibición de ejes embrionarios de semillas de Zea mays deterioradas.

En este caso, se utilizaron semillas de maíz de tres variedades: Chalqueño, Sonora V-524 y Sonora V-526. De cada una de las variedades se contaba con semillas no tratadas (no deterioradas) que se usaron como control y semillas sometidas a los siguientes tratamientos: 2 días a 60°C o bien 6 días a 40°C con humedad saturante.

Los cambios en peso sufridos por las semillas como consecuencia de los tratamientos de deterioro se muestran a continuación:

<u>Variedad</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Cambio de peso(%)</u>
Chalqueño	Ninguno (control)	0
Chalqueño	2 días 60 C	-8
Chalqueño	6 días 40 C con humedad saturante	+12.4

<u>Variedad</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Cambio de peso(%)</u>
Sonora V-524	Ninguno (control)	0
Sonora V-524	2 días 60°C	-4.9
Sonora V-524	6 días 40°C con humedad saturante	+7.9
Sonora V-526	Ninguno (control)	0
Sonora V-526	2 días 60°C	-4.2
Sonora V-526	6 días 40°C con humedad saturante	+7

Se extrajeron ejes embrionarios de las semillas tratadas y no tratadas, se determinaron las curvas de imbibición de los ejes de estas semillas durante las 15 primeras horas de germinación.

La figura 1 muestra los patrones de imbibición de los ejes embrionarios de maíz Chalqueño sometido a tratamientos de 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con 100% de humedad comparadas con un patrón de imbibición de ejes embrionarios no deteriorados (control). Se observó que el patrón de absorción de agua no se ve afectado en el caso de las semillas sometidas al tratamiento de 2 días a 60°C. Con respecto al otro tratamiento (6 días a 40°C con humedad saturante) se presenta una disminución de la capacidad de absorción de agua por el eje embrionario, que no es considerable en las primeras 5 horas de iniciada la germinación, pero a partir de este punto hasta las 15 horas se observa una disminución en la pendiente y a las 15 horas el decremento en la absorción es de 30% con respecto al control.

En la figura 2 se observan los patrones de imbibición de los ejes embrionarios de maíz Sonora V-524 y puede

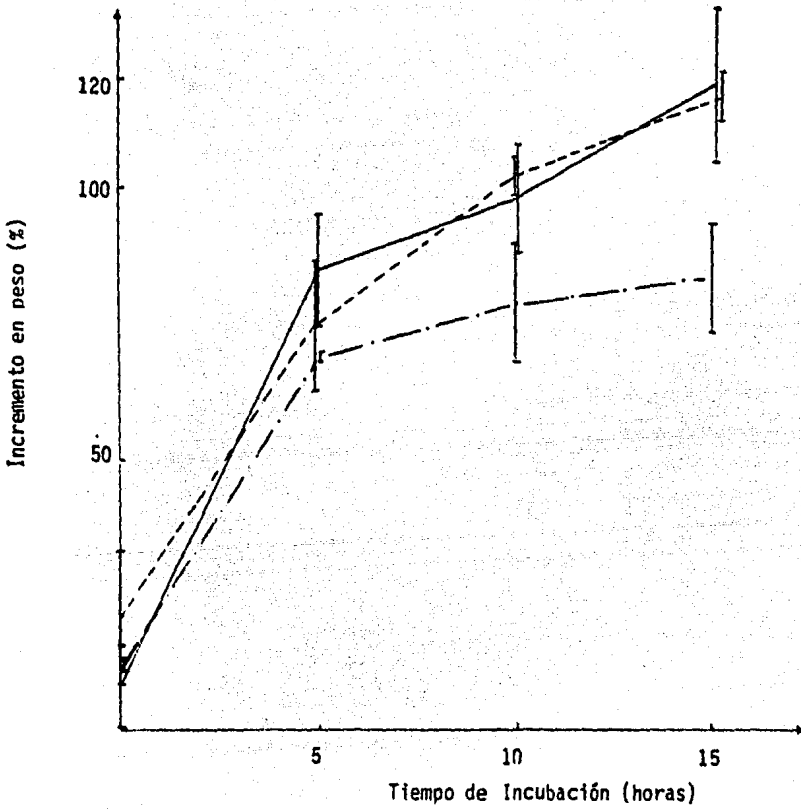


FIGURA No. 1 Curva de imbibición. Maíz Chalqueño.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C
con humedad saturante. (-.-).

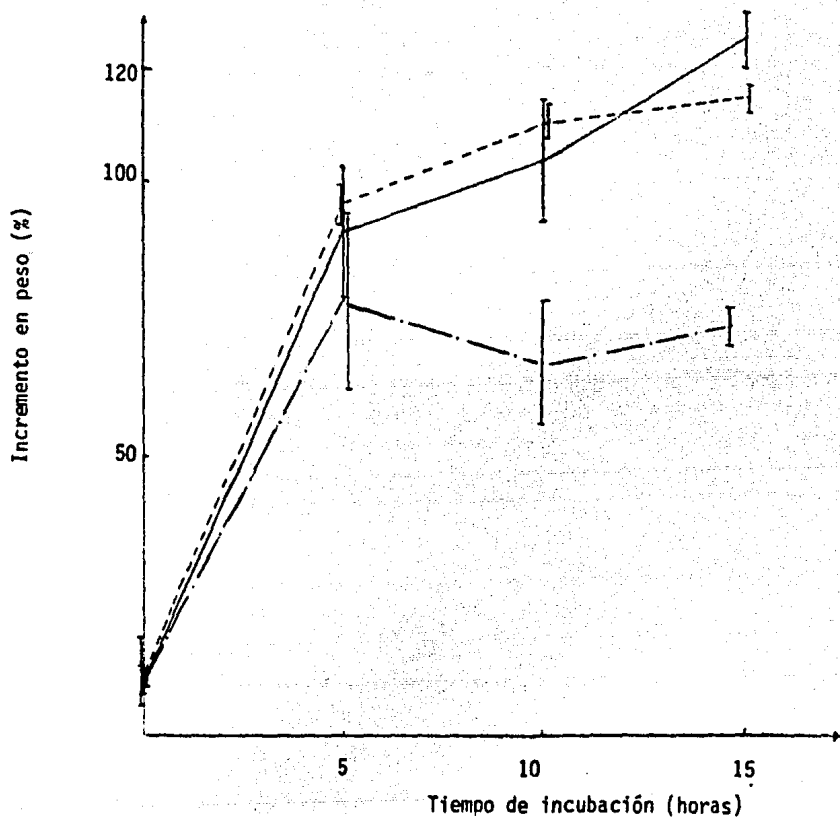


FIGURA No. 2 Curva de imbibición. Maíz Sonora V-524

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C(- -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C
con humedad saturante. (-.-.).

verse que el tratamiento de deterioro que consiste en exposición de las semillas 2 días a 60 °C no altera el patrón de absorción de agua por los ejes embrionarios durante las 15 horas de imbibición. En los ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días a 40 °C con humedad saturante se observa un patrón normal hasta las 5 horas de iniciada la imbibición; a partir de este punto se presenta una meseta en la curva que se continúa a las 15 horas, y se calculó un 41% de disminución en la capacidad de absorción de agua por ejes embrionarios de semillas de maíz tratadas 6 días a 40 °C con humedad del 100%, con respecto al control.

El estudio de los patrones de imbibición del maíz Sonora V-526 se presenta en la figura 3 y puede observarse que no hay alteración en las curvas correspondientes a semillas deterioradas con respecto a las de los controles, a lo largo de las primeras 15 horas de germinación. En esta variedad de semillas el porcentaje de incremento en peso de las semillas control es menor que el porcentaje de incremento en peso registrado en el control de las otras dos variedades a lo largo de las 15 horas de imbibición, pero la tendencia es la misma.

5.2 Determinación del porcentaje de humedad de las semillas

El contenido de humedad total de las semillas de maíz estudiadas se presentan en la tabla I.

Al analizar la tabla I puede afirmarse que la variedad de maíz con mayor contenido de agua es la variedad Chalqueña, con porcentajes de contenido de humedad que oscilan aproximadamente entre 10 y 12% (semillas control y deterioradas).

La variedad Sonora V-524 tiene humedades que va

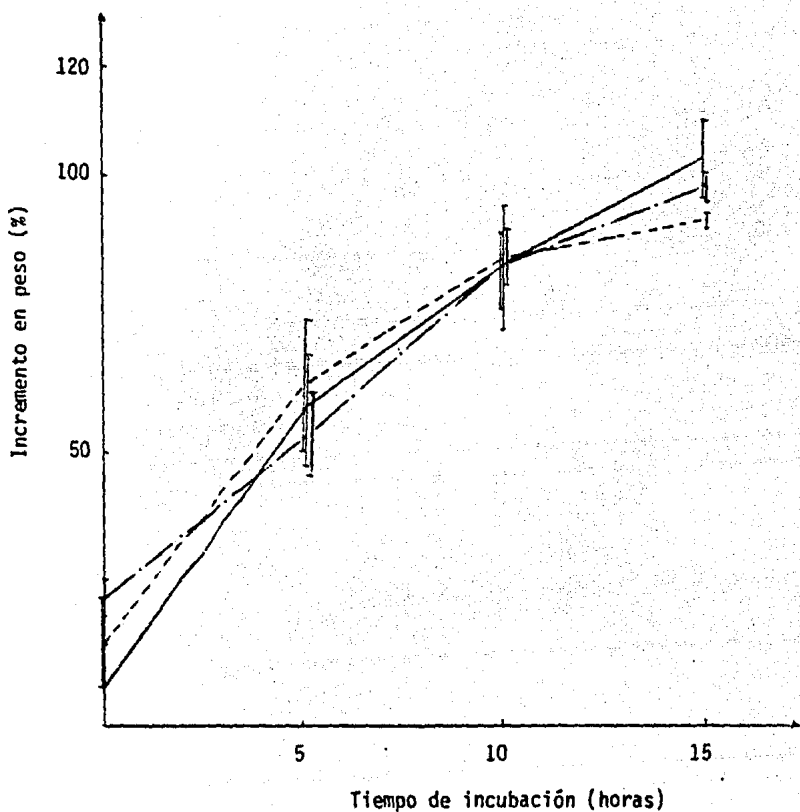


FIGURA No. 3 Curva de imbibición, Maíz Sonora V-526

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C con humedad saturante. (-.-.-).

TABLA I . CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS (%).

VARIEDAD	TRATAMIENTO	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)
CHALQUEÑO	NINGUNO (CONTROL)	11.76 \pm 1.0
CHALQUEÑO	2 DIAS 60°C	10.93 \pm 0.15
CHALQUEÑO	6 DIAS 40°C CON HUMEDAD SATURANTE	9.96 \pm 0.18
SONORA V-524	NINGUNO (CONTROL)	7.57 \pm 0.26
SONORA V-524	2 DIAS 60°C	7.1 \pm 0.21
SONORA V-524	6 DIAS 40°C CON HUMEDAD SATURANTE	6.27 \pm 0.12
SONORA V-526	NINGUNO (CONTROL)	6.9 \pm 0
SONORA V-526	2 DIAS 60°C	6.7 \pm 0.13
SONORA V-526	6 DIAS 40°C CON HUMEDAD SATURANTE	5.9 \pm 0.06

rían entre 6 y 7.5%, puede decirse que es una semilla más deshidratada que las semillas de maíz Chalqueño.

Por último, la variedad de maíz Sonora V-526 es la que menores porcentajes de humedad contiene, éstos varían entre 5.9 y 7.

La diferencia en el contenido de humedad de las distintas semillas puede deberse a muchos factores, tales como la edad de la semilla, clima de su lugar de origen, diferencia en la permeabilidad de las distintas capas que cubren a la semilla, diferentes condiciones de almacenamiento, distintos tratamientos de la semilla después de cosecharla, variabilidad genética, etc.

5.3 Capacidad de síntesis de proteínas durante las primeras 15 horas de imbibición en maíz por medición de la incorporación (^3H) metionina a material insoluble en ácido tricloroacético in vivo.

En la figura 4 se estudia la síntesis de proteínas en ejes embrionarios de semillas de maíz control y deteriorado de la variedad Chalqueño durante las primeras 15 horas de imbibición. Puede notarse que la síntesis de proteínas en las primeras horas de germinación se dispara con una pendiente muy pronunciada, sin embargo, al analizarse las curvas correspondientes a las semillas tratadas se detecta un decremento de la capacidad de incorporar (^3H) metionina a proteínas comparando con el control. Las semillas tratadas 2 días a 60 °C muestran una cinética de síntesis de proteínas más lenta que la control; esta diferencia es apreciable desde la primera hora. Sin embargo, a partir de las 5 horas la pendiente de la curva de síntesis semeja a la de la curva control pero debido al decremento en las-

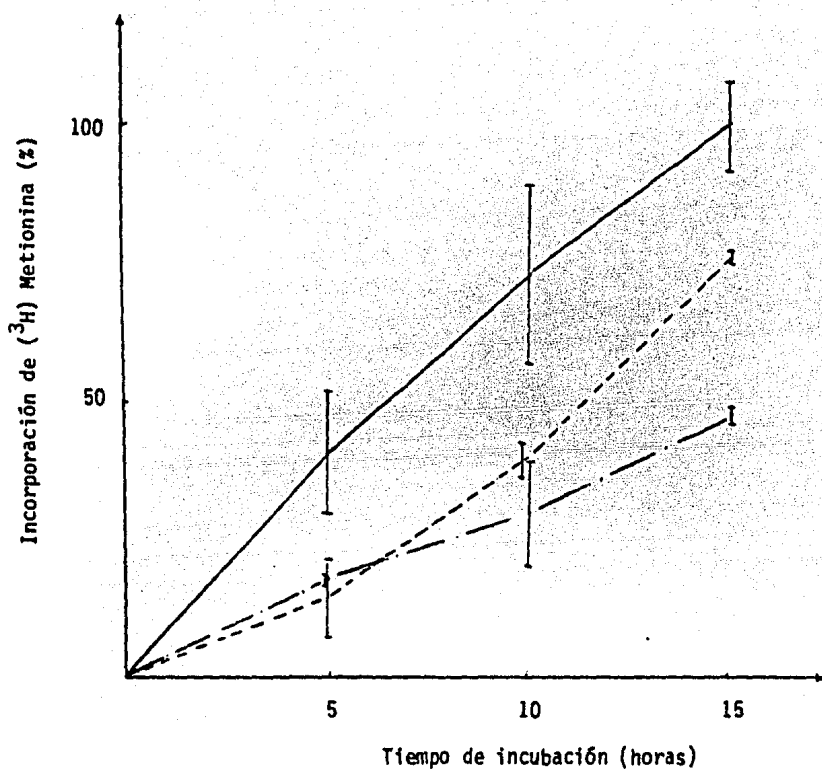


FIGURA No. 4 Curva de síntesis de proteínas. Maíz Chalqueño.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C con humedad saturante. (-.-.-).

100 por % equivale a 4688 cpm.

primeras 5 horas, la semilla deteriorada no llega a alcanzar la capacidad de síntesis de la semilla control aún a las 15 horas. Se calculó un 24% de decremento en la incorporación de (^3H) metionina a proteínas en las semillas tratadas 2 días a 60°C con respecto a las semillas control (a las 15 horas de germinación).

Con respecto a las semillas sometidas al tratamiento de 6 días a 40°C con humedad saturante, vemos que el deterioro causado ha afectado grandemente el sistema de síntesis, la capacidad de incorporar el precursor a proteína está muy disminuída a lo largo de las 15 horas de imbibición. El decremento calculado a las 15 horas con respecto a las semillas control es de 52%.

En la figura 5, se observan las curvas de síntesis de proteínas de las semillas de la variedad Sonora - V-524, tanto control como deterioradas. Al igual que en el caso de las semillas de maíz Chalqueño, se obtiene una curva que indica que la síntesis de proteínas es un proceso que se dispara en las primeras horas de la germinación en semillas no deterioradas. Este hecho sólo nos confirma que la síntesis de proteínas es un proceso íntimamente ligado a germinación como ya se había estudiado en otras plantas como centeno y trigo.

El efecto del deterioro en las semillas tratadas 2 días a 60°C se manifestó como la disminución en la velocidad de síntesis de proteínas con respecto al control y que es evidente a las 10 horas de imbibición. Las primeras 5 horas no mostraron diferencia notable al comparar con las curvas del control, a partir de las 10 horas la pendiente de la curva se incrementa considerablemente y a las 15 horas la incorporación de (^3H) metionina a proteína

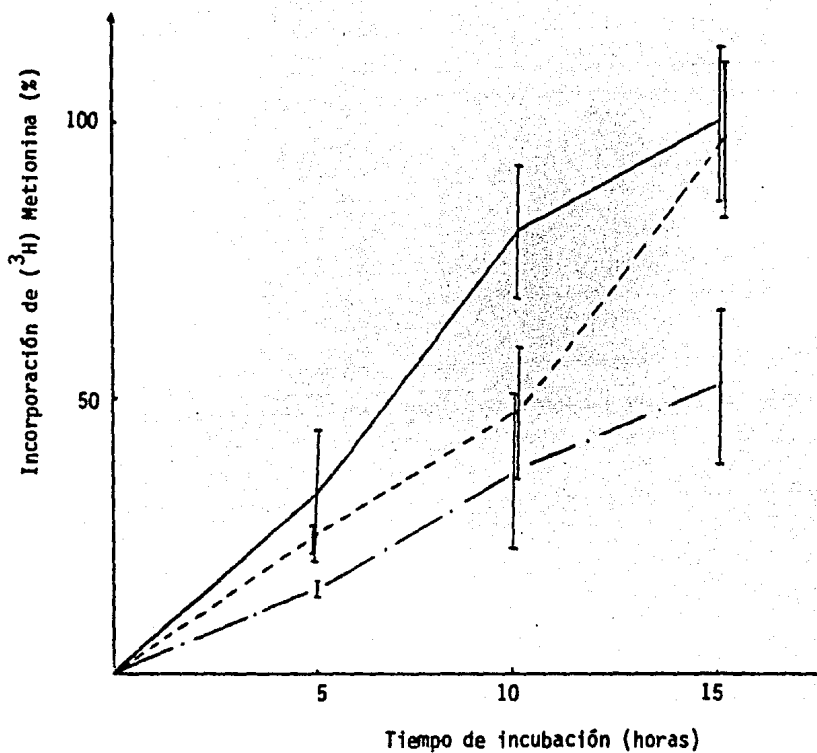


FIGURA No. 5 Curva de síntesis de proteínas. Maíz Sonora V-524.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (————).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C
con humedad saturante. (.-.-.-.-).

100 por % equivale a 3851 cpm

es casi igual a la incorporación de los ejes embrionarios - control. En resumen, la cinética de síntesis de proteínas - es más lenta en los ejes embrionarios de semillas tratadas - 2 días a 60°C que la cinética de los ejes control durante las primeras 15 horas; los datos de la curva sugieren que a partir de este punto la velocidad de síntesis de proteínas - será igual en las deterioradas que en las control.

Las semillas tratadas 6 días a 40°C con humedad saturante mostraron una cinética lenta de síntesis de proteínas. A las 15 horas el decremento en la incorporación - del precursor radiactivo fue del 48%. La tendencia de las - curvas de las semillas deterioradas por los dos tratamientos muestran una tendencia similar entre las 0 y 10 horas, pero a partir de este punto la curva de las semillas correspondientes al tratamiento de dos días a 60°C sufrió un cambio en su pendiente que permitió que a las 15 horas casi igualaran su incorporación a la del control. Sin embargo, la curva de las semillas tratadas 6 días a 40°C con humedad saturante conservó su pendiente, lo cual nos indica que el daño causado a estas semillas fue mayor que a las semillas tratadas 2 días a 60°C.

En la figura 6 se representa las curvas de síntesis de proteínas del maíz de la variedad Sonora V-520 -- (muestras control y tratadas: 2 días a 60°C o 6 días a 40°C con humedad saturante). La cinética de síntesis de proteínas de los ejes embrionarios control nos indica que el incremento de incorporación del precursor radiactivo es directamente proporcional al tiempo de germinación, tal y como se observó en las curvas controles de las otras dos variedades estudiadas. Sin embargo, el número de cuentas - por minuto detectadas es menor que en los otros dos casos.

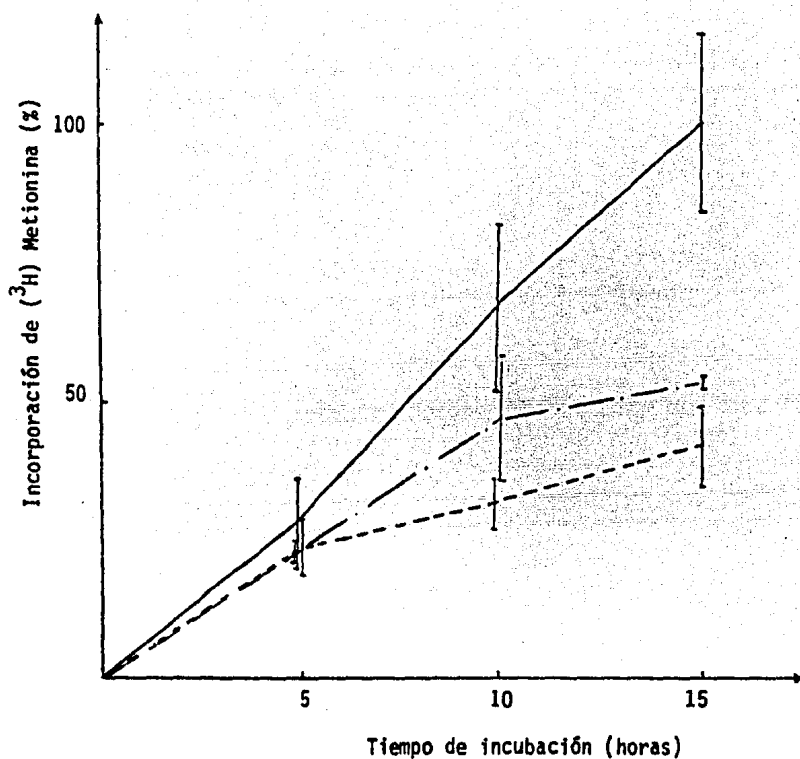


FIGURA No. 6 Curva de síntesis de proteínas. Maíz Sonora V-526.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (————).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C con humedad saturante. (.-.-.-.-).

100 por % equivale a 2303 cpm.

Las semillas tratadas 2 días a 60 °C sufrieron - daños similares sobre su sistema de síntesis de proteínas - que en las semillas deterioradas con 6 días a 40 °C con humedad saturante. El decremento en incorporación de (³H) metionina a las 15 horas con respecto al control fue de 58%. La cinética de síntesis de proteínas de ejes embrionarios de - semillas tratadas 2 días a 60 °C se ve disminuida desde las primeras horas y no se observa ningún incremento importante a lo largo de las primeras 15 horas de incubación.

Con respecto a las semillas deterioradas con el tratamiento de 6 días a 40 °C con humedad saturante, puede - decirse que la cinética de síntesis es más lenta que la de las semillas control. La incorporación del precursor radiactivo a proteínas no presenta ningún incremento importante a lo largo de las primeras 15 horas de germinación, al igual que en caso de las semillas deterioradas con el tratamiento de 2 días a 60 °C.

El porcentaje de disminución en la incorporación -- ción de metionina marcada a las 15 horas en maíz Sonora V-- 526 con el tratamiento de 6 días a 40 °C con humedad saturante es de 46.

5.4 Contenido de proteínas totales en ejes embrionarios de - semillas de Zea mays deterioradas.

Como puede verse en la tabla II el contenido proteico total de los ejes embrionarios del maíz Chalqueño control presenta un leve incremento a lo largo de las 15 primeras horas de germinación. En las semillas de maíz Chalqueño tratadas 2 días a 60 °C el contenido proteico de sus ejes no se vio afectado con el deterioro. En el caso de las semillas

tratadas 6 días a 40°C con humedad se detecta una disminución del contenido protéico con respecto al control, principalmente a las 15 horas de imbibición. No hay diferencias apreciables en la concentración de proteína de estos ejes imbibidos al avanzar la germinación.

En la tabla II se registra también los datos obtenidos de contenido protéico total de ejes embrionarios de maíz Sonora V-524. En el caso de los lotes control no se observa incremento del contenido protéico al avanzar la germinación. En el caso del maíz deteriorado con el tratamiento de 2 días a 60°C, el contenido protéico total no presenta variaciones importantes a lo largo de las 15 horas de imbibición y comparando con el control, vemos que están presentes aproximadamente la misma cantidad de proteínas totales.

Con respecto a las semillas tratadas 6 días a 40°C con humedad saturante, se observa que a las 0 horas de imbibición la concentración de proteínas totales es la menor registrada en todos los lotes. Al avanzar la germinación se detecta un incremento de proteínas a las 5 horas y presenta después una caída a las 15 horas. El contenido protéico de los ejes embrionarios de semillas Sonora V-524 es menor que el determinado en los ejes embrionarios de maíz Chalqueño, manteniéndose esta diferencia ya se trate de lotes control o bien deteriorados.

En la misma tabla II se registran la concentración de proteínas totales determinadas en ejes embrionarios de maíz Sonora V-526 en lotes control y deteriorados. En los lotes control puede verse un ascenso lento en el contenido de proteínas totales a medida que el tiempo de imbibición transcurre. Los datos correspondientes al maíz deteriorado con el tratamiento de 2 días a 60°C no indica incremento

TABLA II PROTEINAS TOTALES. METODO MODIFICADO DE LOWRY.(PETERSON)

HORAS DE INCUBACION	CHALQUERO			SONORA V-524			SONORA V-526		
	CONTROL	2 DIAS 60°C	6 DIAS 40°C H	CONTROL	2 DIAS 60°C	6 DIAS 40°C H	CONTROL	2 DIAS 60°C	6 DIAS 40°C H
0	134	108	103	81	80	68	85	97.5	99
5	136.5	144	144.5	83	74	101	103	94.5	117.5
10	152	154	160.5	84	86.5	94	115	97	103
15	163	182	142	81	86	89,5	123	131	90.5

UNIDADES ug/ml.

en la concentración de proteínas durante las primeras 10 horas, se mantienen constantes los niveles de proteínas totales. A las 15 horas se registra un aumento notable en estas concentraciones. Las semillas deterioradas 6 días a 40°C con humedad saturante muestran un pico de concentración máxima de proteínas a las 5 horas, pero a las 10 y 15 horas se detectó una caída notable. El contenido protéico total de los ejes de maíz Sonora V-526 es menor que el determinado en los ejes de maíz Chalqueño y mayor que el de los ejes de maíz Sonora V-524, conservándose ésta proporción en semillas control y deterioradas.

5.5 Capacidad de síntesis de ARN durante las primeras 15 horas de imbibición en raíz por medición de la incorporación de (^3H) uridina a material insoluble en ácido tricloroacético in vivo.

En la figura 7 se muestran las curvas de síntesis de ARN en el maíz Chalqueño, semillas no tratadas (control) y semillas deterioradas con el tratamiento de 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con humedad del 100%.

La curva de síntesis de ARN de los ejes embrionarios de semillas control presenta una pendiente notable desde las primeras horas de imbibición, lo cual nos indica que la síntesis de ARN es un proceso metabólico que se dispara, al igual que la síntesis de proteínas, desde las primeras horas de germinación.

La curva de síntesis de ARN de los ejes embrionarios de semillas deterioradas con el tratamiento de 2 días a 60°C tiene una cinética más lenta que la del control y a partir de las 10 horas hasta las 15 horas se observa una meseta.

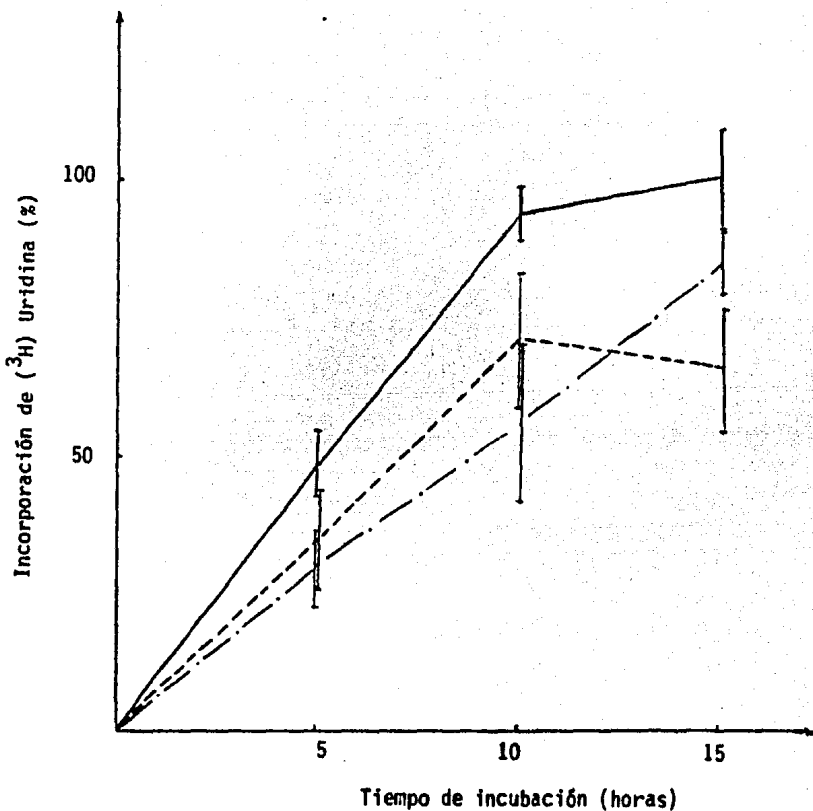


FIGURA No. 7 Curva de síntesis de ARN. Maíz Chalqueño

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C
con humedad saturante. (.-.-.-).

100 por % equivale a 490 cpm.

El porcentaje de reducción en la incorporación de radioac -
tividad de los ejes embrionarios deteriorados 2 días a 60 °C
con respecto al control, a las 10 horas de iniciada la imbi -
bición es de 23% y a las 15 horas es de 34%.

Los efectos del tratamiento de 6 días a 40 °C --
con humedad saturante sobre la velocidad de síntesis de ARN
son claros. La velocidad de síntesis es menor a la del con -
trol a lo largo de las 15 horas de imbibición; sin embargo -
la síntesis de ARN es apreciable y directamente proporcio -
nal al tiempo de imbibición. A pesar de que la pendiente de
esta curva no es tan pronunciada como la de la curva patrón,
puede decirse que la síntesis de ARN se dispara desde las -
primeras horas de imbibición aunque la semilla fuera sometida
al deterioro. El decremento en la incorporación de uridi -
na radioactiva a ARN con respecto al control, a las 15 ho -
ras, es de 15%.

En la figura 8 se presenta la cinética de síntesis
de ARN de los ejes embrionarios de maíz Sonora V-524, -
semillas control, tratadas 2 días a 60 °C y 6 días a 40 °C -
con humedad saturante.

La curva de síntesis de ARN de los ejes control
muestra un incremento considerable en las primeras 5 horas -
de imbibición y a partir de este punto hasta las 15 horas, -
se observa un incremento leve, puede decirse que el interva -
lo entre estos dos puntos semeja una meseta. Los ejes em -
brionarios de semillas deterioradas con el tratamiento de -
2 días a 60 °C muestra una curva que describe una cinética -
de síntesis de ARN más lenta que la del control. La disminu -
ción en la capacidad de incorporación del precursor radioac -
tivo con respecto al control es más notable las primeras 10
horas; a las 15 horas el porcentaje de disminución en la in

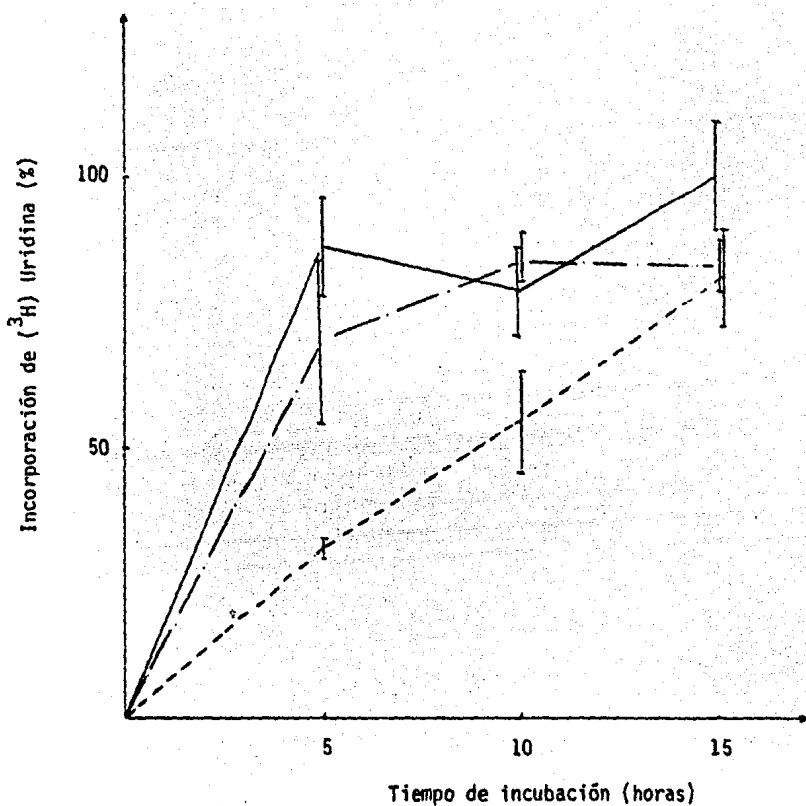


FIGURA No. 8 Curva de síntesis de ARN. Maíz Sonora V-524.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (———).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C con humedad saturante. (,-.-.-,).

100 por % equivale a 374 cpm

corporación con respecto al control es del 20%. Se observa - que la velocidad de síntesis de ARN en las horas próximas a la 15 igualará a la del control, puesto que la curva en el - caso de éstas semillas deterioradas, mantiene una pendiente - constante, lo que no sucedió con la curva control.

El tratamiento de 6 días a 40°C con humedad saturante no afectó la capacidad ni velocidad de síntesis de ARN de los ejes embrionarios extraídos de estas semillas, comparando con la curva control. Las curvas son muy semejantes y muestran incorporaciones de marca radioactiva muy cercanas - a lo largo de las 15 horas de imbibición.

En la figura 9 se puede ver el estudio de las ci néticas de síntesis de ARN de ejes embrionarios de semillas de maíz Sonora V-526, controles y deterioradas con los trata mientos utilizados a lo largo de estos experimentos.

Se observa que la síntesis de ARN durante las pri meras horas de germinación es muy activa, la curva nos indica un incremento considerable en la incorporación de (³H) uridina durante las primeras 15 horas de imbibición.

La gráfica 9 muestra claramente que el deterioro causado a las semillas al someterlas a los dos tratamientos - utilizados (2 días 60°C y 6 días 40°C con humedad saturante) afecta considerablemente la capacidad de síntesis de ARN por los ejes embrionarios. La curva correspondiente a ejes embrío narios de semillas tratadas 2 días 60°C presenta un incremen to ligero en la incorporación de uridina marcada hasta las 5 horas, pero a partir de este punto se inicia un descenso len to hasta las 15 horas. La disminución en la incorporación de precursor radioactivo por los ejes embrionarios con respecto al control, a las 15 horas de imbibición, es de 62%.

En el caso del maíz Sonora V-526 tratado 6 días-

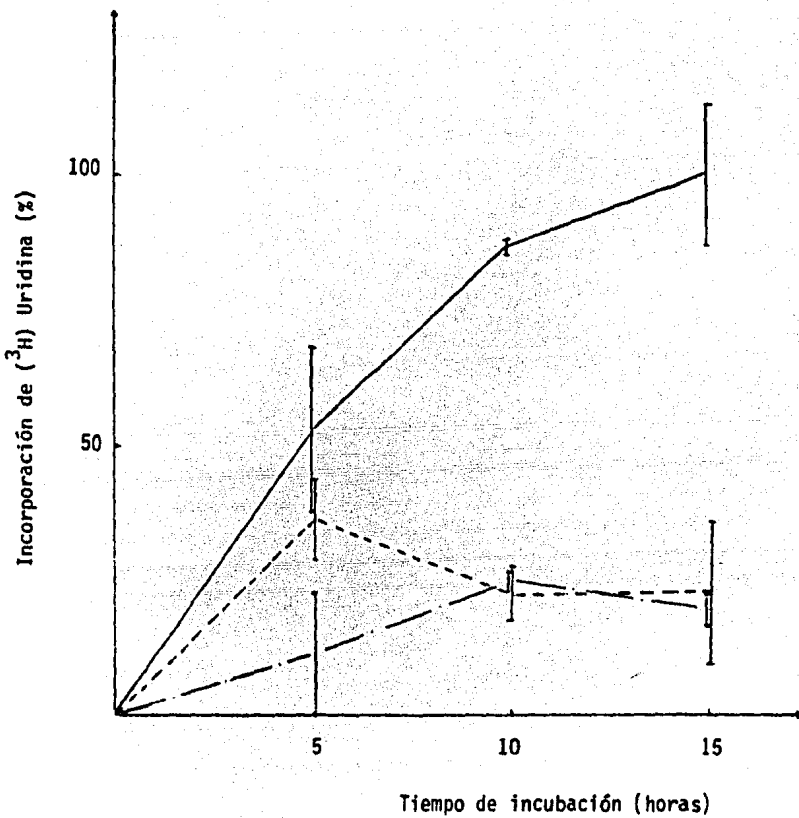


FIGURA No. 9 Curva de síntesis de ARN. Maíz Sonora Y-526.

Ejes embrionarios de semillas no tratadas-control- (—)..

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (- - -).

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C
con humedad saturante. (...-.-.).

100 por % equivale a 370 cpm.

a 40°C con humedad saturante, puede decirse que la síntesis de ARN de los ejes embrionarios es muy escasa. A lo largo - de las 15 horas de imbibición no se detecta ningún incremento importante en la incorporación de material radioactivo; - a las 15 horas el decremento con respecto al control en la velocidad de síntesis de ARN es de 69%.

VI. DISCUSION

El análisis de los resultados de este estudio sobre la capacidad de absorción de agua, de síntesis de ARN y proteínas durante las primeras 15 horas de germinación en las tres variedades de maíz deteriorado estudiadas, nos permite en primer lugar establecer una relación entre el deterioro y la funcionalidad del sistema de síntesis de proteínas en semillas, y en segundo, la elección de la variedad de maíz que conserve la funcionalidad de su sistema de síntesis de proteínas a pesar del daño inducido por los tratamientos de deterioro.

Los patrones de imbibición de los ejes embrionarios de maíz de las tres variedades estudiadas indican que el deterioro provocado por el tratamiento de 2 días a 60 °C no tiene efectos negativos sobre la capacidad de absorción de agua en las tres variedades, pues se observan patrones similares a los correspondientes a ejes de semillas no tratadas. El deterioro causado por la exposición de las semillas al tratamiento de 6 días a 40 °C con humedad saturante disminuye la capacidad de imbibición de los ejes de maíz Chalqueño y Sonora-V-524 después de las 10 horas de iniciada la imbibición y no afecta el patrón de absorción de agua de los ejes de semillas Sonora V-526 a lo largo de las 15 horas.

Al analizarse las humedades iniciales de las semillas (tratadas y no tratadas) antes de extraer los ejes embrionarios, se observa que las tratadas 2 días 60 °C tienen un contenido de humedad menor a las semillas control y las tratadas 6 días a 40 °C con humedad saturante.

Una posible explicación de que no se observe incremento en la capacidad de absorción de agua en las semillas

tratadas 6 días 40°C (variedad Chalqueño y Sonora V-524)-- después de las 5 horas es que el agua adquirida por las semillas durante el tratamiento disminuyó los requerimientos de éste líquido al iniciarse la germinación. Ahora bien, podemos observar que las pérdidas y ganancias de agua de las semillas, como consecuencia de los tratamientos a los cuales se someten, son muy parecidas en el caso de las dos variedades originarias de Sonora. Las semillas de maíz variedad Chalqueño presentan ganancias y pérdidas del contenido de agua mayores que las otras dos variedades.

Con respecto al contenido de humedad total de las semillas (Tabla I), se observa que es muy parecida en semillas control y tratadas 2 días 60°C. Teniendo como base que las semillas provenían de los mismos lotes, era de esperarse que la humedad fuera la misma en las semillas tratadas 6 días 40°C con humedad saturante. Sin embargo, y distinto a lo que se esperaba, el porcentaje de agua en las semillas de las dos variedades sonorenses tratadas 6 días 40°C con humedad saturante es menor que en las control y las tratadas 2 días 60°C. Aparentemente el tratamiento de temperatura con humedad provocó que la semillas conserve un pequeño porcentaje de agua en ellas, que no se pierde al someter a la semilla a las condiciones en que se determinó la cantidad de humedad total y no encontramos una explicación satisfactoria de este hecho.

La capacidad de síntesis de ARN y de proteínas de ejes embrionarios de semillas de maíz Chalqueño y Sonora-V-524 no se ve bloqueada totalmente como resultado de los tratamientos de deterioro. Los efectos del deterioro, en algunos casos se reflejan en cinéticas de síntesis de ARN y de proteínas más lentas que las de ejes control, y en otros ca-

Los resultados obtenidos acerca de la capacidad de síntesis de proteínas en ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad producida por tratamientos de deterioro artificiales coinciden con los obtenidos por Roberts y colaboradores (1973) (31) y Sen y Osborne (1977) (34) en centeno de baja viabilidad producida por envejecimiento natural de las semillas. Es necesario hacer notar que la disminución en la actividad de síntesis de proteínas en semillas de maíz de baja viabilidad debido al deterioro artificial presenta distintos grados dependiendo de la variedad -

Los sistemas de síntesis de proteínas de ejes embrionarios de semillas de maíz Sonora V-526 se ven afectados considerablemente al ser deteriorada la semilla. En el caso de síntesis de ARN de ejes de semillas deterioradas no se observa incremento ni tendencia a alcanzar los niveles detectados en los ejes control. Hay síntesis de proteínas en ejes de semillas deterioradas, pero su cinética con respecto al control es muy lenta.

Los resultados obtenidos acerca de la capacidad de síntesis de proteínas en ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad producida por tratamientos de deterioro artificiales coinciden con los obtenidos por Roberts y colaboradores (1973) (31) y Sen y Osborne (1977) (34) en centeno de baja viabilidad producida por envejecimiento natural de las semillas. Es necesario hacer notar que la disminución en la actividad de síntesis de proteínas en semillas de maíz de baja viabilidad debido al deterioro artificial presenta distintos grados dependiendo de la variedad -

Los resultados obtenidos acerca de la capacidad de síntesis de proteínas en ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad producida por tratamientos de deterioro artificiales coinciden con los obtenidos por Roberts y colaboradores (1973) (31) y Sen y Osborne (1977) (34) en centeno de baja viabilidad producida por envejecimiento natural de las semillas. Es necesario hacer notar que la disminución en la actividad de síntesis de proteínas en semillas de maíz de baja viabilidad debido al deterioro artificial presenta distintos grados dependiendo de la variedad -

de maíz que se trate.

Estudios previos realizados por el grupo del Dr. Jorge Vázquez Ramos en el Depto. de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química, indican que los tratamientos mencionados provocan en el maíz Chalqueño, disminución de la viabilidad de la semillas, alteración de la integridad del ADN, reducción de la capacidad de síntesis de ADN y del vigor de la planta generada; lo cual nos indica que los efectos del deterioro sobre los sistemas de síntesis de proteínas forman parte de un conjunto de alteraciones sufridas a distintos niveles en la semillas deteriorada.

La semillas de maíz Sonora V-524 es un ejemplo excelente de reparación del daño sufrido pues estudios sobre síntesis e integridad del ADN, viabilidad y vigor, indican que se ven poco afectados por el deterioro. Esto último quizá se debe a la capacidad de recuperación de los sistemas de síntesis de proteínas, que permiten a la semilla germinar y dar origen a una planta similar a la control. Una posible explicación de que esta variedad mantenga su capacidad de síntesis de proteínas, proviene del hecho de que el daño sufrido por otras estructuras (presencia de cortes en el ADN, probablemente resultado de una actividad de endonucleasa detectada en las semillas durante la pérdida de viabilidad - Estudios en centeno por Cheah y Osborne 1978-, lesiones en el proceso de maduración y activación del ARNm, fragmentación de los ribosomas, decremento en la actividad de enzimas tales como ADN ligasa, ARN polimerasa, aminoacil tRNA sintetasa, etc.) sea reparado rápidamente por proteínas preformadas -- que son resistentes y estables durante el tratamiento de deterioro.

Estudios sobre el maíz Sonora V-526, indican que

el deterioro de las semillas se refleja notablemente en una disminución de la viabilidad, alteración de la integridad del ADN, reducción de síntesis de ADN y del vigor. Ahora -- también podemos agregar una reducción en la capacidad de -- síntesis de ARN y de proteínas. Es una variedad con poca habilidad de recuperación del daño inducido por el deterioro, y a pesar de provenir de una región similar a la del maíz Sonora V-524, el maíz Sonora V-526 es más susceptible al de -- terioro.

Consideramos interesante estudiar la integridad de los sistemas de síntesis de proteínas de semillas de maíz deterioradas y localizar los sitios dañados; además conocer si la funcionalidad de los sistemas de transporte específicos de aminoácidos se conserva o no al someter la semilla a tratamientos de deterioro.

De acuerdo a lo observado, el hecho de que los efectos del deterioro evidentes durante las primeras horas de germinación sean reparados o no, es de suma importancia para el funcionamiento óptimo del metabolismo de la semilla y el desarrollo posterior de la planta.

Con respecto a la determinación de proteínas totales en ejes embrionarios de las tres variedades de maíz, en general se observa un incremento leve en el contenido -- protéico a lo largo de las 15 horas de imbibición, en el caso de semillas no tratadas (control) y tratadas 2 días -- a 60°C. Como consecuencia del deterioro causado por el tratamiento de 6 días 40°C con humedad saturante, se observa -- una caída en la cantidad de proteínas totales después de -- las 5 horas en ejes de las tres variedades de maíz estudiadas. Una posible explicación sería que el sistema de síntesis de proteínas disparado al iniciarse la imbibición, no --

puede sostenerse debido al daño ocasionado por los tratamientos de deterioro, esto provoca una pérdida de proteínas totales que ocasionará la caída de la viabilidad celular y finalmente impedirá la germinación.

VII. CONCLUSIONES

1. Se demostró que al someter a semillas de maíz a tratamientos con temperatura y/o humedad, se provoca deterioro que se manifiesta en la incapacidad de sintetizar ARN y proteínas en las 15 primeras horas de germinación.
2. La variedad de maíz Chalqueno es sensible a los dos tratamientos de deterioro y como consecuencia se observa una disminución en la capacidad de síntesis de ARN y de proteínas. El grado de daño causado es mayor cuando el tratamiento aplicado es el de 6 días 40°C con humedad saturante.
3. La variedad de maíz Sonora V-524 es la más resistente a los tratamientos que provocan deterioro. Las semillas deterioradas sufren daños leves a nivel de síntesis de ARN y proteínas, que deben ser reparados en las primeras horas de germinación y que probablemente no afectan negativamente la viabilidad de la semilla ni el vigor de la planta a la que dará origen.
4. La variedad de maíz Sonora V-526 es la más susceptible al deterioro producido por la aplicación de los tratamientos y es incapaz de reparar el daño sufrido. Este daño se refleja a nivel de transcripción y traducción y más tarde en la viabilidad de las semillas y en su vigor.
5. No se pudo establecer relación entre la resistencia de alguna variedad de maíz y el ambiente climatológico de su lugar de origen, ya que de las dos variedades de maíz provenientes de Sonora, una resultó ser la más resistente y la otra la más sensible.
6. La variedad elegida por ser la más resistente y que mejor -

conserva su integridad y viabilidad cuando se le somete a -
condiciones ambientales desfavorables, es la Sonora V-524.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Baszczynsshi, I.C. and Walden, D.B. (1983) Regulation of the expression in maize for "heat - shock" analysis-in vitro of RNAs of seedlings for Shock-Heat. Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology. 61.
2. Bewley, J.D. and Black, M. (1978) Physiology and Biochemistry of seeds in Relation to germination. Volume 1. - Development, Germination and Growth. Springer-Verlag. - pp. 1-3, 7-13, 107, 115-117, 153-171.
3. Bewley, J.D. and Black, M. (1978) Physiology and Biochemistry of seed in Relation to Germinatio. Volume 2. Viability, Dormancy and Enviromental Control. Springer-Verlag. pp. 17-21, 27-39.
4. Blowers, L.E., Stormonth, D.A., Bray, C.M. (1985) Protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. Plant Science Letters, 37 , 257-264.
5. Blowers, L.E., Stormonth, D.A. and Bray, C.M. (1980). - Nucleic acid and protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. Planta 150, 19-25.
6. Bray, C.M. and Dasgupta, J. (1976) Ribonucleic acid synthesis and loss of viability in pea seed. Planta 132, - 103-108.
7. Bray, C.M. and Chow, T.Y. (1976 a) Lesions in post-ribosomal supernatant associated with loss of viability in pea (Pisum sativum) seeds. Biochim. Biophys. Acta 442, 1-13.
8. Bray, C.M. and Chow, T.Y. (1976 b) Lesions in the ribosomes of non-viable pea (Pisum sativum) embryonic -- axes tissue. Biochim. Biophys. Acta 442, 14-23.

9. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978) DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. Nature 272, 593-599.
10. Chen, D., Sarid, S. and Katchalski, E. (1968) Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos Biochemistry 60, 902-909.
11. Cheung, Ch. P., Wu, J. and Sunaldonik, R.J. (1979) Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. Nature 277, 66-67.
12. Datta, K., Marsh, I. and Marcus, A. (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. Plant Physiol. 72, 394-397.
13. De Vries, H. Die mutations theorie, Vol. I (veit and Vo, Leipzig, 1901)
14. Dell' Aguilar, A. , Zocchi, G., Lanzane, G.A. and De Leo, P. (1976) Different forms of EFl and viability in wheat-embryos. Phytochemistry 15, 1607-1610.
15. Donnes, J. and Van de Walle, C. (1983) Newly synthesized mRNA in translated during the initial imbibition phase - of germinating maize embryo. Plant Physiol. 73, 484-487.
16. García, R.M. (1985) Relación entre viabilidad de germinación y síntesis de ADN en embriones de maíz. Tesis de licenciatura.
17. Hecker, W., Kohler, K.H., Wachlin, G. and Bernhardt, D. (1982) Relation between DNA synthesis and germination of Vaccaria pyramidata seeds. Phytochemistry 21, No. 7, 1491-1494.
18. Martin, C. and Northcote, D.H. (1981) Qualitative and -- quantitative changes in mRNA of castor beans during the -

- initial stages of germination. *Planta* 151, 189-197.
19. Jugenheimer, R.W. (1976) Corn; Improvement, seed, - production and uses. John Wiley and sons, Inc. pp.- 25-26.
 20. Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1975) The germination of seeds, 2nd. edition, Pergamon Press. pp. 21 -26.
 21. Miranda, N.L.J. (1984) Estudio sobre la síntesis de ADN en la germinación de embriones de semillas de maíz. Tesis de licenciatura.
 22. Modak, S.P. and Bollum, F.J. (1972) Detection and measurement of single-strand breaks in nuclear DNA in fixed lens sections. *Exp. Cell Res.* 75, 307-313. (mencionado en la referencia # 23).
 23. Navashin, S.N. (1933) Ageing of seeds is a cause of chromosome mutations, *Plant* 20, 233-243.
 24. Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. (1980) Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). *Isr. J. Bot.* 29, - 259-272.
 25. Osborne, D.J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61, 3568-3577.
 26. Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Analytical Bioche.* 83, 346-356.
 27. Peumans, W.J., Caers, L.I. and Carlier, A.R. (1979) - Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryos. *Planta* 144, 465-490.
 28. Peumans, W.J. and Carlier, A.R. (1981) Loss of protein

synthesis activity in ageing wheat grains: Lesions in the initiation process and mRNA degradation, Bioche. Physiol. Pflanzen 176, 384-395.

29. Roberts, E.H. and Abdalla, F.H. (1968) The influence of - temperature, moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. Ann. Bot. 32, 97- - 117.
30. Roberts, E.H. and Osborne, D.J. (1973) Protein synthesis- and loss of viability in rye embryos. The lability of -- transferase enzymes during senescence. Biochem. J. 135, - 405-410.
31. Roberts, E.H., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973) Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activi- ty of protein-synthesizing systems in vitro associated - with loss of viability. Biochem. J. 131, 275-286.
32. Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and López, S. (1981)- Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germinatin. Biochemi - cal and Biophysical Research Communications, Vol. 99, No. 2, 445-450.
33. Sen, S., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1975) Early ribonu- cleic acid synthesis during the germination of rye (Seca le cereale) embryos and the relationship to early pro -- tein synthesis. Biochem. J. 148, 381-387.
34. Sen, S. and Osborne, D.J. (1977) Decline in ribonucleic - acid and protein synthesis with loss of viability during- the early hours of imbibition of rye (Secale cereale) - embryos. Biochem. J. 166, 33-38.
35. Spiegel, S. and Marcus, A. (1975) Polyribosome forma -- tion in early wheat embryo germination independent of ei- ther transcription or polyadenilation. Nature 256, 228- -

36. Spiegel, S., Obendorf, R.L. and Marcus A. (1975) Trans -
cription of ribosomal and messenger RNAs in early wheat-
embryo germination. *Plant Physiol.* 56, 502-507.
37. Van de Walle, C. and Bernier, G. (1976) Sequence of ---
reactivation of ribonucleic acid synthesis during early-
germination of the maize embryo. *Plant Physiol.* 157, 632
-639.
38. Villiers, T.A. and Edgecumbe, D. (1975) On the cause of-
seed deterioration in dry storage. *Seed Sci. Technol.* 3,
761-774.
39. Corn: Culture, processing, products. Editor G.E. Inglett.
The Avi Publishing Company, Inc. 1970, pp. 350-356.