

185
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"NIVELES DE POLIAMINAS DURANTE LA GERMINACION DE
LAS SEMILLAS DE MAIZ (ZEA MAYS L)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GABRIELA SEPULVEDA JIMENEZ

MEXICO, D. F.

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	PAG.
Resumen	1
1) Introducción	3
2) Antecedentes	5
2.1. Localización de poliaminas en la naturaleza.	5
2.2. Efectos fisiológicos de polia minas en plantas superiores.	11
2.2.1. Crecimiento Vegetal	11
2.2.2. Senescencia	16
2.2.3. Estrés	19
2.2.4. Relación con otros factores reguladores del crecimiento	22
2.3. La semilla de mafz	25
2.4. Germinación, viabilidad y vigor	31
2.5. Poliaminas, germinación y viabilidad	36
3) Materiales y métodos	39
3.1. Material	39
3.1.1. Material biológico	39
3.1.2. Reactivos	39
3.1.3. Equipos	40
3.2. Método	

3.2.1. Germinación de semillas	40
3.2.2. Determinación de poliaminas	41
3.2.2.1. Extracción de poliaminas	41
3.2.2.2. Dansilación	42
3.2.2.3. Extracción de poliaminas dansiladas	42
3.2.2.4. Identificación de poliaminas dansiladas por cromatografía en capa fina	43
3.2.2.5. Elución	43
3.2.2.6. Cuantificación de poliaminas ..	44
3.2.3. Curvas patrón	44
4) Resultados	49
4.1. Viabilidad y velocidad de germinación	49
4.2. Niveles de poliaminas en eje embrionario de semillas secas	51
4.3. Niveles de poliaminas en los ejes embrio- narios durante la germinación	53
4.4. Niveles de poliaminas en escutelo de se- millas secas	58
4.5. Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación	60
4.6. Relación de poliaminas con la viabilidad- de las semillas	65
4.6.1. Eje embrionario	65
4.6.1.1. Maíz variedad "Criollo del Mezquital"	65

4.6.1.2.	Maíz variedad "Compuesto Universal"	66
4.6.1.3.	Maíz variedad "Tuxpeño - Crema"	68
4.6.2.	Escutelo	70
4.6.2.1.	Maíz variedad "Criollo - del Mezquital"	70
4.6.2.2.	Maíz variedad "Compuesto Universal"	70
4.6.2.3.	Maíz variedad "Tuxpeño - Crema"	71
5)	Discusión	74
6)	Conclusiones	79
7)	Bibliografía	80

RESUMEN

Se conoce que las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina son policaciones que tienen relación con la germinación de semillas de plantas superiores. Por otra parte, el almacenamiento de semillas por períodos prolongados genera una pérdida de viabilidad de las semillas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue saber si los niveles endógenos de las poliaminas podrían ser indicativos de la pérdida de viabilidad o capacidad de germinación de las semillas. Por ello, se determinaron los niveles de poliaminas a diferentes tiempos de germinación en los tejidos embrionarios (eje y escútelos) de semillas de tres variedades de maíz. De cada variedad se usaron semillas no almacenadas y almacenadas por períodos prolongados (14 a 17 años). Esta determinación de poliaminas se hizo por el método de dansilación, cromatografía en capa fina (CCF) y cuantificación espectrofluorométrica.

Se realizaron curvas de germinación y se encontró que las semillas almacenadas perdieron de un 50 a un 80% de su viabilidad, además disminuyeron su velocidad de germinación.

Las tres poliaminas se incrementaron, putrescina en--

mayor proporción, durante la germinación en los dos tejidos -- embrionarios de las semillas no almacenadas. En las semillas almacenadas, putrescina también mostró incrementos. Estos resultados hacen sugerir que el aumento de esta diamina es un proceso tardío de la germinación y no constituye el paso limitante para que ésta se realice. Las semillas no viables, sin embargo, no aumentaron su contenido de espermidina y espermina, lo que sugiere que éstas dos poliaminas sí podrían estar relacionadas con la capacidad de germinación y probablemente el almacenamiento dañe las enzimas que transforman putrescina hacia espermidina y de espermidina hacia espermina.

1) INTRODUCCION

Las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina - participan en diversos procesos metabólicos en plantas superiores relacionados con la diferenciación celular, el crecimiento, el estrés y la senescencia.^{44, 57, 62, 65}

La semilla es una estructura en reposo que activa su metabolismo durante la germinación, sin embargo su capacidad de germinación o viabilidad decrece con las condiciones y el tiempo de almacenamiento. Esto representa un problema universal ya que ocasiona grandes pérdidas económico - agrícolas, - lo que hace necesario realizar estudios relacionados con este aspecto. 12, 13, 35

Por otra parte, los escasos estudios de poliaminas en germinación de semillas de plantas superiores, especialmente leguminosas y gramíneas, señalan que uno de los eventos inmediatos a la germinación es el aumento en los niveles de poliaminas, frecuentemente correlacionados con una activa síntesis de DNA, RNA y proteínas. 3, 4, 42, 51, 55, 67 Así mismo, la pérdida de viabilidad y de vigor de semillas monocotiledóneas como el arroz también se ha relacionado con cambios notables en el contenido de poliaminas. 46

Por lo cual el presente trabajo se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis de trabajo:

Si las poliaminas se encuentran involucradas con la viabilidad (germinación) de las semillas, se esperaba que semillas de maíz deterioradas por períodos prolongados de almacenamiento, presentaran menores incrementos en la concentración de estas poliaminas, durante su germinación.

Para comprobar tal hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- a) Determinar los niveles de poliaminas en los tejidos embrionarios: eje y escutelo, durante la germinación de semillas deterioradas por períodos prolongados de almacenamiento y de semillas no almacenadas, de tres variedades de maíz.
- b) Establecer la relación de los niveles de poliaminas con la viabilidad de semillas de dichas variedades de maíz.

2) ANTECEDENTES

2.1. Localización de poliaminas en la naturaleza.

Las poliaminas: espermidina, espermina y putrescina - (Fig. 1) han sido determinadas tanto en células animales como en vegetales, bacterias y hongos. Aunque su papel en el metabolismo celular es aún incierto, su distribución específica, - su alta concentración en las células y su relación con el crecimiento celular, indican la importancia biológica de estos - compuestos. ⁶³

Las funciones biológicas de las poliaminas han sido - atribuidas a su naturaleza catiónica, ya que se ha demostrado su interacción con polianiones orgánicos como son los fosfolípidos de membrana, o bien con los ácidos nucleicos ^{63, 56}.

En las plantas superiores se les encuentra en hojas - ⁵⁷, raíces ^{23, 53} y frutos ¹⁸. En especial se les ha estudiado en especies de las familias de las leguminosas y de las -- gramíneas (a esta última pertenece el maíz), encontrándose diferencias taxonómicas importantes: el nivel de poliaminas es -- mucho más alto en hojas de las leguminosas que en las gramí -- neas, en las compuestas y las boragináceas, e incluso existe -- gran variación en el contenido de poliaminas en hojas dentro -- de un mismo género, por ejemplo: dentro del género Heliotro--

pisum: Heliotropium angiospermun contiene un 50% más en la concentración de poliaminas totales que Heliotropium indicum. Así mismo, se encuentran diferencias entre variedades, por ejemplo: Pisum sativum cv. Alaska contiene en hojas un 10% más de poliaminas totales que Pisum sativum Little Marvel - 14, 15.

La concentración de poliaminas no solamente varía de un organismo a otro, también se encuentran diferencias importantes dentro del mismo. Por ejemplo, la distribución de poliaminas en la raíz de maíz, aumenta de la zona apical a la base ²⁴.

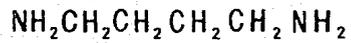
Las poliaminas y las enzimas de su biosíntesis se encuentran compartimentalizadas subcelularmente. En vegetales putrescina, espermidina y espermina se encuentran en altas concentraciones en vacuolas de células de parénquima de los pétalos de Saintpaulia ⁷, también se les ha encontrado en mitocondrias de las células del parénquima de Helianthus tuberosus y en los cloroplastos de cotiledones de Pinus radiata. Así mismo, las enzimas de su biosíntesis: Ornitina descarboxilasa (ODC), Arginina descarboxilasa (ADC) y S-Adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC), se encuentran en estos organelos por lo que esto puede indicar que las poliaminas son sintetizadas in situ ⁶⁴. En la figura 2 se muestra la vía de biosíntesis de putrescina (Put), espermidina (Spd) y de espermina -

(Spm) propuesta por Smith ⁶⁰. La ADC y la ODC son enzimas -- importantes para la biosíntesis de putrescina y la SAMDC es -- una enzima importante para la síntesis de espermidina y de -- espermina ya que la conversión de putrescina a ambas poliaminas requiere de la forma descarboxilada de S - Adenosil metionina, así mismo de las enzimas amino propil transferasa como son la espermidina sintasa que es una enzima que actúa sobre putrescina para producir espermidina y la espermina sintasa que es una enzima que actúa sobre espermidina para producir -- espermina ⁶⁰. Es importante destacar que la descarboxilación de arginina por la enzima ADC da la formación de agmatina. -- La agmatina pierde amoníaco para dar N - carbamil putrescina que posteriormente es hidrolizada a putrescina por la enzima N-carbamil putrescina amidohidrolasa.

La vía de biosíntesis de putrescina por descarboxilación de la ornitina por la enzima ODC es muy común en células animales ⁶³, sin embargo, se ha determinado la actividad de -- esta enzima en células de plantas superiores como son Helianthus tuberosus ⁶⁵, papa ³⁷, maíz ^{23, 53}, tomate ¹⁸ y tabaco -- ³⁵. Por el contrario se ha propuesto que la biosíntesis de -- putrescina por la descarboxilación de la arginina por la enzima ADC es una vía poco común en células animales y muy frecuente en células de plantas superiores principalmente en procesos de crecimiento vegetal como es la embriogénesis de zanahoria ^{46, 47}, el desarrollo y la germinación de las semi --

llas de arroz ⁵⁴ y especialmente Flores y Galston ²⁹ han propuesto que esta es la vía principal para la biosíntesis de -- putrescina en plantas que crecen bajo condiciones de estrés.

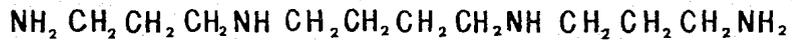
En plantas superiores se ha involucrado a las poliaminas con diferentes eventos como es el crecimiento vegetal, el estrés y la senescencia en relación con otras substancias del crecimiento ⁶³. Todos estos eventos se han correlacionado con síntesis de DNA, RNA, proteínas y estabilización de la membrana celular ⁵⁶.



PUTRESCINA



ESPERMIDINA



ESPERMINA

Fig.1 Formulas de las poliaminas

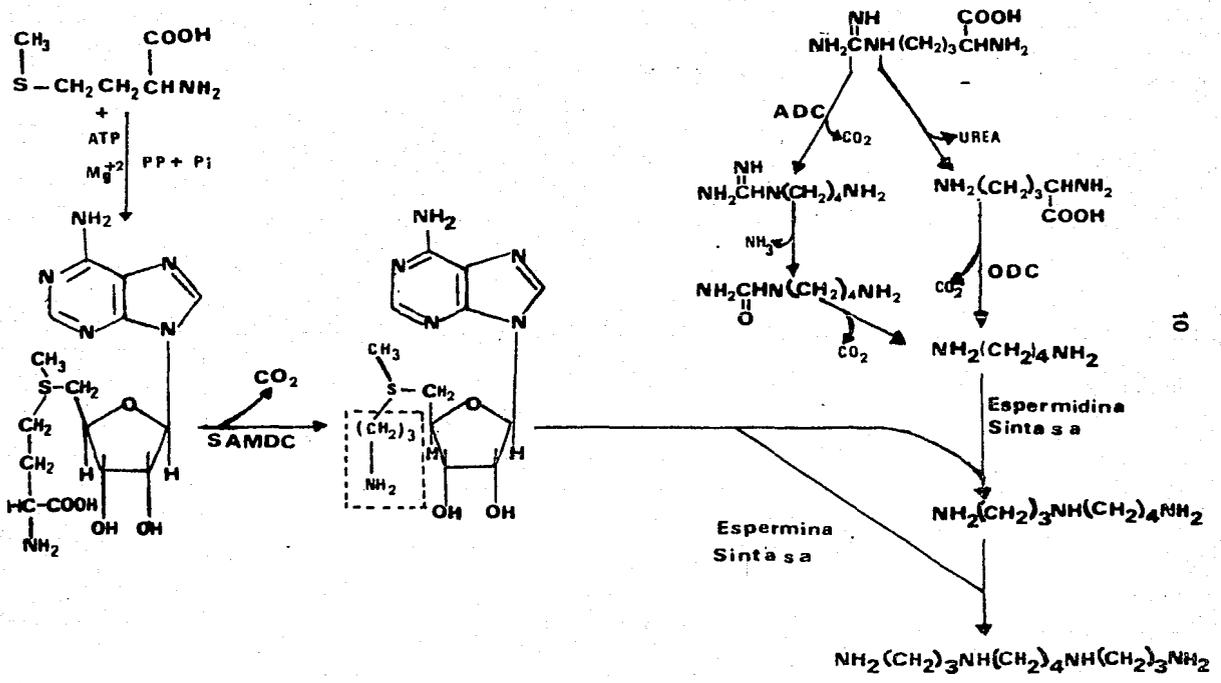


Fig2. Via de biosíntesis de poliaminas (Smith, 1985).

2.2. Efectos fisiológicos de poliaminas en plantas superiores:

2.2.1. Crecimiento vegetal:

El crecimiento activo y la división celular en tejidos vegetales ha sido correlacionada con el incremento en la síntesis de macromoléculas y de poliaminas. Protoplastos de hojas de avena que son capaces de sintetizar proteínas y RNA, pero no cantidades substanciales de DNA, al ser tratados con poliaminas (cadaverina, espermidina o espermina 1 mM) incrementan la síntesis de DNA, el índice mitótico e incluso son capaces de producir numerosas células binucleadas o típicas formas mitóticas ³⁶.

Las poliaminas han sido también relacionadas con el rompimiento de la latencia. Explantes de Helianthus tuberosus durante la latencia presentan un bajo nivel de poliaminas, pero cuando se rompe la latencia, entre los primeros eventos que ocurren está la rápida síntesis de poliaminas (en especial putrescina) con un aumento en la actividad de la enzima ODC, enzima de su biosíntesis. Ambos eventos ocurren durante la fase tardía de G_1 y un mayor aumento de la síntesis de poliaminas y su acumulación se observa durante el transcurso de la fase S_1 . Este aumento en la síntesis de poliaminas se pudo correlacionar con un aumento en la síntesis de RNA y DNA ^{6, 37, 55}.

Un efecto similar de poliaminas se observó durante el rompimiento de la latencia y subsecuente formación de yemas apicales en papa (Solanum tuberosus). Cuando se inició la formación de yemas apicales se observó un incremento de los niveles de putrescina, espermidina y espermina de 2, 3 y 10 veces más, respectivamente, de los niveles iniciales. Este incremento de poliaminas fue paralelo con el aumento de la actividad de la ODC ³⁷.

En procesos de desarrollo de órganos vegetales con activo crecimiento, las poliaminas también tienen un papel importante. Por ejemplo, en la raíz de Zea mays, putrescina -- presentó un gradiente que aumentó del ápice a la base, correlacionado con el gradiente de la actividad de la ODC. Por otra parte, espermidina se encontró en niveles muy altos en la zona apical, comparada con la base. Es probable que el alto nivel de espermidina en la zona apical, donde hay activa división celular se deba a una conversión de putrescina a espermidina. Este incremento en espermidina fué paralelo a una activa síntesis de proteínas y de DNA en la zona apical de la raíz de maíz ²³.

Schwartz y col ⁵³ demostraron que eventos morfogenéticos como es la formación de raíz primaria y de raíces laterales en maíz están relacionados con cambios en los niveles de putrescina y espermidina y un marcado incremento en la activi -

dad de ODC. La intensa actividad de esta enzima está relacionada con zonas meristemáticas en activa división celular, como es la zona apical de la raíz primaria y las zonas que dan lugar a las raíces laterales. Sin embargo, en relación con la morfogénesis de raíz de frijol hay algunas controversias, ya que la aplicación exógena de poliaminas no promueve la formación de raíces adventicias. Sin embargo, la aplicación de ácido indolbutírico (AIB) induce la formación de raíz y un incremento considerable de los niveles de poliaminas, lo que indica que los cambios de poliaminas son dependientes de la concentración de AIB y específicos del órgano de estudio. ³¹

Por otra parte las poliaminas también se han relacionado con el desarrollo de frutos. Por ejemplo, se ha logrado promover el desarrollo de frutos de tomate (Lycopersicon - - esculentum), con la aplicación exógena de putrescina 1 mM en el décimo día después de la polinización, momento de activa división celular. La enzima ODC fue esencial durante la etapa del desarrollo de este fruto ¹⁸. La alta actividad de esta enzima de síntesis de putrescina también se ha relacionado con una activa división celular en células XD de tabaco y en ovarios de tomate ³⁵. Así mismo, fué caracterizada en la zona apical de raíz y en hojas jóvenes de tomate, zonas de intensa actividad mitótica, activa síntesis de poliaminas, DNA, RNA, y proteínas ¹⁹.

Otro de los eventos morfogenéticos con los que se relacionan las poliaminas es la embriogénesis de zanahoria - - (Daucus carota). Montague y col. ⁴⁶ estudiaron el metabolismo de poliaminas en cultivos de zanahoria: la actividad de -- ADC incrementó seis veces más su nivel inicial en células - - transferidas a medio no embriogénico, sin embargo, en medio - embriogénico se observó un incremento de hasta doce veces más. En relación con los niveles de poliaminas, la concentración - de putrescina a las 24 h aumentó dos veces más en medio em -- briogénico en comparación con el medio no embriogénico ⁴⁷.

La embriogénesis en tales cultivos de zanahoria se re - dujo en un 50% cuando fueron tratados con difluorometil argi - nina 1 mM (inhibidor de ADC), en consecuencia la concentra -- ción de putrescina y espermidina también disminuyó. Sin em - bargo, la embriogénesis se restableció cuando se adicionó al - medio putrescina, espermidina o espermina 0.1 mM ²⁵. Final - mente cultivos en suspensión de células de zanahoria tratados con putrescina promueven el desarrollo sincrónico de embrio - nes ¹⁶.

Los primeros estudios de poliaminas en relación con - el desarrollo de embriones de plantas superiores (formación - de la semilla) datan de 1967, cuando Bagni y col. ⁵, determi - naron la distribución de espermidina y espermina durante el -- desarrollo de la planta de trigo, en las etapas de formaci--

del embrión, semilla y planta adulta, destacándose que el embrión maduro (semilla) es el tejido donde se encontró mayor concentración de espermidina y espermina.

Por otra parte, durante el desarrollo de la semilla de arroz, la concentración de poliaminas y en especial putrescina, se incrementó a los 16 días después de la fertilización declinando después gradualmente cuando el embrión está maduro. Este incremento de poliaminas en esta etapa de desarrollo de la semilla fue paralelo a los incrementos de DNA, RNA, proteínas y de la actividad de la enzima ADC ⁵⁴.

En el desarrollo de las semillas de Glicine max (L), los niveles de espermidina en cotiledón se incrementaron conforme aumentó el peso fresco, teniendo un máximo cuando la semilla alcanzó su maduración fisiológica (30 h después de la fertilización), estos cambios acompañaron un decremento de los niveles de putrescina. Aunque en el cotiledón no se detectaron cambios en los niveles de cadaverina, en eje embrionario el mayor cambio se determinó para esta amina ya que semillas maduras llegaron a acumular de 5.5 a 12.0 μM de cadaverina por gramo de peso fresco, mientras que espermidina y espermina solamente se incrementaron ligeramente y putrescina conservó sus niveles iniciales. Estos resultados indican que existen diferencias importantes en los cambios y contenidos de poliaminas de acuerdo al tipo de semilla de que se trate ^{40, 41}.

2.2.2. Senescencia.

Otro de los procesos que se ha relacionado a las poliaminas es el retardo de la senescencia. Existen evidencias de que este efecto es debido a que estas poliaminas estabilizan membranas celulares. Por ejemplo, 0.1 mM de espermina estabiliza la membrana tilacoide de cloroplastos de células de mesófilo de hojas de avena ⁵⁰. Así mismo la permeabilidad y la integridad de la membrana plasmática ha sido estudiada midiendo el flujo de betacianina. Se ha observado que la aplicación de 1mM de las poliaminas espermidina y espermina, reducen el flujo de betacianina y estabilizan la membrana plasmática en discos de raíz de betabel ⁴⁸. En células de hoja de espinaca y en células de manzana en suspensión, este efecto fue más notable cuando se logró reducir el efecto de fungicidas desestabilizadores de membrana como guanantina y dodina a 0.5 mM (estructuralmente relacionados con poliaminas) con la aplicación de espermina 1 mM ⁶.

Uno de los eventos que involucran la senescencia de hojas es la desintegración de la estructura de cloroplastos y una disminución de la clorofila. Se ha observado en discos de hoja de cebada que tratamientos con 0.5 mM de putrescina, espermidina o espermina previnieron la disminución de la clorofila, se estabilizó la membrana tilacoide de cloroplastos y se redujo la senescencia, inducida por estrés en oscuridad -- 17, 49.

Un efecto similar de prevención de disminución de clorofila se observó en segmentos de hojas de trigo incubadas -- con 10 mM de espermidina o espermina, y este efecto fué aún -- más significativo en hojas de soya ²¹.

Este efecto de poliaminas puede depender de la edad -- del tejido analizado: segmentos de hojas de cebada de edad -- temprana (8 días), tratadas con 1 mM de putrescina, espermidina o espermina presentaron una retención de clorofila más -- eficientemente que segmentos de hojas maduras tratadas de -- igual forma ⁶².

Por otra parte, protoplastos aislados de hojas de avena en senescencia impuesta por estrés con manitol 0.6 M presentaron una rápida lisis, un incremento de RNAasas y disminución en su capacidad de síntesis de proteínas, DNA y RNA. -- Sin embargo, cuando estas hojas se trataron previamente con -- 10 mM de putrescina o con 1 mM de cadaverina, espermidina o -- espermina se estabilizaron los protoplastos, se aumentó la -- síntesis de proteínas, DNA, RNA y la división mitótica, con -- lo que se retardó la senescencia ^{16, 36}.

Así mismo, segmentos de hojas de avena, de plántulas -- de 4 a 21 días incubadas en la oscuridad presentaron una rápida senescencia relacionada con la disminución de la actividad de ADC, de los niveles de poliaminas, de clorofila y de --

proteínas. Sin embargo, cuando las hojas fueron expuestas a la luz, se aumentó la actividad de ADC y aumentaron las poliaminas, especialmente espermidina, lo que retardó la senescencia 4, 32, 38.

2.2.3. Estrés

Diversas condiciones de estrés producen cambios metabólicos característicos en tejidos vegetales, uno de ellos es la acumulación de putrescina. El significado fisiológico de esta respuesta no se comprende aún en su totalidad, sin embargo es de gran importancia ya que los vegetales crecen en un ambiente con frecuentes condiciones de estrés a las que se tienen que adaptar. Esta respuesta es considerada como universal, ya que puede ser una protección natural o bien una ventaja selectiva de las células estresadas. Este tipo de estrés puede ser causado por deficiencia o presencia de ciertos iones, acidez del medio o bien por estrés osmótico ^{30, 58}.

En condiciones de deficiencia de iones principalmente K^+ , Mg^{+2} se ha observado un acúmulo de putrescina. Por ejemplo, hojas de plantas de seis especies diferentes de dicotiledóneas y monocotiledóneas cultivadas en deficiencia de potasio incrementaron hasta 16.6 veces más sus niveles de putrescina que el control. Espermidina y espermina se incrementaron solamente 1.9 y 1.2 veces más respectivamente y se postula que probablemente se sintetizaron a partir de putrescina. En tales condiciones la mayor acumulación de putrescina se observó en monocotiledóneas como el maíz y la cebada ⁵⁷.

Esta gradual acumulación de putrescina, en deficien-

cia de iones se ha correlacionado con un incremento de la actividad de la enzima ADC. Hojas de avena cultivadas en un medio deficiente de potasio, denotaron un incremento de putrescina de hasta 15 veces más que el control paralelo con un incremento de 30 veces más de la actividad de ADC y una inhibición de clorosis y necrosis en las hojas tratadas ³⁰.

Un incremento similar de putrescina, aunque en menor proporción, se ha observado en hojas de plantas de cebada creciendo en un medio deficiente de Mg^{+2} , donde los niveles de putrescina aumentan 3.8 veces más que el control, y con deficiencia de Ca^{+2} aumenta 1.5 veces más. En deficiencia de elementos como el fósforo, azufre y nitrógeno no se detectaron cambios significativos en los niveles de poliaminas ^{10, 58}.

En forma semejante a condiciones de deficiencia de iones, un medio conteniendo iones como NH_4^+ y Cd^{+2} inducen la acumulación de esta diamina en forma paralela a una intensa actividad de ADC ⁶⁸. Igualmente causa este efecto la incubación de hojas de chícharo a pH ácido (3.5 a 5) ³⁰.

Bajo condiciones de estrés osmótico, el contenido de putrescina se incrementó hasta 60 veces más que en el control en hojas de avena cuando fueron sometidas durante 6 horas a sorbitol 0.4 M y en condiciones de luz. Las hojas de otros cereales tuvieron una respuesta similar, relacionada con un

incremento de la actividad de la enzima ADC ²⁹, los protoplastos de éstas hojas mostraron baja en la viabilidad simultáneamente al alto contenido de putrescina. El tratamiento con 10 mM de DFMA, inhibidor de la enzima ADC, mejoró la viabilidad de los protoplastos, evitó la acumulación de putrescina e incrementó el contenido de espermidina y de espermina ^{26,27}.

Sin embargo, otras condiciones como es el aumento de 10°C en la temperatura de incubación (25 °C) no afectó el contenido de putrescina en segmentos de hojas de avena, aunque el contenido de espermidina y espermina disminuyó cuando dichos segmentos fueron sometidos 4 a 6 horas en solución amortiguadora a una temperatura de 35 °C ²⁹.

2.2.4. Relación con otros factores reguladores del crecimiento.

Las poliaminas tienen una estrecha relación con otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, aunque esta relación aún no está bien establecida.

Explantos en latencia de Helianthus tuberosus cuando fueron tratados con la auxina sintética 2, 4 -D tuvieron un activo crecimiento del tubérculo que se relacionó con un incremento de 6 veces de putrescina, de 3 veces de espermidina y de 5 veces de espermina ⁶.

Ahora bien, cuando se trataron explantes de este tipo con auxinas como el AIA ($2 \mu\text{M}$) se tuvo una activación del crecimiento del tubérculo de Helianthus tuberosus similar a la que se tuvo al tratar explantes con putrescina o espermidina $10 \mu\text{M}$ o bien con espermina o cadaverina ($100 \mu\text{M}$) ⁶.

Cotiledones de plántulas de lechuga de tres días tratados con citocininas como cinétina ($4.7 \times 10^{-5} \text{ M}$) o con 6-benziladenina ($2.22 \times 10^{-5} \text{ M}$), mostraron un incremento considerable de putrescina. Este incremento fue moderado cuando el tratamiento fue con zeatina ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$). Sin embargo, en presencia de cualquiera de estas citocininas se vio inhibida la síntesis de espermidina y espermina ²².

Un efecto similar al de benziladenina (BA) se observó en cotiledones de algodón. Los cotiledones de dos días que fueron incubados en presencia de benziladenina ($22 \mu\text{M}$) mostraron un incremento de 4 veces más en la actividad de la enzima ADC acompañado con un aumento de 2.5 veces más del contenido de putrescina. Con cinétina se tuvo un efecto similar, pero en menor proporción. En este mismo sistema también se observó un estímulo de tres veces más en la actividad de ADC y de dos veces más en el nivel de putrescina con tratamiento de ácido giberélico (GA_3) 1 mM. Por el contrario, la actividad de la enzima de síntesis de putrescina ADC y el nivel de putrescina fue inhibida en presencia de ABA $100 \mu\text{M}$, este efecto fue revertido con adición de BA, cinétina o GA_3 ⁵¹.

Comparativamente, un aumento de cuatro veces en la actividad de ODC se ha observado durante la germinación de semillas de trigo tratadas con GA_3 o AIA⁴⁰.

En embriones de semillas de arroz incubados por 24 horas y tratados con cinétina 10^{-4}M , se tuvo un incremento de poliaminas, especialmente espermidina, de cuatro veces más -- que el control. La actividad de ADC se incrementó con cinétina 10^{-6}M . Por el contrario, este aumento de poliaminas y de la actividad de la enzima fue inhibida por ABA 10^{-4}M ⁴⁵.

La aplicación exógena de poliaminas no indujo la formación de la raíz en frijol, sin embargo, cuando se aplicó ácido indolbutírico IBA (5×10^{-5} M) se indujo la formación de la raíz con un considerable aumento de poliaminas ³².

2.3. La semilla de maíz.

El maíz (Zea mays L) fué el cereal precolombino característico de América, primera referencia de su existencia data de 1492 cuando dos españoles enviados por Colón exploran el territorio de Cuba. Este descubrimiento contribuyó para que el maíz sea considerado como un cultivo de gran importancia económica y agrícola, ya que actualmente es la segunda planta alimenticia más importante del mundo, tomando en cuenta los niveles de su producción ¹⁰.

El maíz es una planta herbácea anual que se encuentra dentro del grupo de las Angiospermas y presenta raíces fibrosas, tallo cilíndrico con hojas alternas dispuestas en dos filas con nervadura paralela y márgenes enteros. Por ser miembro de la familia de las gramíneas presenta flores pequeñas que en su conjunto forman una inflorescencia denominada espiga. Cada flor está formada por un gineceo (compuesto por un óvulo encerrado por carpelos esporofilos e incluidos en un ovario con estigma terminal) y un androceo convencional (formado por una antera y un filamento). Sin embargo, el perianto se encuentra reducido a dos pequeñas piezas vestigiales llamadas brácteas que protegen las restantes partes florales. Cada flor da lugar a un fruto cariopside (grano), que es pequeño, seco, indehisciente y con una sola semilla cuya testa se encuentra fusionada con el pericarpio del fruto. Esta semi-

lla es el resultado de la fertilización del óvulo por el gameto masculino, como consecuencia de la polinización del estigma 11, 13, 24, 42, 44.

La semilla está formada básicamente por una testa, un endospermo y un embrión que da lugar a la planta adulta, cada una de estas partes está formada como a continuación se indica (Fig. 3):

a) Testa o cubierta de la semilla:

- Zona pigmentada
- Capa micelar o hialina.

b) Endospermo:

- Capa de aleurona.
- Endospermo córneo (cristalino).
- Endospermo amiláceo (opaco).

c) Embrión.

- Escutelo (cotiledón).
- Eje embrionario.

a) Testa:

La testa o cubierta de la semilla se origina de los tegumentos del óvulo fecundado y la nucela resulta totalmente destruída en el caso del maíz, por lo que la estructura celu-

lar está casi obstruída, pero ofrece una función protectora, - con importancia fisiológica ya que confiere a la semilla un - grado de impermeabilidad al agua y/o gases incluyendo al oxí - geno, por lo que consecuentemente puede ejercer influencia re - gulatoria sobre el metabolismo, el crecimiento de los teji - dos y órganos internos de la semilla 11, 20, 24, 44.

La capa interior de la testa está profundamente pig - mentada y da al grano de maíz su color característico. La ca - pa hialina (resto de la epidérmis) es incolora y sin estructu - ra celular 11, 13.

b) Endospermo:

El endospermo es el tejido que se origina del núcleo - triploide o núcleo del endospermo, que se forma por la triple fusión de dos núcleos polares maternos con uno de los núcleos espermáticos. El endospermo es el tejido nutricio del embrión formado por células de paredes finas que son de tamaño, forma y composición variable ya que estas células pueden contener - almidón, lípidos y proteínas importantes durante la germina - ción y el establecimiento de la plántula 11, 13, 42.

La capa de aleurona es una capa de células cúbicas de paredes gruesas que rodea al endospermo, estas células no con - tienen almidón pero son ricas en grasas y proteínas 20.

c) Embrión:

El embrión es el resultado de la fertilización de la célula huevo en el saco embrionario por uno de los núcleos -- masculinos del tubo del polen. En el caso de una monocotiledónea como el maíz, el único cotiledón sencillo se convierte en escutelo 11, 13, 24. El cual tiene la función de movilizar las reservas alimenticias almacenadas en el endospermo y enviarlas al eje embrionario cuando la semilla germina, periodo durante el cual permanece funcionando como órgano absorbente 13, 42.

El eje embrionario está formado por una plúmula que contiene tejido meristemático que dará lugar al tallo y las hojas de la futura planta adulta y la radícula que por consiguiente dará lugar a la raíz 11, 13, 42.

El eje embrionario y el escutelo son importantes por su contenido de proteínas y además en el escutelo se encuentra la mayor parte de la Vitamina B₁ 11, 42.

Dada la importancia del maíz para la alimentación humana y animal cabe destacar que la semilla de maíz contiene:

Humedad (%)	16.7
Almidón (%)	71.5
Proteínas (%)	9.91

29

Grasas (%)	4.78
Fibra (%)	2.66
Azúcares (%)	2.58
Cenizas (óxidos)	1.42
Carotenoides totales (mg/kg)	30.0

(Tomado de Bewley, 1978).

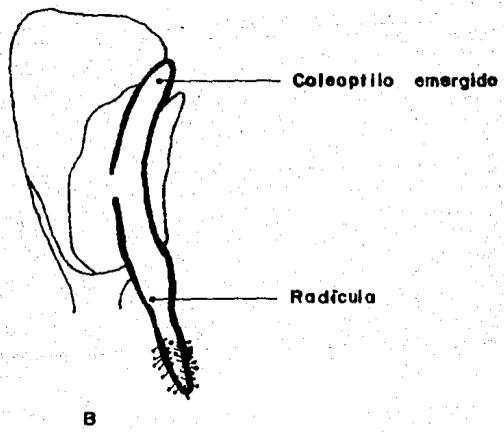
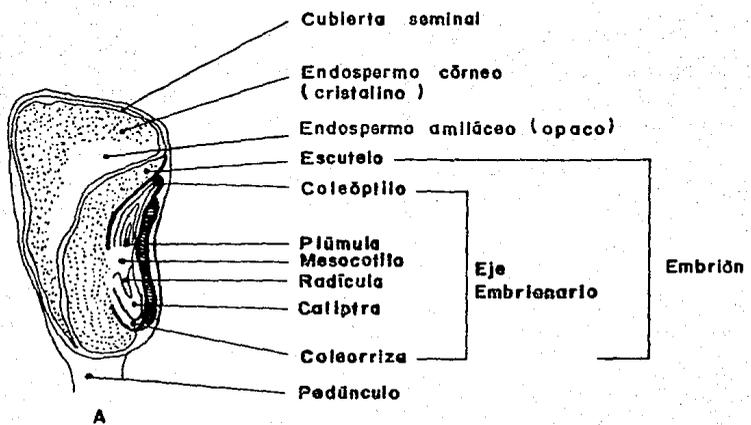


Fig.3 A) Estructura de la semilla de maíz (Zea mays).
B) Semilla de maíz germinada (14)

2.4. Germinación, viabilidad y vigor.

La semilla es una estructura en reposo que por lo general esta sumamente deshidratada, cuyos procesos metabólicos están suspendidos debido precisamente a su condición de vida interrumpida, principalmente por la carencia de agua y oxígeno 11, 13.

La germinación de semillas de plantas superiores involucra los siguientes eventos:

a) Hidratación o imbibición: Durante la cual el agua penetra en el embrión e hidrata proteínas y otros coloides. Sin embargo, dada que esta absorción de agua es en gran parte un proceso físico, que da un aumento de volumen, puede efectuarse aún en semillas no viables 34.

b) La formación o activación de enzimas, que conduce a un aumento de la actividad metabólica.

c) El alargamiento celular y la emergencia de la radícula con el rompimiento de la testa. Etapa considerada como germinación.

Finalmente la división en los tejidos meristemáticos del embrión conduce al crecimiento y la formación de una plan

ta adulta semejante a su progenitora 11, 42, 52.

Cabe destacar que el momento exacto en el cual la germinación ha terminado y comienza el crecimiento es difícil de determinar. Por ello, la germinación se identifica visualmente como el rompimiento de la testa 42, 52.

Para que una semilla germine, son necesarias varias condiciones intrínsecas o propias de la semilla y extrínsecas o dependientes del medio en que se encuentra.

Entre las intrínsecas están que las semillas estén bien formadas, sanas y con suficiente madurez fisiológica, y entre las extrínsecas están el agua, la temperatura, oxígeno y luz.

El agua es importante para romper los tegumentos, facilitar la salida del embrión y para las reacciones químicas de estos procesos.

La temperatura es un factor específico para cada especie, ya que las semillas presentan un rango de temperatura característico en el cual germinan, por debajo o arriba de este rango no germinan.

El oxígeno puede cambiar el metabolismo en los esta-

dos iniciales de la germinación, ya que puede ser anaerobio-- y cambiar a aerobio tan pronto como la testa se rompe y penetra el oxígeno 12, 42,

No obstante otro factor importante en la germinación-- es la edad de la semilla, aunque existen reportes que señalan que existieron semillas que sobrevivieron un almacenaje de -- 100 años, la mayoría no logra sobrevivir este período 13.

Las semillas son bastante resistentes a condiciones - extremas, ya que se encuentran en un estado de desecación y - no obstante permanecen viables y la viabilidad es la capacidad que tienen las semillas de retener su habilidad para germinar 12.

Las características adicionales de alta viabilidad -- son una germinación rápida y establecimiento de una plántula-- vigorosa con aspecto normal 34.

El período de viabilidad está determinado genéticamen-- te y por las condiciones ambientales, por lo que el tiempo en que una semilla permanece viable depende del tipo de semilla-- y considerablemente de las condiciones de almacenamiento. La viabilidad es mejor retenida cuando las condiciones de almace-- namiento permiten una actividad metabólica reducida en las -- semillas, por ejemplo, bajas temperaturas y altas concentra-- ciones de dióxido de carbono 12, 44, 52.

En la mayor parte de las semillas la ausencia de humedad es una condición esencial de almacenamiento para la retención de la viabilidad, sin embargo esto no es general ya que muchas semillas permanecen viables sumergidas en agua ¹².

No sólo el estrés por almacenamiento inadecuado influye en la pérdida de viabilidad, una serie de factores a los que estuvo sometida la planta progenitora, como es la disponibilidad de agua, luz, temperatura, nutrientes, etc, durante la formación y madurez de la semilla pueden afectar la viabilidad de la semilla ^{12, 44}.

La germinación se mide en dos parámetros: el porcentaje y la velocidad de germinación, y la viabilidad se encuentra representada por el porcentaje de germinación. Con frecuencia un porcentaje y una velocidad de germinación bajos se encuentran asociados con una baja en la viabilidad y el vigor de la semilla ³⁴.

La reducción de estas características puede ser el resultado de diferencias genéticas entre cultivos, desarrollo incompleto de la semilla en la planta, lesiones durante la cosecha, enfermedades durante la formación de la semilla, manejo y almacenamiento inapropiado, y envejecimiento de la semilla. La pérdida de viabilidad generalmente se ve precedida -

por una disminución en el vigor y semillas con bajo vigor son fácil y frecuentemente atacadas por organismos patógenos, así mismo carecen de fuerza para emerger de la superficie del suelo e incluso difícilmente logran romper la testa y emerger -- 12, 34.

2.5 Poliaminas, germinación y viabilidad.

Existen pocos trabajos relacionados con la germinación de semillas de plantas superiores y los niveles de poliaminas durante este proceso. Uno de éstos es el realizado por Villanueva y col⁶⁵, quienes determinaron los cambios en los niveles de poliaminas durante la germinación de semillas de leguminosas y gramíneas.

Al inicio de la germinación, semillas de Phaseolus mungo presentaron menor concentración de putrescina que espermidina y espermina, sin embargo, durante las primeras horas putrescina comenzó a incrementarse alcanzando un máximo de 15 veces más que su nivel inicial a los diez días de germinación. Espermidina y espermina tuvieron ligeros cambios y decrecieron gradualmente. Los cambios de poliaminas totales se relacionaron con los niveles de RNA y proteínas⁶⁵. Asimismo, semillas de Pisum sativum sufrieron un incremento de putrescina de hasta 8 veces más que en el control a las 24 horas de germinación aunque espermidina se incrementó ligeramente, espermina y cadaverina no tuvieron cambios drásticos. Estos niveles se relacionaron con el contenido de RNA y proteínas principalmente a las 24 horas de germinación⁶⁵. Semillas de Zea mays tuvieron un incremento de hasta cinco veces más en su nivel inicial de putrescina a las 144 horas, espermidina también tuvo un máximo en este tiempo pero decreció gradualmen-

te ⁶⁵. Sin embargo, durante la germinación de Triticum aestivum, espermidina fué la poliamina que se incrementó drásticamente ya que aumentó hasta 20 veces más que su nivel inicial a las 6 horas de germinación y a las 144 horas conservó 10 veces más su nivel original, putrescina aumentó 3 veces más que su nivel inicial a las 144 horas de germinación y espermina, cadaverina y agmatina no tuvieron cambios notables ⁶⁵.

Por otra parte, en semillas de arroz se determinó a las 24 horas de germinación un incremento de poliaminas, especialmente putrescina aumentó 24 veces más su nivel inicial cadaverina, espermidina, agmatina y espermina aumentaron 14, 15, 14 y 4 veces más respectivamente, estos cambios se vieron acompañados por la actividad de la enzima arginina des-carboxilasa (ADC), aunque no se determinaron cambios paralelos drásticos en el contenido de DNA, RNA y proteínas ⁵⁴.

Comparativamente, en embriones de semillas de Glycine max se observaron incrementos notables a las 4 y 30 horas de germinación, relacionados con un aumento en el contenido de proteínas, síntesis de DNA y activa división celular en el meristemo apical de la raíz. Cambios similares se observaron en este tejido y en el contenido de espermidina y espermina pero no en el contenido de proteínas para Helianthus

annus y Triticum durum ².

En ejes embrionarios de chícharo, cadaverina y putrescina se incrementaron durante los seis primeros días de germinación, mientras que espermidina y espermina disminuyeron durante este período. En cotiledones, putrescina es la única poliamina que aumentó significativamente ⁵⁹.

Existen sin embargo, resultados contradictorios en relación con poliaminas y viabilidad de semillas de plantas superiores. Sorprendentemente los niveles de putrescina, espermidina y espermina se incrementaron en semillas de arroz con baja viabilidad y vigor. Estas semillas de arroz con alta viabilidad (100 % de germinación) y alto vigor cuando se imbibieron por cinco horas tuvieron menor concentración de poliaminas que semillas de arroz con 25% de viabilidad y bajo vigor. Esta diferencia se hizo más notable cuando se compararon con semillas no viables (0 % de germinación) las cuales mostraron una alta concentración de poliaminas, entre las que espermina fue la de mayor concentración. Sin embargo, la actividad de la enzima ADC y la concentración de DNA, RNA y proteínas fue mayor en embriones con alta viabilidad ⁴⁵.

3) MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material Biológico:

-Semillas de maíz (Zea mays L.) donadas por el Dr. - José Molina del Colegio de Prosrados de Chapingo, Edo. de México, de las variedades; Compuestos Universal, Criollo de Mezquital y Tuxpeño Crema de cosechas recientes (no almacenadas) y de lotes almacenados por perodos considerables (Tabla 1).

Variedad de maíz	Cosecha (año)	
	No almacenada	Almacenada
Compuesto Universal	1984 (CU - 84)	1970 (CU - 70)
Criollo de Mezquital	1985 (CM - 85)	1973 (CM - 73)
Tuxpeño Crema	1984 (TC - 84)	1972 (TC - 72)

Tabla 1. Edad de las semillas de maíz.

-Tejidos embrionarios: eje y escutelo que fueron obtenidos de semillas de maíz, no germinadas y germinadas por diferentes perodos. Al término de cada perodo se disectaron manualmente obteniendo los tejidos que se utilizaron para la extracción de poliaminas.

3.1.2 Reactivos:

-Putrescina, espermidina y espermina de Sigma Chemi--

cal Company.

- Cloruro de dancilo de Aldrich.
- Acetato de etilo especifico para separaciones cromatograficas por fluorescencia, benceno y trietilamina de Merck.
- Kieselgel 60GF con indicador de fluorescencia de Merck y las placas de 20 X 20 cm preparadas en el Departamento de Quimica Orgánica de la DEPg. Facultad de -- Quimica, UNAM.
- Los demás reactivos fueron de grado analítico.

3.1.3. Equipo:

- Homogeneizador Politrón Ultra Turrax
- Ultracentrifuga Beckman modelo L5 - 75, Rotor 75 - Ti.
- Ultracentrifuga IEC, Rotor 494.
- Centrifuga MSE.
- Espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo 203.
- Lámpara de luz ultravioleta.

3.2.1. Germinación de semillas:

Para cada tiempo de germinación se incubaron grupos de 20 a 25 semillas, dependiendo de la variedad de maíz, en frascos con algodón húmedo con 13 ml de agua desionizada a -- $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en la oscuridad. Con este procedimiento se obtuvie-

ron las curvas de germinación correspondientes, considerando-- como germinación el rompimiento de la testa por la radícula. - Para las semillas no almacenadas los tiempos considerados fueron: 0, 12, 18, 24, 28, 32, 39, 43 y 47 h estos tres últimos - tiempos dependieron de la variedad y correspondieron al 100% - de germinación y para las almacenadas se consideraron los tiempos anteriores más 48, 72, 96, 144 y 166 h, estos últimos tiempos también dependieron de la variedad.

3.2.2. Determinación de poliaminas:

El método para la determinación de poliaminas que se - utilizó fue el descrito por Flores y Galston²⁸ con algunas - - adaptaciones para tejidos embrionarios de maíz (Fig. 4).

3.2.2.1. Extracción de poliaminas:

Cada 100 mg de tejido seco (eje o escutelo) o su equi valente en peso fresco se homogenizó con 1 ml de ácido perclórico frfo (HClO_4) al 5% en un mortero con hielo seco y en un - baño de hielo posteriormente se terminó de homogenizar duran te 3 min. en politrón a velocidad intermedia. Este homogeneiza do se mantuvo en agitación constante durante 1 h para ser cen trífugado a 26 000 g por 20 min. y a 4° C.

El sobrenadante se guardó en tubos de vidrio Pyrex con tapón de rosca y se mantuvo en baño de hielo. El precipitado se resuspendió durante 1 h con la mitad de HClO_4 utiliza - -

do inicialmente y se centrifugo nuevamente a 26 000 g por 20 min. a 4°C. El sobrenadante resultante se juntó con el obtenido durante la primera centrifugación. Este extracto fue -- guardado a -20°C hasta que fue utilizado.

3.2.2.2. Dansilación:

Se tomaron 200 μ l del extracto en HClO_4 y se añadieron 400 μ l de cloruro de dansilo filtrado (5 mg/ml de acetona) - agitándolo durante 1 min. en un vortex. Se agregaron 200 μ l de una solución saturada de carbonato de sodio (300 mg/ml de H_2O) y se agitó durante 2 min. en vortex. El pH de esta reacción fué siempre básico (9.0 - 9.3). Posteriormente se incubó en la obscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche (16 h).

Después de incubar durante este período la reacción - se detuvo y se quitó el cloruro de dansilo con 200 μ l de prolina (100 mg/ml de H_2O) agitado por 3 min. en un vortex e incubado durante 1 h a temperatura ambiente y en la obscuridad.

3.2.2.3 Extracción de poliaminas densiladas:

Después de 1 h de incubación se agregaron 0.5 ml de - benceno y se agitó en vortex durante 1 min, la fase superior resultante se guardó en tubos de vidrio Pyrex con tapón de -- rosca a -70 °C hasta ser utilizado.

3.2.2.4. Identificación de poliaminas dansiladas por cromatografía de capa fina (TLC).

De la fase orgánica en benceno se tomaron 100 μ l para cargar la zona preadsorbente de la placa de Kieselgel previamente activada durante 1 h a 110°C. El cromatograma se desarrolló durante 1 h en el sistema de solventes de Cloroformo: - Trietilamina (25:2 v/v). Con una lámpara de luz ultravioleta se identificaron las bandas correspondientes de cada poliamina por sus Rf, comparado con el estándar y por el reportado en la bibliografía 58.

	Rf	$\pm \sigma$
Putrescina	0.40	0.03
Espermidina	0.62	0.02
Espermina	0.70	0.02

3.2.2.5. Elución:

Las bandas correspondientes a cada poliamina se rasparon y se les agregaron 2 ml de acetato de etilo, se mantuvo en agitación constante durante 10 min, aproximadamente a 50°C (baño María) y se centrifugó a 2 800 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recogió en tubos de vidrio y se mantuvo en frío. El precipitado se resuspendió y se le aplicó el procedimiento anterior, el sobrenadante se recogió y se juntó con el primero. La fluorescencia en esta muestra no es muy esta-

ble por lo que fue conveniente leer en el espectrofluorómetro en un máximo de 24 h después de la elución final.

3.2.2.6. Cuantificación de poliaminas:

Las poliaminas dansiladas (Fluorescentes) se cuantificaron en el espectrofluorómetro marca Perkin-Elmer a 363 nm de excitación y 495 nm de emisión, a una escala de 10X unidades de fluorescencia, pero a sensibilidad de 10 para putrescina y espermidina, y de 9 para espermina.

3.2.3. Curvas patrón:

Se prepararon soluciones madre para cada poliamina -- con diferente molaridad en HClO_4 al 5% :

-Para putrescina: 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.375 y 0.5 mM.

-Para espermidina y espermina: 0.0125, 0.0250, 0.0375, 0.05 y 0.1 mM.

De cada solución madre se tomaron 200 μl que fueron dansilados, cromatografiados y cuantificados como las muestras problema, obteniéndose las curvas patrón en los siguientes rangos: 0 a 20 nanomoles (nmol) para putrescina (Fig. 5a) y de 0 a 4 nmol para espermidina (Fig. 5b) y espermina (Fig. 5c), rangos que comprendieron los detectados en la muestra problema,

las cuales fueron cuantificadas, extrapolando en estas curvas patrón.

El blanco de ajuste: Se utilizó raspando una zona de la placa de Kieselgel no fluorescente y se eluyó en forma semejante a las muestras problema.

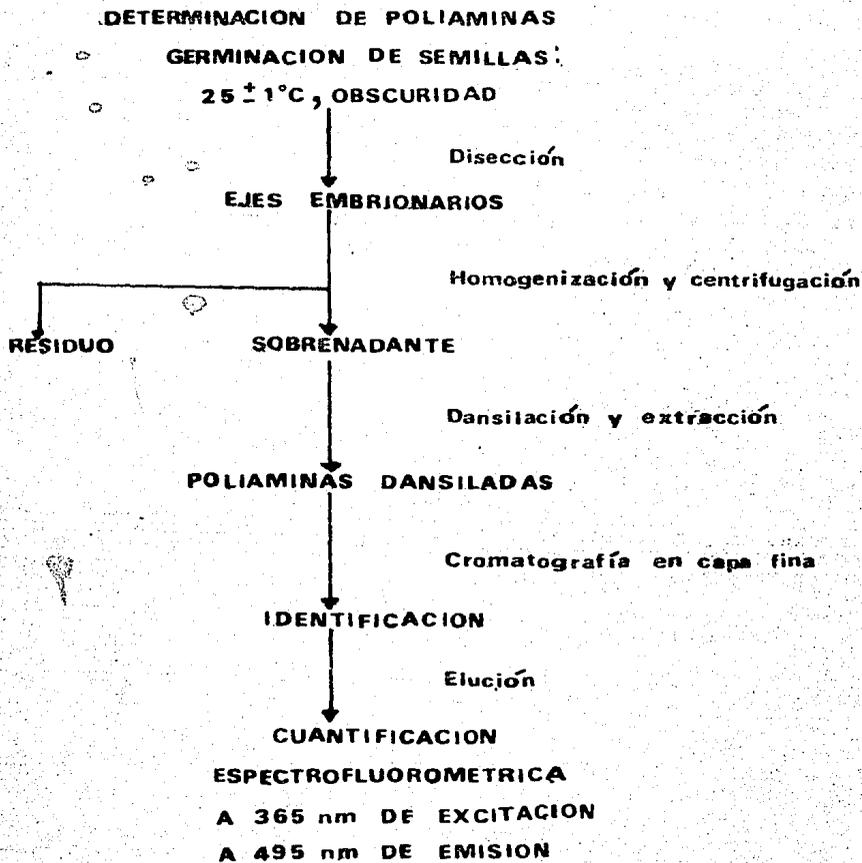
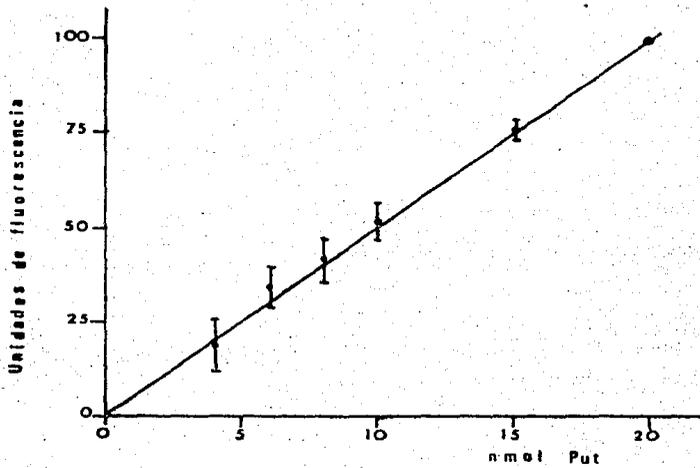
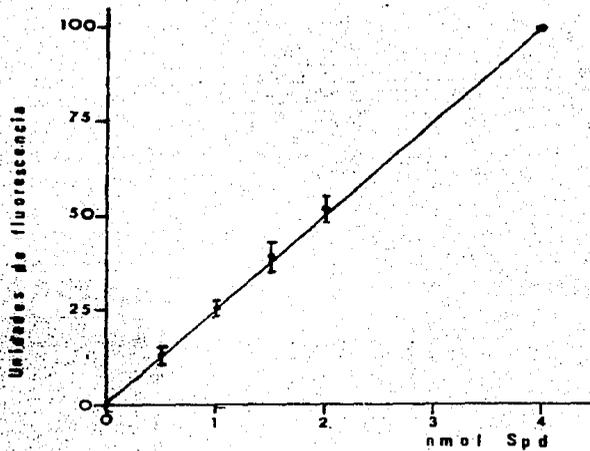


Fig.4 Metodología

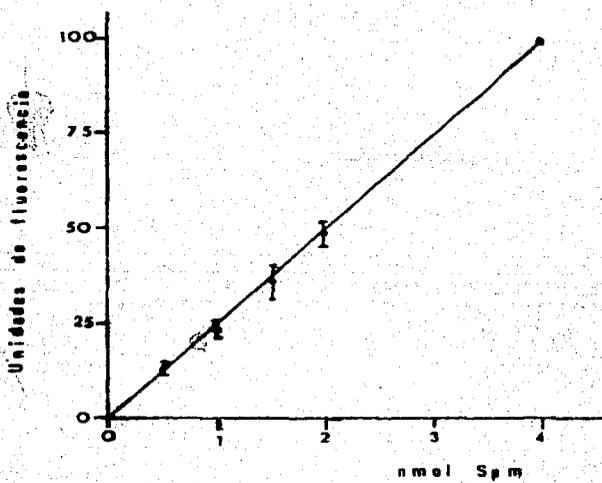


a) PUTRESCINA



b) ESPERMIDINA

Fig.5 Curvas patrón



c) ESPERMINA

4) RESULTADOS

Este estudio se hizo con semillas de las variedades de maíz: "Criollo del Mezquite" (CM), "Tuxpeño Crema" (TC) y "Compuesto Universal" (CU). De cada variedad se utilizaron semillas de cosechas recientes (CM-85, TC-84 y CU-84) y almacenadas por periodos prolongados (CM-73, TC-72 y CU-70).

Se obtuvieron las curvas de germinación tanto de semillas de cosechas recientes como almacenadas de dichas variedades de maíz, de acuerdo a las cuales se determinaron los niveles de: putrescina, espermidina y espermina en los tejidos embrionarios: eje y escutelo.

4.1. Viabilidad y velocidad de germinación.

Las semillas de las variedades de maíz no almacenadas estudiadas en este trabajo: CM-85, TC-84 y CU-84 mostraron típicas curvas de germinación (Fig. 6a) y una alta viabilidad (100% de germinación). Sin embargo, las curvas de germinación de las semillas almacenadas de las variedades: CM-73 y TC-72 mostraron una pérdida de viabilidad de un 50% y las semillas también tuvieron una pérdida de su velocidad de germinación (Fig. 6b).

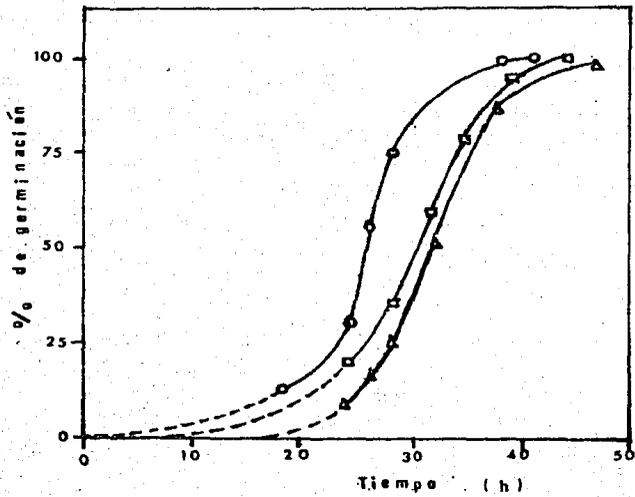


Fig. 6a Viabilidad de las semillas de cosechas recientes.
 ○ CM-85, □ CU-84, △ TC-84.

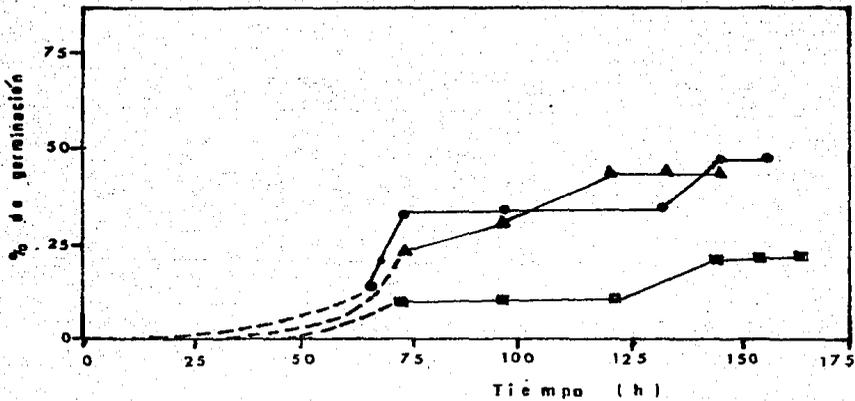
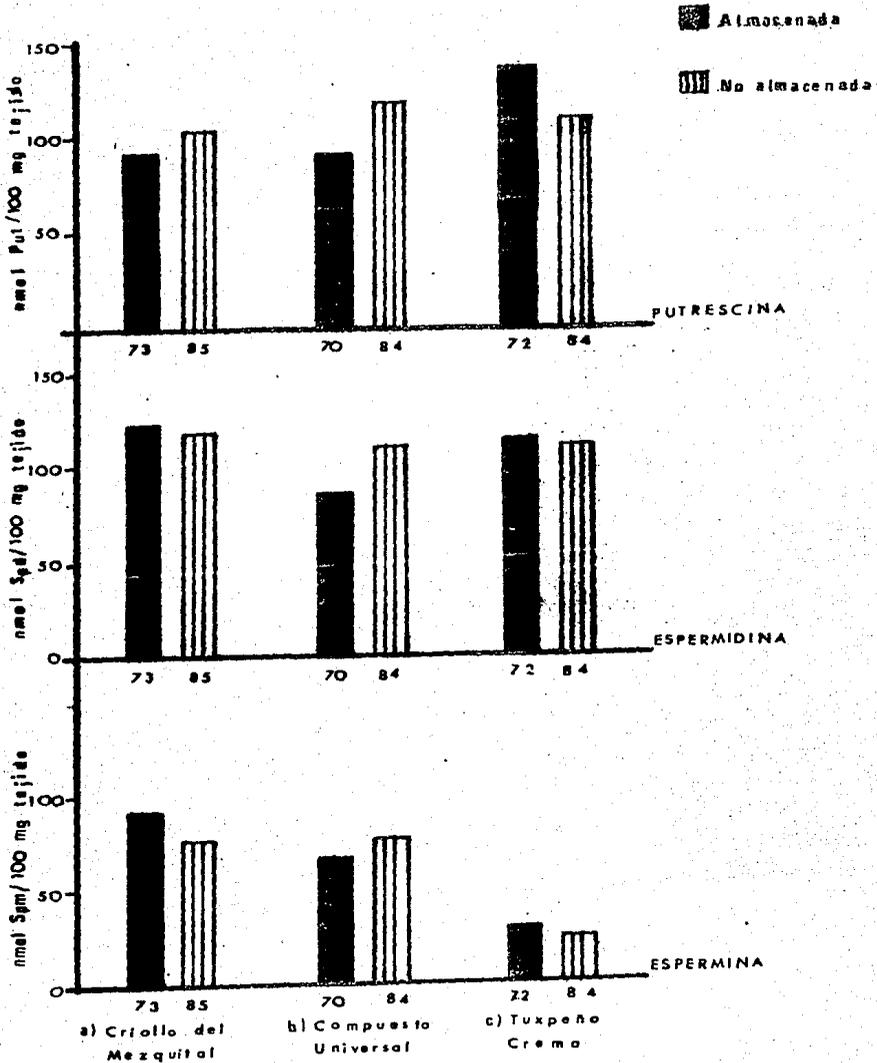


Fig. 6b Viabilidad de las semillas de cosechas almacenadas.
 ● CM-73, ■ CU-70, ▲ TC-72.

4.2 Niveles de poliaminas en eje embrionario de semillas secas

Se determinó el contenido de las tres poliaminas en los ejes embrionarios de las semillas no imbibidas de las tres variedades analizadas. Se encontraron niveles de putrescina de 95 a 130 nanomoles y de espermidina de 90 a 125 nanomoles por cada cien mg. de tejido. En relación con el contenido de espermina se encontró dentro de un rango de 70 a 90 nanomoles en los ejes embrionarios de las semillas de las variedades -- Criollo de Mezquita] y Compuesto Universal, pero en la variedad Tuxpeño Crema este valor fue de 30 nanomoles de espermina por cada cien mg de tejido (Fig. 7).

Se analizó así mismo, el contenido de cada poliamina en los ejes de las semillas almacenadas. Se encontró que los ejes embrionarios de semillas almacenadas tuvieron contenidos semejantes de poliaminas a los valores determinados en los -- ejes embrionarios de semillas no almacenadas. Estos valores indican que el almacenamiento no dañó el contenido endógeno de las poliaminas en los ejes embrionarios de las semillas de -- maíz estudiadas (Fig.7).



7 Comparación de los niveles de poltaminas en eje embrionario de semillas secas.

4.3 Niveles de poliaminas en los ejes embrionarios durante la germinación.

En los ejes embrionarios de las semillas de maíz CM-85 a las 39 h de imbibición y de las semillas de la variedad TC-84 a las 47 h de imbibición (ambos tiempos con 100% de germinación), se encontró un aumento de putrescina de 8.5 veces -- más que su contenido endógeno inicial (Figs. 8a y 10a). En forma similar a las 43 h de imbibición (100% de germinación) los ejes embrionarios de las semillas de maíz CU-84 denotaron un aumento de putrescina de 7 veces más que su contenido endógeno inicial (Fig. 9a).

Comparativamente a los ejes de las semillas de cosechas recientes, en los ejes embrionarios de las semillas de maíz CM-73 se observó un incremento en el contenido endógeno de putrescina de 13.5 veces más a las 144 h de germinación, - tiempo de máxima germinación (Fig. 8b). En este tejido en -- las semillas de la variedad CU-70 a las 166 h de germinación se tuvo un incremento de putrescina de 10.3 veces (Fig. 9b).- También en los ejes de las semillas de TC-72 a las 144 h de - imbibición se observó un incremento de 12.5 veces más con respecto a su contenido inicial (Fig. 10b).

Estos resultados muestran que la putrescina es la diamina que se incremento más intensamente al final de la germinación en los ejes embrionarios tanto de semillas no almacenadas como en las almacenadas, de las tres variedades estudiadas.

En cuanto a la espermidina, se observó una tendencia a incrementar su contenido endógeno inicial de 1.5 a 3 veces, en los ejes embrionarios de las semillas de maíz no almacenadas (Figs. 8b, 9b y 10b).

Por el contrario la espermidina, aunque tuvo ligeros cambios al inicio de la germinación en los ejes de las semillas de maíz CM-73 y de CU-70, al final de la germinación no registro un incremento significativo (Figs. 8b y 9b), excepto en los ejes de la variedad de TC-72 en los que duplicó su contenido endógeno (Fig. 10b).

Espermina es la poliamina que tendió a incrementarse en menor proporción en los ejes embrionarios de las semillas analizadas. Al final de la germinación en los ejes de las semillas de CM-85, de CU-84 y de TC-84 se encontró un incremento de esta poliamina hasta de dos veces más que el contenido endógeno inicial (Figs, 8a, 9a y 10a).

En los ejes de las semillas almacenadas de CM-73 y de CU-70 se observó el mismo nivel inicial al final de la germinación (Figs. 8b y 9b). En los ejes de las semillas de TC-72 esta poliamina duplicó su contenido endógeno al final de la germinación (Fig. 10b).

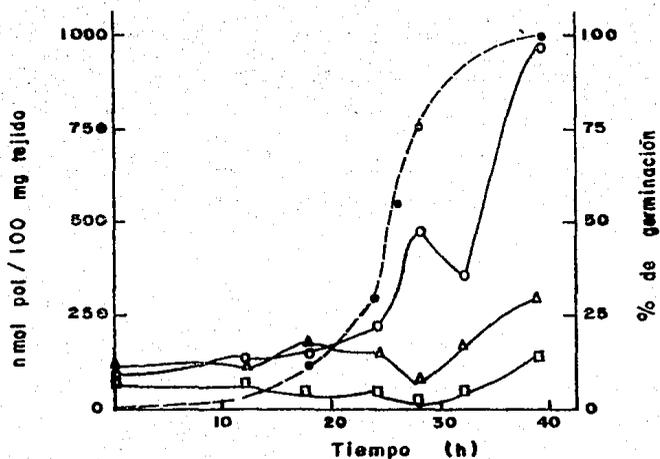


Fig. 8a Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz; CM-85.

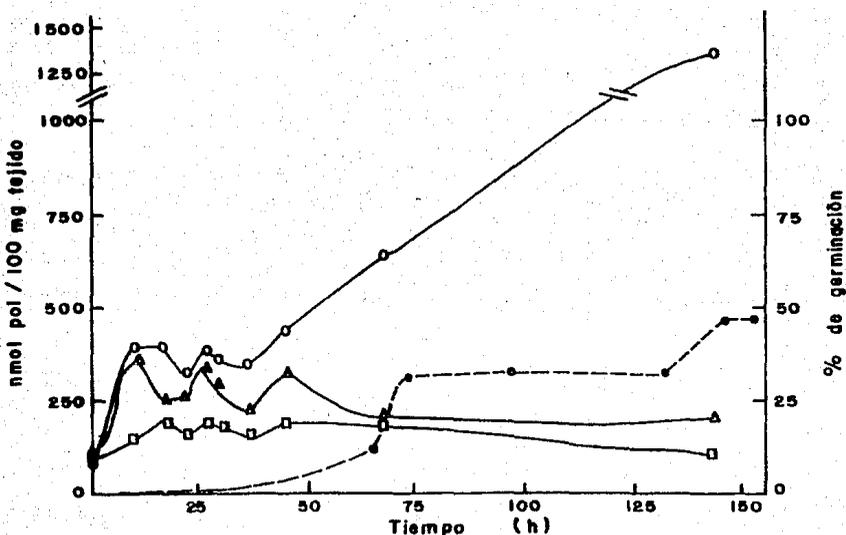


Fig. 8b Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz CM-73.

● germinación, ○ Putrescina, ▲ Espérmidina, □ Espérmina.

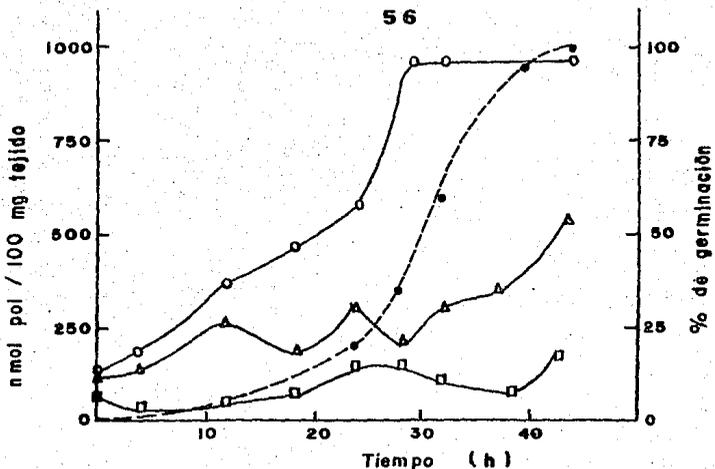


Fig.9a Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz CU-84 .

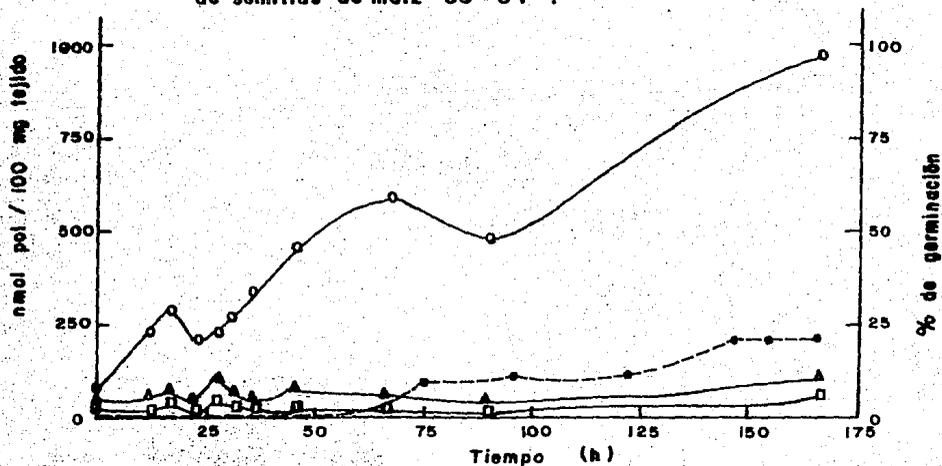


Fig-9b Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz CU-70 .

• germinación , o Putrescina , Δ Spermidina , □ Espermina .

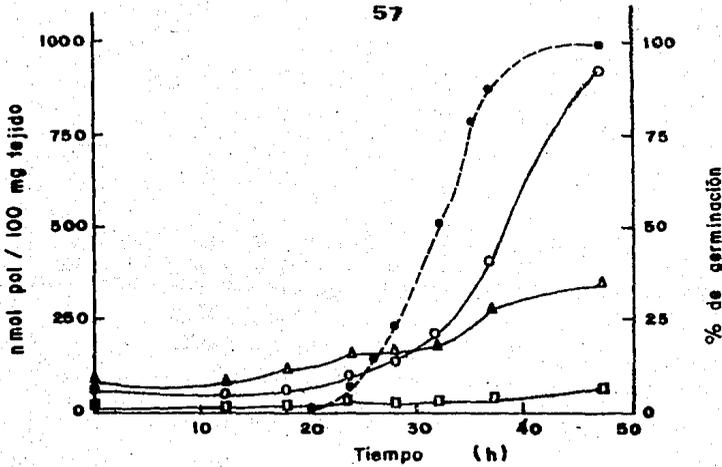


Fig. 10a Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz TC-B4 .

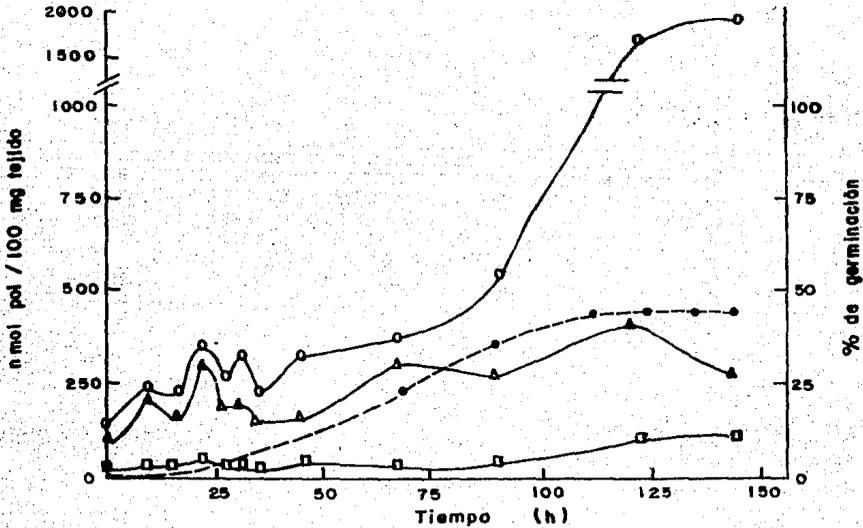


Fig. 10b Niveles de poliaminas en eje embrionario durante la germinación de semillas de maíz de TC-72 .

o germinación, o Putrescina, Δ Espermidina, □ Espermina.

4.4. Niveles de poliaminas en escutelo de semillas secas.

En los escutelos de las semillas secas (no imbibidas) de las tres variedades analizadas, se determinó que putrescina es la poliamina que se encuentra en mayor proporción (90 a 115 nanomoles) antes de que se inicie la germinación, le sigue espermidina (60 a 90 nanomoles) y espermina (40 a 50 nanomoles por cada cien mg de tejido) (Fig. 11).

Analizando el contenido de cada poliamina en los escutelos de las semillas almacenadas y no almacenadas, se determinó que los escutelos de las semillas almacenadas tuvieron contenidos semejantes de las tres poliaminas que los escutelos de las semillas no almacenadas.

Estos resultados indican que el almacenamiento no daña el contenido endógeno de poliaminas en los escutelos de las semillas de maíz estudiadas (Fig. 11).

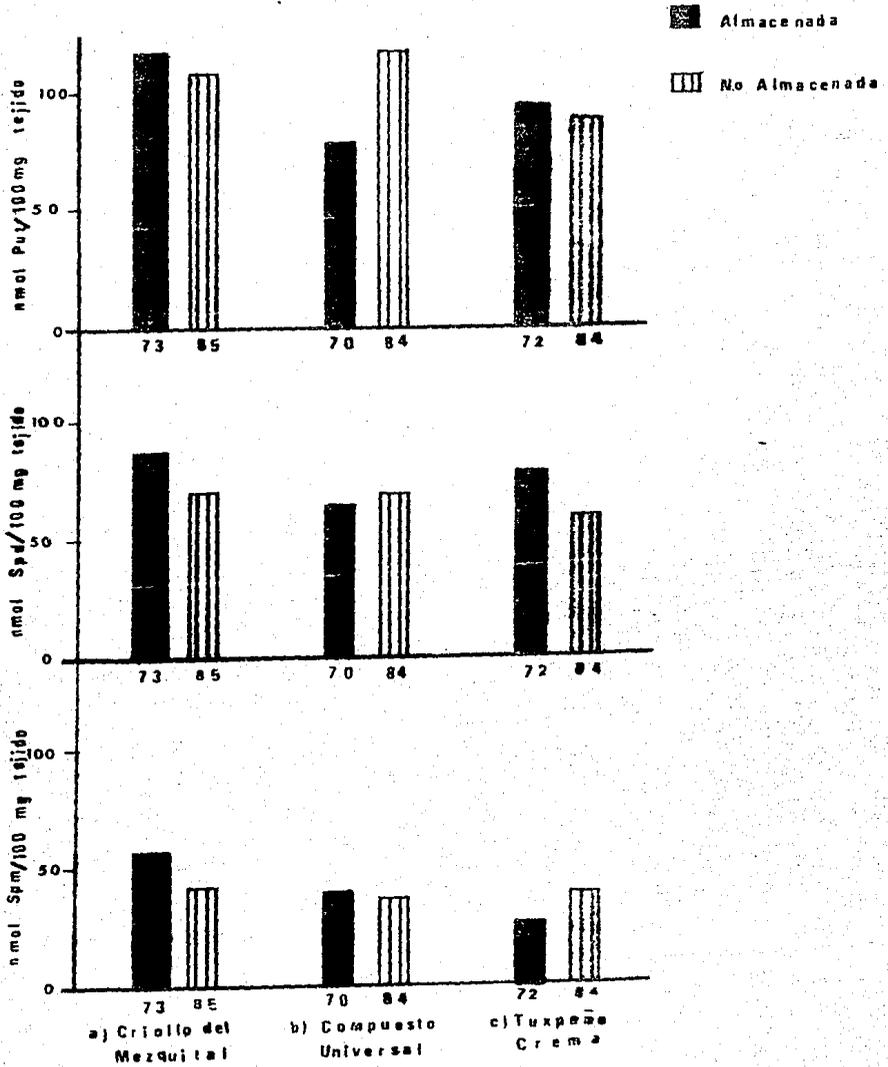


Fig 11 Comparación de los niveles de poliaminas en escutelo de semillas secas

4.5. Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación.

En escutelo de semillas de CM-85 a las 39 h y de CU-84 a las 43 h de germinación se observó respectivamente, un incremento del contenido endógeno inicial de putrescina de 3 y de 2.5 veces más (Figs. 12a y 13a), mientras que en los escutelos de las semillas de TC-84 a las 47 h (100% de germinación) se observó un incremento de 2.0 veces más en el contenido inicial de putrescina (Fig. 14a).

Analizando los niveles de putrescina en escutelo de las semillas de las variedades de TC-72 y de CM-73 se encontró respectivamente un incremento del contenido endógeno inicial de putrescina de 5 y 6 veces más a las 144 h de germinación (Figs. 12b y 14b). En este tejido de las semillas de CU-70 a las 166 h de germinación se observó un incremento del contenido inicial de esta diamina de 7 veces más (Fig. 13b).

Por otra parte, espermidina en los escutelos de las semillas de CM-85 y de CU-84 incrementó su contenido endógeno inicial, 2 y 3 veces respectivamente al final de la germinación (Figs. 12a y 13a). En escutelo de semillas de TC-84 esta poliamina duplicó su contenido endógeno inicial a las 47 h de germinación (Fig. 14a).

En escutelo de las semillas de las tres variedades:

CM-73, CU-70 y TC-72, espermidina duplicó su contenido endógeno al final de la germinación (Figs. 12b, 13b y 14b).

En relación con espermina, se encontró que los niveles de esta poliamina al final de la germinación, fueron aproximadamente el doble de los valores iniciales tanto en los escutelos de las semillas no almacenadas como en las almacenadas de las tres variedades analizadas (Figs. 12., 13 y 14).

Una excepción a este comportamiento se observó en los escutelos de las semillas de CM-73 que conservaron los mismos niveles endógenos iniciales de esta poliamina a las 144 h de germinación (Fig. 12b).

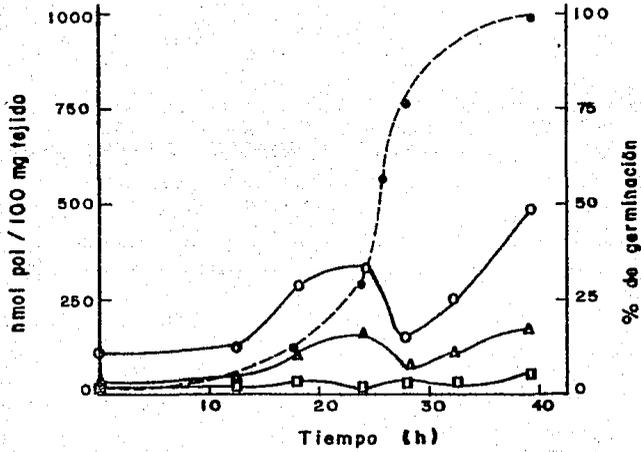


Fig.12a Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz CM - 85 .

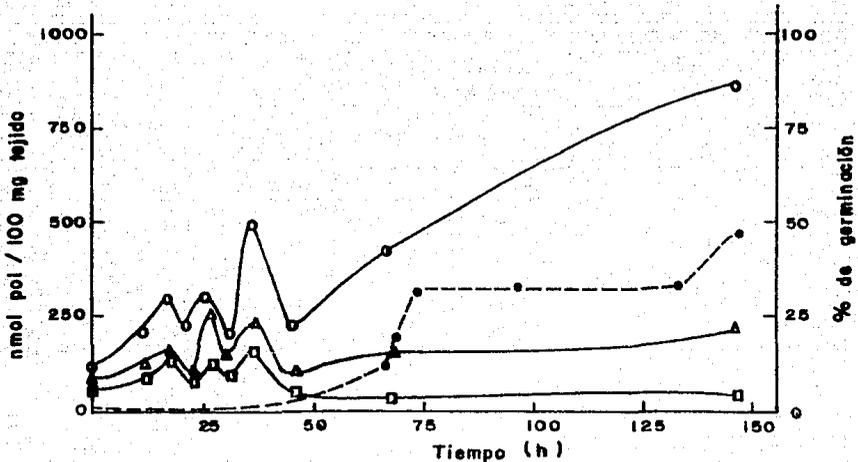


Fig.12b Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz CM - 73 .

• Germinación , ○ Putrescina , ▲ Spermidina , □ Spermina

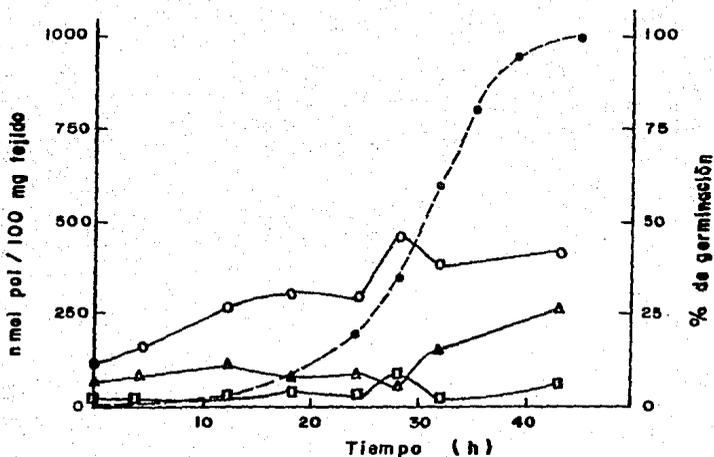


Fig. 13a. Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz CU - 84 .

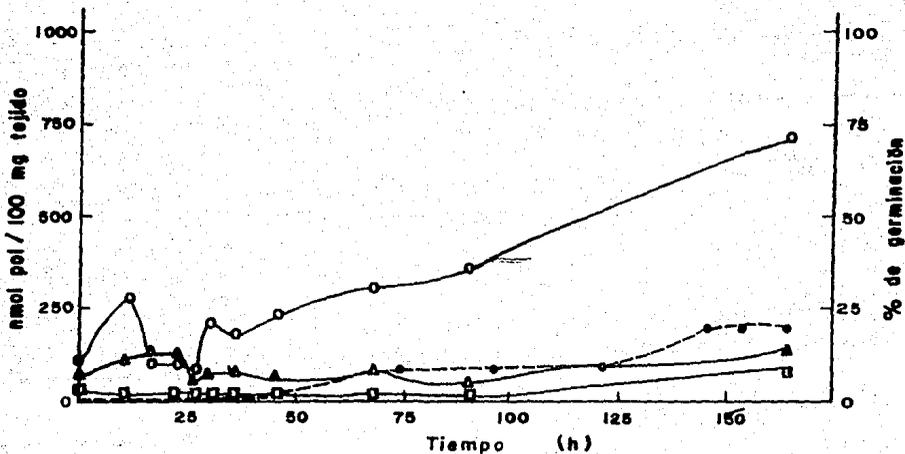


Fig. 13b Niveles de poliamidas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz CU - 70 .

• Germinación , o Putrescina , Δ Espermidina , □ Espermina

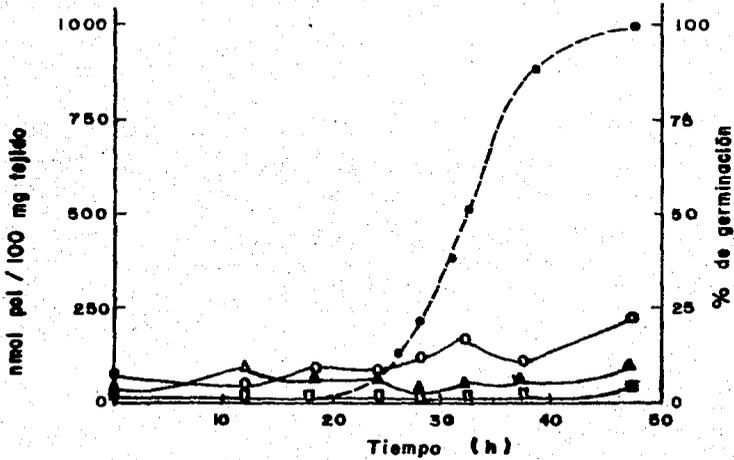


Fig.14a Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz TC-84 .

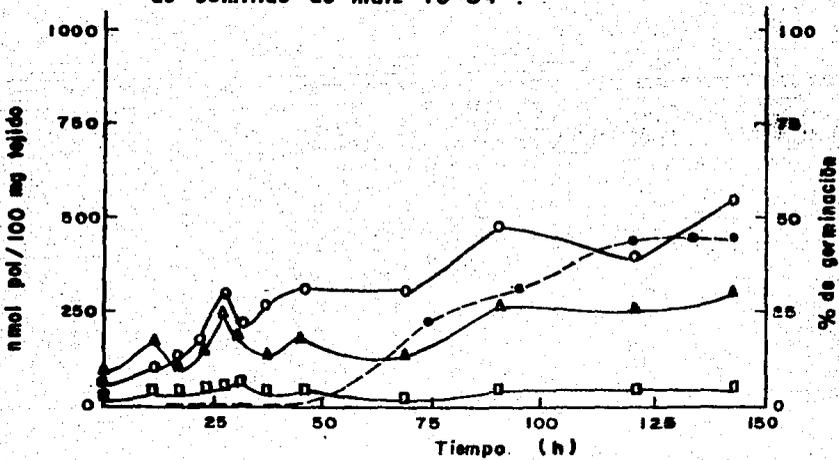


Fig.14b Niveles de poliaminas en escutelo durante la germinación de semillas de maíz TC-72 .

● Germinación , ○ Putrescina , ▲Spermidina , □ Espermina

4.6. Relación de los niveles de poliaminas con la viabilidad de las semillas de maíz.

Los resultados encontrados hasta aquí sugerían que -- los cambios en los niveles de poliaminas podrían estar relacionados con la germinación. Sin embargo, en los valores obtenidos para las semillas almacenadas se involucraba tanto a los tejidos de las semillas que lograron germinar, como a los tejidos de las semillas que fueron incapaces de hacerlo. Por tanto se diseñó un experimento que discriminara entre estos dos tipos de situaciones. Para ello, se pusieron a germinar semillas almacenadas de las tres variedades de maíz, incubándolas 144 h o 166 h según el caso. Al término de este período en que ya habían germinado todas las semillas viables, se separaron semillas germinadas y no germinadas, se disectaron manualmente y los tejidos embrionarios fueron utilizados para la determinación de poliaminas.

4.6.1. Eje embrionario

4.6.1.1. Maíz variedad "Criollo de Mezquital".

Analizando el contenido de poliaminas en eje embrionario de las semillas de la variedad de CM-73 que se incubaron durante 144 h se observó que los ejes provenientes de las semillas incubadas y que no germinaron, tuvieron igual contenido de putrescina que los ejes de las semillas si germinadas. Estos resultados indicaron que el aumento en el contenido endógeno

no de putrescina en los ejes embrionarios se produce independientemente de que las semillas sean viables o no (Fig. 15a).

En relación con el contenido de espermidina se observó que los ejes de las semillas que fueron incubadas y que no germinaron de CM-73 tuvieron igual contenido de espermidina, que los ejes de las semillas que germinaron del mismo lote y se encontró un 68.5% más de espermidina en los ejes de las semillas germinadas de CM-85 que en los ejes de las semillas -- germinadas de CM-73 (Fig. 15a).

Finalmente considerando los niveles de espermina, se encontró un 22.4% más de esta poliamina en los ejes de las semillas de CM-73 germinadas, que en los ejes de las semillas -- incubadas pero que no germinaron del mismo lote y se observó un 32% más de espermina en los ejes de las semillas germinadas de CM-85 que en los ejes de las semillas germinadas de -- CM-73. Estos resultados indican una relación del contenido de espermidina y espermina en ejes embrionarios con la viabilidad de las semillas de maíz de esta variedad (Fig. 15a).

4.6.1.2. Maíz variedad "Compuesto Universal".

Analizando el contenido de poliaminas en eje embrionario de semillas de esta variedad, se encontró que los ejes provenientes de las semillas germinadas de CU-70 tuvieron un

20% más de puntrescina que los ejes de las semillas que fueron incubadas y que no germinaron del mismo lote y que los ejes de las semillas germinadas de CU-84. Es importante destacar que los ejes embrionarios de las semillas que fueron incubadas y que no germinaron de CU-70 fueron capaces de incrementar su contenido de puntrescina a un nivel semejante que ejes de semillas germinadas de CU-84 (Fig. 15b).

Considerando el contenido de espermidina se encontró un 37% más de esta poliamina en los ejes de las semillas que germinaron de CU-70 que en los ejes de las semillas incubadas, y que no germinaron del mismo lote, además se encontró que los ejes de las semillas germinadas de CU-84 presentaron un 72.5% más de espermidina que los ejes de semillas germinadas de CU-70 (Fig. 15b).

En relación con espermina, se observó un 35.5% más de esta poliamina en los ejes de las semillas que germinaron de CU-70 que en los ejes de las semillas que no germinaron del mismo lote y también se encontró que los ejes de las semillas germinadas de CU-84, presentaron un 40% más de espermina que los ejes de las semillas germinadas de CU-70. Cabe destacar que los ejes de las semillas de CU-70 que fueron incubadas y que no germinaron mantuvieron sus niveles endógenos iniciales de espermidina y espermina (Fig. 15b).

4.6.1.3. Maíz variedad "Tuxpeño Crema".

Considerando el contenido de poliaminas en los ejes de las semillas de esta variedad incubadas por 144 h se encontró un 83% más de putrescina en los ejes de las semillas germinadas de TC-72 que en los ejes de las semillas incubadas pero que no germinaron del mismo lote, además se observó un 64% más de putrescina en los ejes de las semillas germinadas de TC-72 que en los ejes de las semillas germinadas de TC-84. En cuanto al contenido de espermidina y de espermina se encontró un 73% más de estas poliaminas en los ejes de semillas germinadas de TC-72 y de TC-84 que en los ejes de semillas incubadas pero que no germinaron de TC-72 y que conservaron sus niveles endógenos iniciales de espermidina y de espermina -- (Fig. 15c).

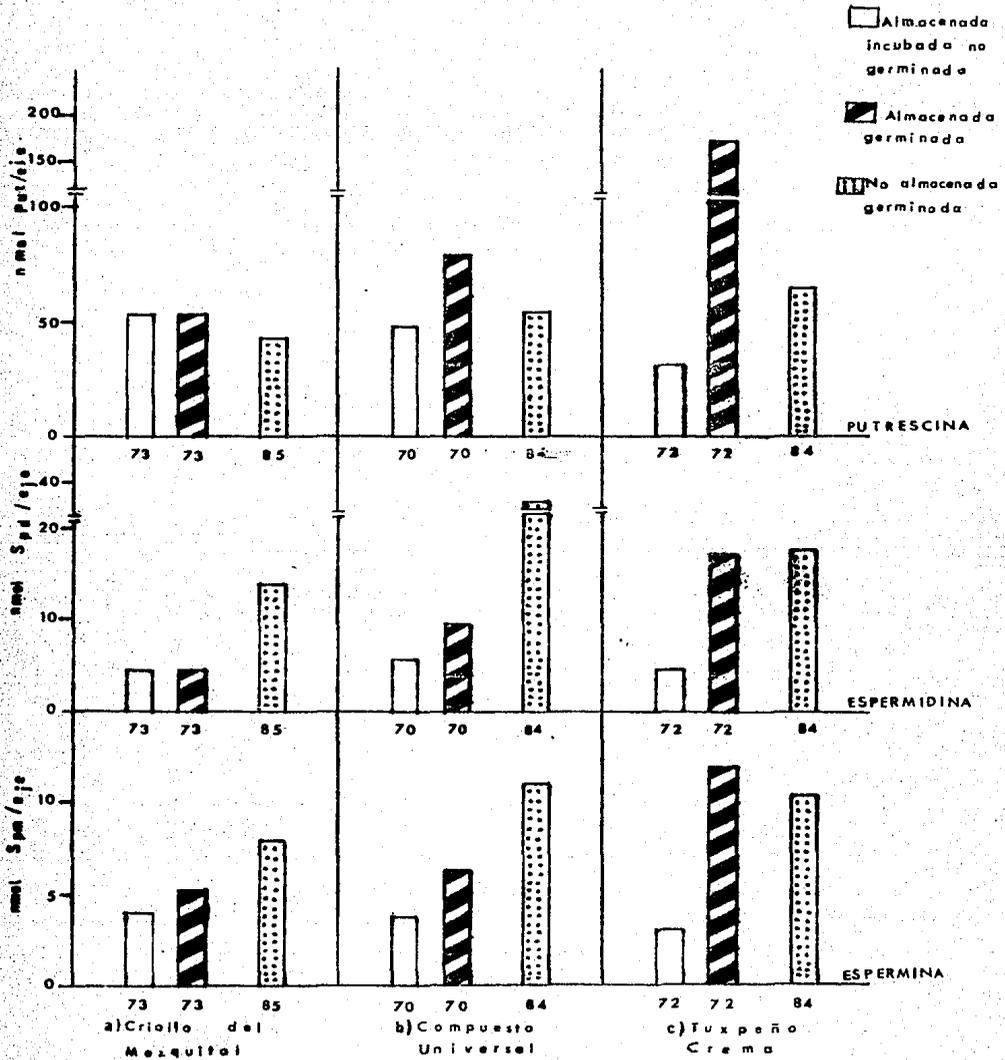


Fig.15 Comparación de los niveles de poliaminas en eje embrionario de semillas

4.6.2. Escutelo.

4.6.2.1. Maíz variedad "Criollo de Mezquital".

Analizando el contenido de poliaminas en los escute--
los de las semillas de esta variedad se encontró un contenido
semejante de putrescina en los escutelos de las semillas de -
CM-73 incubadas pero que no germinaron, en los escutelos de -
las semillas germinadas del mismo lote y en los escutelos de
las semillas germinadas de CM-85 (Fig. 16a).

Considerando los niveles de espermidina, se observó -
que los escutelos de las semillas germinadas de CM-73 tuvieron
un 79% más de espermidina que los escutelos que fueron incuba
dos y que no germinaron del mismo lote. También se encontró
que los escutelos de las semillas germinadas de CM-85 tuvie--
ron un 55% más de espermidina que los escutelos de las semi--
llas germinadas de CM-73 (Fig. 16a).

En relación con los niveles de espermina, se encontró
un 50% más de esta poliamina en los escutelos de las semillas
germinadas de CM-73 y de CM-85 que en los escutelos de las se
millas incubadas y que no germinaron de CM-73 (Fig. 16a).

4.6.2.2. Maíz variedad "Compuesto Universal".

En esta variedad se encontró que los escutelos de las

semillas de CU-70 que fueron incubados y que no germinaron -- aumentaron su contenido de putrescina en forma semejante que los escutelos de las semillas que germinaron del mismo lote, también se encontró un 52% más de putrescina en los escutelos de las semillas germinadas de CU-84 que en los escutelos de las semillas germinadas de CU-70 (Fig. 16b).

Analizando el contenido de espermidina, se observó un 50% más de esta poliamina en los escutelos de las semillas -- que germinaron de CU-70 que en los escutelos de las semillas que se incubaron y que no germinaron del mismo lote. También se encontró un 25% más de espermidina en los escutelos de las semillas germinadas de CU-70 (Fig. 16b).

Finalmente considerando el contenido de espermina se encontró un 40% más de esta poliamina en los escutelos de las semillas germinadas de CU-70 que en los escutelos de las semillas incubadas y que no germinaron del mismo lote, además se observó un 25% más de espermina en los escutelos de las semillas germinadas de CU-84 que en los escutelos de las semillas germinadas de CU-70 (Fig. 16b).

4.6.2.3. Maíz variedad Tuxpeño Crema.

En esta variedad, se observó que los escutelos de las semillas que germinaron de TC-72 tuvieron un 50% más de putres

cina que los escutelos de las semillas incubadas y que no germinaron del mismo lote y los escutelos de las semillas germinadas de TC-84 (Fig. 16c).

En relación con espermidina, los escutelos de las semillas incubadas y que no germinaron de TC-72 incrementaron su contenido de espermidina en forma semejante que los escutelos de las semillas germinadas de TC-84. Así mismo, se encontró que los escutelos de las semillas germinadas de TC-72 mostraron un 65% más de espermidina que los escutelos de las semillas germinadas de TC-84 (Fig. 16c).

Considerando los niveles de espermina, se encontró un contenido semejante de esta poliamina en los escutelos de las semillas de TC-72 incubadas y que no germinaron y en los escutelos de las semillas germinadas del mismo lote. Sin embargo los escutelos de las semillas germinadas de TC-84 tuvieron un 58% más de espermina que los escutelos de las semillas germinadas de TC-72 (Fig. 16c).

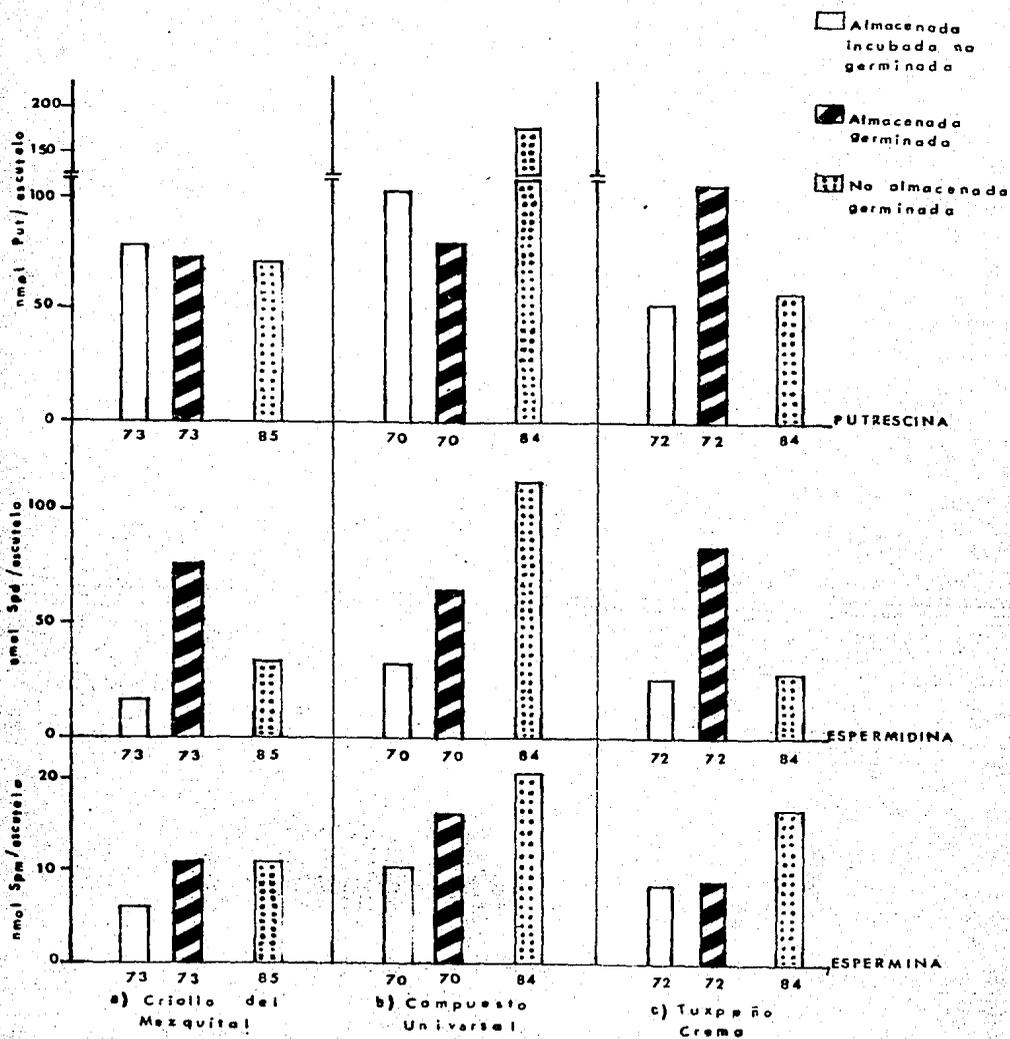


Fig.16 Comparación de los niveles de poliaminas en escutelo de semillas

5) DISCUSION

Las curvas de germinación de las semillas almacenadas (Fig. 6b) mostraron hasta un 50% y un 80% de pérdida de viabilidad y una disminución en la velocidad de germinación, principalmente por un factor de envejecimiento de las semillas dado por un almacenamiento por período prolongados (14, 15 y 17 años). Esta pérdida de viabilidad es comparable a la que se logró artificialmente en otros estudios³⁴ cuando se trataron semillas de maíz a condiciones extremas: por dos días a 60°C o bien seis días con 100% de humedad y a 40°C, aunque tratamientos menos extremos no lograron este efecto, que se observó en las semillas utilizadas en este estudio. Sin embargo, no hay información bioquímica para establecer si los daños que se causan con ambos tipos de tratamientos: almacenamiento prolongado y el artificial, son iguales. Por lo tanto, es importante destacar la necesidad de emplear en este tipo de estudios semillas que han sido almacenadas por períodos prolongados para poder comparar lo que sucede comúnmente con el almacenamiento de granos y semillas de importancia económica como es el maíz. Así mismo, cabe mencionar que aunque de cada variedad se utilizaron semillas de cosechas diferentes (almacenadas y no almacenadas) son genéticamente iguales.

En cuanto a los niveles de poliaminas, es interesante mencionar que en maíz la concentración de putrescina se incre

mento fuertemente a lo largo del proceso de germinación en ambos tejidos embrionarios de las semillas estudiadas. Un comportamiento similar se ha observado durante la germinación de otras semillas como Phaseolus mungo y Pisum sativum⁶⁵, así como en las semillas de arroz y de chícharo^{54, 59}.

A su vez espermidina y espermina también tendieron a incrementarse como sucede durante la germinación de las semillas de Glycine max, Helianthus annuus y Triticum durum².

Comparando los cambios en los niveles de poliaminas - en ambos tejidos embrionarios se observaron los mayores incrementos en el eje embrionario. Esto sugiere que este tejido es probablemente capaz de sintetizar sus propias poliaminas, lo que es razonable si se considera que el eje embrionario es un tejido meristemático que inicia activa división celular al término de la germinación, en cambio el escutelo es un tejido embrionario cuyas células ya no se dividen⁸.

Tomando en consideración la curva de germinación de las dos clases de semillas analizadas, se puede observar que los niveles de putrescina, en ambos tejidos embrionarios, se incrementan preferentemente en una etapa tardía de la germinación.

Esto sugiere que los cambios en la concentración de -

putrescina no constituyen un evento causal para que se inicie la germinación, más bien parece ser un evento relacionado en otra forma con el proceso de germinación. Probablemente esta poliamina es importante para el establecimiento de la división celular en los tejidos embrionarios, proceso que en maíz ocurre entre las 24 y las 48 horas de iniciada la imbibición ⁸.

Así mismo se ha observado que la aplicación exógena de putrescina (100 μ M) en ejes embrionarios de semillas de maíz en un pulso de dos horas, entre las 20 y las 22 horas o de las 22 y de las 24 horas de iniciada la imbibición, incrementa el índice mitótico de las células del mesocotilo, tejido embrionario que muestra activa división celular ⁸.

En relación al proceso de almacenamiento, es interesante resaltar que los niveles endógenos de poliaminas no fueron alterados por este proceso. Sin embargo, durante la germinación sí se notan importantes diferencias en los niveles de poliaminas en los tejidos de las semillas almacenadas y las no almacenadas. En relación con los niveles de putrescina, se observaron incrementos mayores en los ejes embrionarios de las semillas germinadas y de baja viabilidad (Fig. 15a-c) que en los ejes provenientes de las semillas con alta viabilidad. Niveles altos de putrescina fueron también registrados en las semillas de arroz de baja viabilidad con 0 y 25% de germinación ⁴⁵, así mismo un acúmulo de putrescina y su --

falta de conversión hacia espermidina y espermina se ha relacionado con una disminución en la viabilidad de protoplastos de avena^{26,27}. Esto sugiere que probablemente se produce una acumulación de putrescina en las semillas de baja viabilidad debido a una falta de su transformación hacia espermidina y espermina.

Esto se confirma si se analizan las fluctuaciones tan grandes en los niveles de putrescina en los ejes embrionarios y en los escutelos, en las dos clases de semillas analizadas y que hacen suponer que los cambios en los niveles de esta diamina no son un factor limitante para que ocurra el proceso de germinación.

El que este incremento de putrescina es independiente de la germinación se confirmó cuando se pusieron a germinar las semillas almacenadas de las tres variedades de maíz, se separaron semillas germinadas y no germinadas y se determinaron los niveles de poliaminas en los tejidos embrionarios (Figs. 15 y 16). En tal caso se observó que en las semillas que no germinaron se obtuvieron también incrementos de putrescina en ambos tejidos embrionarios, lo que indicó que a pesar de no ocurrir el proceso de germinación, existe síntesis de putrescina. Por el contrario, no se obtuvieron aumentos en la concentración de la espermidina y de la espermina en las semillas que se incubaron pero que no germinaron sino que se

mantuvo el contenido endógeno inicial. Todo esto sugiere que estas poliaminas parecen ser las aminor limitantes en el proceso de la germinación por lo que se sugiere que los niveles de espermidina y de espermina tienen una correlación con la capacidad de la germinación y pueden ser indicativos de la pérdida de la viabilidad de las semillas de maíz.

Vistos en su conjunto los resultados antes presentados, se podría sugerir que en las semillas de maíz, las poliaminas que están más asociadas al fenómeno de la germinación son la espermidina y la espermina y que la regulación o el punto lábil que se vería afectado por el almacenamiento serían la (s) enzima (s) que transforman putrescina hacia espermidina y de espermidina hacia espermina, lo que impediría que las semillas después de un largo período de almacenamiento fueran capaces de lograr los niveles de espermidina y de espermina requeridos para germinar.

6) CONCLUSIONES

1.- Semillas de tres variedades de maíz almacenadas por periodos prolongados (14, 15 y 17 años) pierden viabilidad en forma significativa (50% o más).

2.- Putrescina es la poliamina más abundante en los tejidos embrionarios de maíz y a su vez la que muestra mayores incrementos en el proceso de germinación, tanto en semillas almacenadas como no almacenadas.

3.- Espermidina y espermina parecen ser las poliaminas limitantes en el proceso de la germinación y probablemente son indicativas de la pérdida de la viabilidad de semillas de maíz.

4.- El almacenamiento por periodos prolongados no daña el contenido endógeno de poliaminas en semillas de maíz.

5.- Probablemente el almacenamiento daña las enzimas relacionadas con la conversión de putrescina hacia espermidina y de espermidina hacia espermina.

6.- Para poder eliminar o modificar la hipótesis propuesta habrá que analizar más cuidadosamente el efecto de espermidina y espermina en la germinación de semillas de maíz.

7) BIBLIOGRAFIA

- 1) Altman, A., Kaur-Sawney, R. & Galston, A.W. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine mediated inhibition of senescence. Plant Physiol. 60:570 - 574.
- 2) Anguillesi, M.C., Grilli, I. & Floris, C. 1980. Rate of synthesis of spermine and spermidine in germinating seeds of Glycine Hilianthus and Triticum. Planta. 148:24 - 27
- 3) Anguillesi, M.C., Grilli, I. & Floris, C. 1982. Polyamines and protein metabolism in maize inbreds. Differing in seed protein content. J. Exp. Bot. 33 (136): 1014 - 1020.
- 4) Apelbaum, A., Icekson, I., Burgoon, A. & Lieberman, M. - 1982. Inhibition by polyamines of macromolecular synthesis and its implication for ethylene production and senescence processes. Plant. Physiol. 70:1221-1223.
- 5) Bagni, N., Calderera, C.M. & Moruzzi, G. 1967. Spermine and spermidine distribution during wheat growth. Experientia. 2:139-140.
- 6) Bagni, N., Serafini-Fracassini, D. & Torrigiani, P. 1982 - Polyamines and cellular growth processes in higher plants. Academic press Inc. London LTD ISBN: 0-12-735380-1. In: Plant Growth Substances PF Wareing (ed). p.p: 473-482.

- 7) Bagni, N. & Pistocchi, R. 1985. Putrescine uptake in Sain-tpaulia petals. Plant Physiol. 77:398-402.
- 8) Bafza, A., Aguilar, R. & Sánchez de Jiménez, E. 1986. Histones and the first cell cycle in maize germination. -- Physiol. Plantarum 68:259-264.
- 9) Baker, H.G. 1968. Las plantas y la civilización. Herrero hermanos sucesores, S.A. México. p.p: 77-93.
- 10) Basso, L.C. & Simth, T.A. 1974. Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. Phytochemistry. 13:875-883.
- 11) Bewley, J.D. & Black, M. 1978. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. Vol.1. (Development, germination and growth). Springer - Verlag. ISBN: -- 3-540-08274-3. p.p: 1-3 y 7-37.
- 12) Bewley, J.D. & Black, M. 1978. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. Vol. 2 (Viability, dormancy and environmental control), Springer - Verlag ISBN: 3-540-11656-7. p.p.: 1-7.
- 13) Bidwell, R.G.S. 1979. Fisiología Vegetal, AGT editor. - S.A. México. ISBN: 968-463-015-8. p.p.: 75-78 y 454-458.

- 14) Birecka, H., Bitonti, A.J. & McCann, P. 1985. Assaying -- and arginine decarboxylases in some plants species. Plant Physiol. 79:509-514.
- 15) Birecka, H., Bitonti, J. & McCann, P. 1985. Activities - of arginine and ornithine decarboxylases in varies plant species. Plant, Physiol. 79:515-519.
- 16) Bradley, P.M., El-Fiki, F. & Giles, K.L. 1984. Polyami-- nes and arginine affect somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Sci, Lett. 34:397-401.
- 17) Cohen, A.S. Popovic, R.B. & Zalik, S. 1979. Effects of po- lyamines on chlorophyll and protein content, photochemi- cal activity and chloroplast ultrastructure of barley -- leaf discs during senescence. Plant Physiol. 64:7171-720.
- 18) Cohen, E., Arad, S., Heimer, Y.M. & Mizrahi, Y. 1982. Par- ticipation of ornithine decarboxilase in early stages of tomato fruits development. Plant Physiol. 70:540-543.
- 19) Cohen, E., Heimer, Y.N. & Mizrahi, Y. 1982. Ornithine decar- boxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. Plant Physiol. 70:544-546.
- 20) Cortés Benavides F. 1980. Histología Vegetal Básica. H.

Blume. ediciones. Madrid, España. ISBN: 84-7214-202-7.p.p: --
115-119.

- 21) Cheng, S.H. & Kao, Ch. H. 1983. Localized effect of polyamines on chlorophyll loss. Plant Cell Physiol, 24(8):1462-1467.
- 22) Chu, S.Ch. 1983. Effects of cytokinin and several inorganic cations on the polyamine content of lettuce cotyledons. Plant.Cell,Physiol. 24(1):27-32.
- 23) Dumortier, F.M., Flores, H.E., Shekhawat, N.S. & Galston, A.W. 1983 Gradients of polyamines and their biosynthesis enzymes in coleoptiles and roots of corn. Plant Physiol. 72:915-918.
- 24) Esau K. 1972. Anatomía Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España.p.p: 641-663.
- 25) Feirer, R.P., Mignon, G, & Litvay, J.D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embriogenesis in the wild carrot. Science. 223:14433-1435.
- 26) Fernández, T.A., Kaur-Sawhney, R. & Galston, A.W. 1986. Polyamines metabolism and osmotic stress. Plant. Physiol. - 82:375-378.

- 27) Fernández, T.A., Maudeu, A.A., Dumortier, F.M. & Galston, A.W. 1986. Polyamines metabolism and osmotic stress. Plant Physiol. 82:369-374.
- 28) Flores, H.E. & Galston, A.W. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by performance liquid chromatography. Plant. Physiol. 69:701-706.
- 29) Flores, H.E. & Galston, A.W. 1984. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. Plant. Physiol. 75:102-109.
- 30) Flores, H.E., Yung, D. & Galston, A.W. 1985. Polyamine metabolism and plant stress. In: Cellular and Molecular Biology of plant stress. Alan R. Liss, Inc. p.p.: 93-114.
- 31) Friedman, R., Altman, A. & Bachrach, U. 1982. Polyamine and root formation in mug bean hypocotyl cuttings. Plant. Physiol. 78:844-848.
- 32) Fuhrer, S., Kaur-Sawhner, R., Meishin, L. & Galston, A.W. 1982. Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. Plant. Physiol. 70: 1597-1600.
- 33) García Rendón Margarita. 1985 Relación entre viabilidad -

- de germinación y síntesis de DNA en embriones de maíz. -
Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M.
- 34) Hartman, H. & Kester, D. 1980. Propagación de plantas. -
CECSA. México, ISBN: 968-26-0156-8.p.p: 145-152.
- 35) Heimer, Y.M. & Mizrahi, Y. 1982. Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovarios. Biochem. J. 201:373-376.
- 36) Kaur-Sawhney, R., Flores, H.E. & Galston, A.W. 1980. Polyamine induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. Plant. Physiol. 65:368-371.
- 37) Kaur-Sawhney, R., Shin, L., Flores, H.E. & Galston, A.W. -
1982. Relation of polyamine biosynthesis to initiation of sprouting in potato tubers. Plant. Physiol. 69:411-415
- 38) Kaur-Sawhney, R., Shin, L., Flores, H.E., & Galston, A.W. --
1982. Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. Plant. Physiol. 69:405-410.
- 39) Kyriakidis, D.A. 1983. Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination barley seeds. Physiol. Plant. 57:499-504.

- 40) Lin, P.C., Egli, D.B., Li, G.M. & Meckel, L. 1984. Polyamine titer in the embryonic axis and cotyledons of Glycine max (L) during seed growth and maturation. Plant. Physiol 76:366-371.
- 41) Lin, P.C. 1984. Polyamine anabolism in germinating Glycine max (L) seeds Plant. Physiol 76:372-380.
- 42) Mayer, A.M. & Meyker, A. 1975. The germination of seeds, -- Pergmon Press. p.p:21-26
- 43) Mendez, J.D. & Hicks, J.J. 1983. Metabolismo y función de las poliaminas en las células vegetales. Rev. Soc. Quím. Méx. 27(4) 169-174.
- 44) Meyer, B., Anderson, D.B. & Bohning, R.H. 1973. Introduction to plant physiology. D.Van. Nostrand. Company. E.U.A. ISBN: 0-442-25328-1 p.p: 530-543 y 473-473.
- 45) Mukhopadhyay, A., Choudhuri, M.M. & Sen, K, Ghosh, B. 1983. Changes in polyamines and related enzymes with loss of viability in rice seeds. Phytochemistry. 12(7):1547-1551.
- 46) Montague, M.J., Koppenbrink, J.W. & Jaworski, E.G. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of Daucus carota. Plant Physiol. 62:430-433.

- 47) Montague, M.J., Armstrong, T. & Jaworski, E.G. 1979. Polyamine metabolism in embryonic cells of Daucus carota. -- Plant. Physiol 63:341-345.
- 48) Naik, B.I & Srivastava, S.K. 1978. Effect of polyamines on tissue permeability. Phytochemistry. 12:1885-1887.
- 49) Popovic, R.B., Kyle, D.J., Cohen, A.S, & Zalik, S. 1979. - Stabilization of thylakoid membranes by spermine during - stress induce senescence of barley leaf discs. Plant. -- Physiol. 64:721-726.
- 50) Ramakrishna, S. & Radhakantha, A. 1975. Amine levels in Lathyrus sativus seedling during development. Phytochemistry 14:63-68.
- 51) Rangarajan, M.S., Ramakrishna, S. & Radhakantha, A. 1978. Regulation of arginine decarboxylase and putrescine levels in Cucumis sativus cotyledons. Phytochemistry. 17:57-63.
- 52) Salisbury F.B. et al. 1978. Plant Physiology. Wads work publishing company. Inc. Belmont, California, U.S.A ISBN - p.p: 228, 253-254.
- 53) Schwartz, M., Altman, A., Cohen, y. & Arzee, T. 1986. Localization of ornithine decarboxylase and changes in polyamine content in root meristems of Zea mays. Physiol. Plant

67:485-492.

- 54) Sen, D., Choudhuri, M.M. & Ghosh, B. 1981. Changes in polyamine contents during development and germination of rice seeds. Phytochemistry. 20 (4): 631-633.
- 55) Serafini-Fracassini, D., Bagni, N., Cionini, P.G. & Bennici, A. 1980. Polyamines and nucleic acids during the first -- cell cycle of Helianthus tuberosus tissue after the dormancy break. Planta.
- 56) Slocum, R., Kaur-Sawhney, R. & Galston, A.W. 1984. The -- physiology and biochemistry of polyamines in plants. Archives of biochemistry and biophysics. 253 (2): 283-303.
- 57) Smith, T.A. 1970. Putrescine, spermidine and spermine in higher plants. Phytochemistry 9:1479-1486.
- 58) Smith, T.A. 1973. Amine levels in mineral - deficient Hordeum vulgare leaves. Phytochemistry. 12:2093-2100.
- 59) Smith, T.A. & Wilshire, G. 1975. Distribution of cadaverine and other amines in higher plants. Phytochemistry. 14:2341-2346.
- 60) Smith, T.A. 1985. Polyamines. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:117-143.

- 61) Srivastava, S.K. & Smith, T.A. 1982. The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. Phytochemistry. 121 (5) :997-1008.
- 62) Srivastava, S.K., Vashi, D.J. & Naik, B.I. 1983. Control of senescence by polyamine and guanidines in young and mature barley leaves. Phytochemistry. 22 (10): 1251-1254.
- 63) Tabor, W.C. & Tabor, H. 1984. Polyamines. Ann, Rev. Biochem - 53: 749-790.
- 64) Torrigiani, P., Serafini-Fracassini, D., Biondi, S. & Bagni, N. 1986. Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. J. Plant. Physiol. 124:23-29.
- 65) Villanueva, V.R. Adlakha, R.C. & Cantero-Soler, A.M. 1978. Changes in polyamine concentration during seed germination. Phytochemistry. 17:1245-1249.
- 66) Weinstein, L.H., Kaur-Sawhney, R., Rajam, M.V. & Galston, A.W. 1986. Cadmium-induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. Plant: Physiol. 82: 641-645.