

30
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VARIACION EN EL CONTENIDO DE CITOCINI-
NAS DURANTE LA GERMINACION DE MAIZ
NUEVO Y CON ALMACENAMIENTO
PROLONGADO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A
AGUSTIN PALMA DE LA CRUZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D.F.

1989



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.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	ANTECEDENTES	
2.1	FITOHORMONAS	
2.1.1	Auxinas.....	3
2.1.2	Giberelinas.....	4
2.1.3	Abscisinas.....	5
2.1.4	Etileno.....	6
2.1.5	Citocininas.....	6
2.2	ALMACENAMIENTO Y DETERIORO DE SEMILLAS	
2.2.1	Longevidad de semillas.....	15
2.2.2	Viabilidad y causas en el deterioro de semillas....	16
2.2.3	Bases bioquímicas para el deterioro de semillas....	17
2.3	HORMONAS EN EL DESARROLLO DE SEMILLAS.....	22
2.4	GERMINACION	
2.4.1	Hormonas en la germinación.....	26
2.4.2	Modelo hormonas de Khan para explicar la dormancia y germinación.....	29
2.4.3	Variación de citocininas durante la germinación de Zea mays.....	31
2.5	ANALISIS DE CITOCININAS	
2.5.1	Extracción.....	35
2.5.2	Purificación.....	37
2.5.3	Identificación y cuantificación.....	38
2.6	TRABAJOS QUE ANTECEDEN A ESTE PROYECTO.....	44
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	47
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
5.	RESUMEN Y CONCLUSION.....	64
6.	BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Se ha observado que semillas de maíz al ser almacenadas por cinco o seis años pierden su capacidad de germinación hasta un 60%. Las causas pueden ser:

- a) Influencia de fitohormonas que regulan la germinación, principalmente Giberelinas, Citocininas e Inhibidores del crecimiento vegetal.
- b) Degradación de organelos y macromoléculas en las células del embrión por almacenamiento prolongado de las semillas.

Este trabajo tiene el objetivo de establecer si existe una relación entre el contenido de citocininas y la capacidad germinativa de semillas de maíz con almacenamiento prolongado en comparación con las semillas de cosecha reciente.

Las citocininas son un grupo de fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal que tienen en su estructura una base de adenina y un radical unido en la posición N⁶ de la adenina. Una de sus funciones, tal vez la más importante, es la de promover la división celular (citocinesis) en plantas.

En este trabajo se estudiarán los niveles de citocininas en semillas de maíz a las 0, 4, 12 y 24 hr. de imbibición con tres genotipos de maíz: Criollo del Mezquital, Tuxpeño Crema y Compuesto Universal, tanto de semillas con almacenamiento prolongado (15-18 años) como de semillas de cosecha reciente. Se sabe que las semillas con almacenamiento prolongado de los genotipos indicados reducen su viabilidad entre 25 y 50% a los 15-18 años de almacenamiento.

Para enmarcar el objetivo de este trabajo, en los antecedentes se hace una revisión sobre:

- a) El papel y cambios que presentan las fitohormonas, y en particular las citocininas, tanto en la maduración como en la germinación de semillas.
- b) Almacenamiento y deterioro de las semillas.
- c) Análisis de citocininas.

2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 FITOHORMONAS.

El crecimiento de una planta es un proceso muy complejo y ordenado. Estos procesos de crecimiento están controlados principalmente por hormonas vegetales o fitohormonas. Estas son producidas en cantidades muy pequeñas por las plantas.

Las fitohormonas se dividen en dos grandes grupos: uno formado por promotores del crecimiento, entre las que se encuentran las giberelinas, auxinas, etileno y citocininas; y el otro que incluye a los inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico.

2.1.1 AUXINAS.

Las investigaciones sobre las auxinas (del griego auxo, crezco)¹ tienen su origen en los experimentos de Charles Darwin (1880) quien observó que la respuesta fototrópica en coleóptilos de plantas no ocurre si se le quita la punta al coleóptilo. Los experimentos de Went en 1928 demostraron que alguna o algunas sustancias presentes en el coleóptilo eran la causa de la elongación de éste y de la respuesta fototrópica.² A este tipo de actividad se le denominó auxínica. Posteriormente se descubrió que las sustancias responsables de ésta actividad eran derivados del ácido -3-indolacético (AIA), y se les dió el nombre genérico de auxinas.

De todas las auxinas, el AIA es el más importante en plantas y parece ser que es un constituyente universal de los vegetales.³ El AIA se aisló por primera vez de una fuente natural a partir de maíz tierno.⁴

Las auxinas son las responsables de la elongación y expansión celular promoviendo de esta manera el crecimiento en plantas.⁵ Están relacionadas con la dominancia apical, regulación de la floración, geotropismo y algunos compuestos sintéticos presentan actividad de herbicidas selectivos.⁶

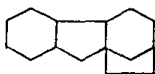


Acido -3- indolacético

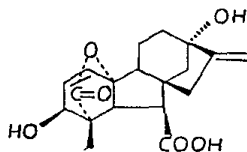
2.1.2 GIBERELINAS.

Fueron aisladas por primera vez a partir del hongo *Gibberella Fujikuroi*, también conocido como *fusarium moniliforme*, que infecta las plantas de arroz produciendo un alargamiento excesivo y posteriormente su muerte. Esta anomalía en la planta se debe a un líquido secretado por éste hongo en el que se identificó una sustancia a la que le dieron el nombre de ácido giberélico (AG_3).

Las giberelinas son ácidos diterpénicos que tienen el esqueleto de gibano.



Esqueleto de Gibano



Acido Giberélico (AG_3)

Las giberelinas se designan con las letras AG seguidas de un número. Al finalizar 1982 se conocían 64 giberelinas.⁷

Estos compuestos promueven el alargamiento de los tallos. Cuando se aplican a plantas genéticamente enanas se desarrollan de una

manera similar a como lo hacen las variedades altas.⁸

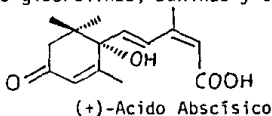
Las giberelinas tienen un papel muy importante en la germinación y crecimiento de las plantas.⁹

2.1.3 ABSKCISINAS.

El ácido abscisico (AA) fue descubierto en tres partes del mundo trabajando independientemente.¹⁰

- a) En la Universidad de California, Carns y Addicott, investigando una sustancia que acelera la abscisión de hojas. La estructura fue determinada por Ohkuma, et al (1965) dándole el nombre de "Abscisina II".
- b) El grupo de Wareing en Australia, investigando la dormancia en árboles, obtuvo un extracto altamente activo para obstruir la formación de retoños en semillas, es decir, funciona como inhibidor. A esta sustancia fue llamada "Dormina" y posteriormente identificada como "Abscisina II" por Cornforth (1965).
- c) Rothwell y Wain (1964) en la Universidad de Londres aislaron esta sustancia de *Lupinus luteus* y se demostró que es la responsable de la caída de flores. Addicott, et al (1968) cambiaron el nombre de "Abscisina II" por Acido Abscisico (ABA).

El ABA puede originar dormancia en el embrión, inhibe muchas respuestas de las giberelinas, auxinas y citocininas.¹¹

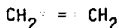


2.1.4 ETILENO

El etileno es una curiosa sustancia para ser considerada como una hormona, ya que es muy simple y a temperatura ambiente es un gas. El tratamiento con bajas concentraciones de etileno en plantas, origina profundos efectos metabólicos.

Se conoce desde hace muchos años que en el desarrollo de frutas está involucrado el etileno, y que la máxima producción de etileno en la maduración de frutas coincide con el tiempo de respiración climacérica (incremento en la respiración durante el período de maduración de muchas frutas).

El etileno estimula la germinación de algunas semillas, regula el mecanismo de la formación de auxinas, etc...



ETILENO

2.1.5 CITOCININAS.

La idea de que la división celular en vegetales superiores puede controlarse por sustancias, fue propuesto en 1892 por Wiesner. La hipótesis anterior fue probada por Haberlandt (1913) en parenquima de patata.¹¹

Investigaciones posteriores como los trabajos de Skoog en tejidos de tabaco pusieron de manifiesto la presencia de una sustancia que regula la división celular y demostraron que ésta no se lleva a cabo en ausencia de dicha sustancia.¹²

El agua de coco, extracto de malta, extracto de levadura y DNA

en auto clave provocan la división celular. El primer compuesto activo aislado y caracterizado a partir de una fuente natural fue la kinetina extraída por Miller de DNA del esperma de arenque en un autoclave.¹³ La kinetina se originó de la degradación del DNA al permanecer mucho tiempo en el autoclave.

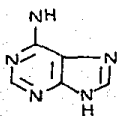
El término citocinina fue sugerido por Skoog (1965) y es ahora generalmente aceptado para describir compuestos que promueven la división celular (CITOCINESIS) en plantas.¹⁰

En 1963, Letham aisló la primer citocinina de fuentes vegetales, a la cual le dió el nombre de Zeatina, obtenida de maíz tierno.¹⁴

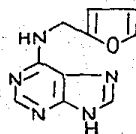
En 1973, Letham descubrió la presencia de ribósidos de zeatina, ribótidos de zeatina y pequeñas cantidades de otras citocininas en maíz.¹⁵ Summons y colaboradores en 1980 aislaron también de maíz, glucopiranosidos y ribofuranósidos de citocininas.¹⁶

La zeatina y ribósidos de zeatina se han aislado de un gran número de plantas, hongos, bacterias, etc. La segunda citocinina aislada de fuentes naturales fue $N^6-(\Delta^2 - \text{isopentenil})$ adenina, la más ampliamente distribuida en la naturaleza debido a que ha sido encontrada en el RNA de mamíferos, hongos y plantas.¹⁰

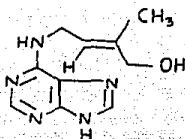
Las citocininas tienen en su estructura una base de adenina y un radical unido en la posición N^6 .



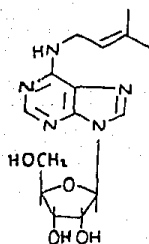
Adenina
(6- Amino purina)



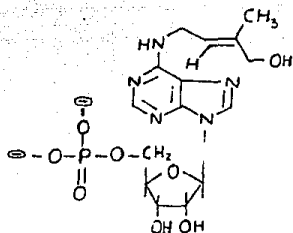
Cinetina



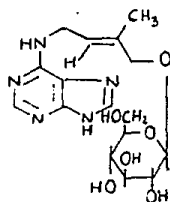
(E)- Zeatina
(Zeatina) o "Z"



Isopenteniladenosina
(IPA)



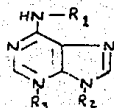
Ribótido de Zeatina
o [9R-5'P]Z



0-β-D- Glucopiranosil
zeatina 6 [06]Z

En la tabla 2.1 se muestran las citocininas aisladas de
maíz tierno (*Zea mays*) hasta 1983. ^{16,17}

Tabla 2.1 Citocininas aisladas de
Zea mays hasta 1983. 16,17



R ₁	R ₂	R ₃	SIMBOLO
	H	H	Z
	Ribosil	H	[9R]Z
	Ribosil-5-P	H	[9R-5'P]Z
	H	OH	[2-OH]Z
	Ribosil	H	
	Ribosil	H	
	H	H	
	H	H	
	Glucosil	H	[9G](diH)Z
	H	H	[0G]Z
	Ribosil	H	[9R](0G)Z
	Ribosil	H	(diHOG)[9R]Z
	H	H	(diHOG)Z
	Ribosil	H	(diH)[9R]Z
	Glucosil	H	[9G]Z

METABOLISMO DE CITACININAS

ANABOLISMO

Las citocininas libres presentes en tejidos vegetales pueden formarse a través de una o ambas de las siguientes rutas:

- a) A través de una sustitución en la cadena lateral por adenina, ribósido y ribótido de adenina. La cadena lateral de casi todas las citocininas naturales contienen cinco átomos de carbono y ésto hace sugerir que se derivan del camino biosintético del isopreno.
- b) Por hidrólisis de ciertas especies de RNAt que contienen en su estructura moléculas de citocininas.¹

El RNAt es una fuente potencial de citocininas, ya que éstas se pueden formar a través de la hidrólisis a niveles mononucleotídicos de dicho RNAt. Tales hidrólisis y liberación de citocininas pueden ser significantes en células secas, autolisables de diferentes tejidos vasculares como sugiere Sheldrake.¹⁸ Pero es improbable que cantidades significativas de citocininas son liberadas de RNAt de células vegetales vivientes. Por otra parte, varias evidencias sugieren que las citocininas libres en plantas son biosintetizadas por un camino que no involucra degradación de RNAt.¹⁹

-La actividad de citocininas libres en la punta de la raíz del chícharo es 27 veces mayor que la actividad de las citocininas obtenida por hidrólisis del RNAt.^{20,21}

-El crecimiento de las semillas del chícharo depende de la síntesis de citocininas. Estudios con inhibidores indican que su síntesis sigue una ruta similar a AMP y adenina para dar posteriormente citocininas.²²

-Cuando se aplicó adenina marcada a callos de células se produjo isopenteniladenina marcada y, por otra parte se aislaron citocininas no marcadas a partir de RNAt.²³

-Todas las especies de RNAt que contienen citocininas reconocen codones que inician con uridina. Estas especies de RNA son específicas para serina, fenilalanina, cisteína, triptofano, leucina y tirosina. La evidencia experimental demuestra que la presencia de citocininas en la molécula de RNAt participa en el mantenimiento de la estructura terciaria adecuada, que le permite desempeñar su función de donador de aminoácidos en la síntesis de proteínas. Sin embargo, existen células que poseen citocininas en los RNAt, y a pesar de la función ya descrita requieren citocininas libres para su crecimiento.²⁴

Otros reportes también indican que el RNAt no es la principal fuente de citocininas.²⁶ La posibilidad más factible para su formación es que ocurra transferencia de un grupo isopentenilo de IPP (isopentenilpirofosfato) a la posición seis de la adenina, o a sus correspondientes ribósidos y ribótidos. Los experimentos conducidos para explorar esto, desafortunadamente no producen hasta el momento información concluyente.¹ Cuando se alimentan tejidos con ácido mevalónico C^{14} (el cual puede ser metabolizado a $(C^{14}$ -IPP) no se detecta la aparición de cantidades significantes de citocininas libres marcadas, lo cual sería de esperarse si el C^{14} -IPP fuera utilizado en la formación de la cadena lateral al transferirse a la adenina. Por otro lado hay buenas evidencias de que la adenina marcada es convertida por tejidos vegetales a citocininas libres marcadas²³ como ya se indicó anteriormente. Así, tejidos cultivados de *Vinca rosea* forma C^{14} -ribótido de Zeatina de C^{14} -adenina y posteriormente aparecen C^{14} -ribósido de Zeatina, C^{14} -zeatina y glucosidos de C^{14} -zeatina. De ésta forma los experimentos de *V. rosea* indican que la biosíntesis de citocininas ocurre primero a nivel nucleotídico.¹

Las reacciones enzimáticas necesarias para dar citocininas independientes de la degradación del RNAt no están muy claras. No existen evidencias reportadas para la transferencia de un grupo isopentenilo de isopentenilpirofosfato a la adenina o adenosina, que puede ser un paso básico en la biosíntesis de citocininas, y sería una reacción análoga para formar isopenteniladenina en el RNAt.¹⁹

CATABOLISMO

Las investigaciones realizadas por Summons y colaboradores en semillas de maíz demuestran que los productos de degradación de citocininas al haber un exceso de éstas, originan principalmente ribótidos de adenina y adenina, ya que éstos pueden ser mejor utilizados en otros metabolismos. Sólo pequeñas cantidades de citocininas degradadas son transformadas a O-glucósidos, dihidrozeatina y adenosina.¹⁶

Estos resultados hacen suponer que el rompimiento de la cadena lateral de las citocininas es la principal vía metabólica para transformar el exceso de citocininas exógenas aplicadas en células vegetales. Estos productos de degradación y las pequeñas cantidades de citocininas reducidas y glucosiladas en la cadena lateral, son formas que reducen la actividad citocinética.¹⁶

El significado funcional de los metabolitos de citocininas pueden ser los siguientes.²⁷

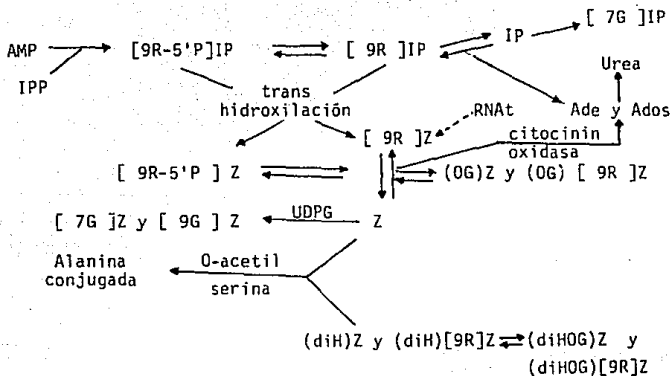
- a) Formas activas de citocininas.
- b) Formas de almacenamiento. Las citocininas enlazadas son liberadas cuando se requieren en la división celular. Hay evidencias de que citocininas O-glucosil conjugadas pueden ser formas de almacenamiento.¹⁶

- c) Productos de detoxificación formados cuando los niveles de citocininas exógenas son tan altas que pueden ser perjudiciales.
- d) Productos de inactivación. O-glucósidos se han encontrado en semillas y hojas maduras ó senescentes. También se han encontrado citocininas conjugadas con glucosa en las posiciones 3,7 ó 9 del anillo purínico. Los glucósidos que se encuentran en las posiciones 7 y 9 son mucho menos activos que las citocininas libres no conjugadas.

Los nucléotidos de citocininas tienen un significado especial en el metabolismo de citocininas ya que aparecen como productos iniciales de la biosíntesis de citocininas y, en muchos tejidos es el primer metabolito formado en cantidad apreciable a partir de bases de citocininas exógenas.

Todo parece sugerir que las citocininas libres tienen un papel biológico o un mecanismo de acción diferente al de las citocininas unidas al RNAt.

En la fig. 2.1 se muestra una representación simplificada del posible metabolismo de citocininas naturales propuesto por Letham (1983).²⁸



AMP = Adenosinmonofosfato
 IPP = Isopentenilpirofosfato
 IP = Isopenteniladenina
 R = Ribosil
 P = Fosfato
 Z = Zeatina
 G = Glucosil
 OG = O-glucosil
 diHOG = dihidro-O-glucosil

Fig. 2.1 Metabolismo de citocininas Letham (1983).²⁸

2.2 ALMACENAMIENTO Y DETERIORO DE SEMILLAS

2.2.1 LONGEVIDAD DE SEMILLAS

Existen considerables controversias el hecho de que muchas semillas mantienen su viabilidad por muchos años. Quizas la historia más conocida sea la supuesta germinación de trigo encontrado en cavaciones arqueológicas en las construcciones del viejo Egipto y en la tumba de Tutan Khamen, dado a conocer públicamente a finales del siglo XIX e inicios del XX⁷; pero todos esos comentarios son muy engañosos. Datos de carbono-14 indican una edad de 4000 años, pero a partir de las pruebas de su viabilidad realizadas por el profesor John Percival de la Universidad de Reading y Sir Wallis Budge del Museo Británico, quedó claro que todo el material se encontraba ya muerto. Otras pruebas sobre estas semillas indican una destrucción de la organización celular y una completa ausencia de ácidos nucleicos con pesos moleculares altos.²⁹

Las semillas vivientes más antiguas son probablemente las de *Canna compacta* descubiertas como partes de un collar sonante en tumbas Pre-Inca de Sta. Rosa de Tastil en Argentina, el material indica una edad de 620± 60 años con carbono-14. Cuando fue germinada en 1968, su crecimiento fue lento y difícil, la raíz muestra problemas geotrópicos anormales, síntomas típicos de germinación para semillas viejas. Esta famosa planta y sus descendientes ahora sobreviven en el departamento de Botánica en la Universidad de la Plata, Argentina.²⁹

Como estos datos auténticos para longevidad de semillas existen muchos otros que se muestran en la tabla 2.2

Tabla 2.2 Viabilidad record de algunas semillas en el Museo de Historia Natural, Paris.⁷

Especie	Fecha de recolección	% de germinación en:		Longevidad (años)
		1906	1934	
Mimosa glomerata	1853	50	50	81
Melilotus lutea	1851	30	0	55
Cytisus austriacus	1843	10	0	63
Dioclea pauciflora	1841	10	20	93
Trifolium arvense	1838	20	0	68
Stachys nepetifolia	1829	10	0	77
Cassia bicapsularis	1819	30	40	115
Cassia multijuga	1776	--	100	158

2.2.2 VIABILIDAD Y CAUSAS EN EL DETERIORO DE SEMILLAS

La mayoría de las especies de semillas retienen su viabilidad cuando se secan; el secado es la fase normal final en la maduración de la mayoría de las semillas y es común almacenarlas con un bajo contenido de humedad. Las semillas que requieren ser almacenadas con un bajo contenido de humedad, para tener un máximo de viabilidad se llaman "ortodoxas", sin embargo, existen especies de semillas que retienen un contenido relativamente alto de humedad durante su almacenamiento para tener un máximo de viabilidad, a éstas se les llama "recalcitrantes".⁷

Cuando el contenido de humedad en semillas ortodoxas es alta (30%), aún pueden germinar, y entre 18-30% se deterioran rápidamente por microorganismos presentes; abajo de 8-9% de humedad hay poca o nula actividad de insectos, y menor de 4-5%, las semillas son inmunes al ataque de insectos y hongos almacenados; la microflora y

plagas pueden perjudicar considerablemente a las semillas. Por lo que se refiere a la temperatura, un almacenamiento entre 0-5°C es generalmente aceptado ya que disminuye la actividad degradativa de enzimas. Un almacenamiento de semillas secas a temperaturas por debajo de 0°C en atmósfera seca, pueden mejorar longevidad.⁷ En bancos genéticos se sumergen en Nitrógeno líquido las semillas sobreviviendo por tiempo indefinido.³⁰

La disminución de viabilidad en las semillas también puede originarse por cosechas prematuras, condiciones de maduración y recolección deficientes; los daños mecánicos pueden crear centros de infección originando un deterioro acelerado. Altas temperaturas durante el secado, o el secado excesivo, pueden reducir dramáticamente la viabilidad.

Si las semillas se mantienen en almacén abierto, a bajo contenido de humedad, entonces los gases ambientales pueden intercambiarse debido a la actividad respiratoria de las semillas y microflora asociada, reteniendo más su viabilidad. Por ejemplo, en semillas de chícharo puestas once semanas (cuando el almacén contenía 18.4% de humedad a 25°C) en una atmósfera cerrada, decrece el Oxígeno de 21% a 1.4% y hay un incremento de CO₂ de 0.03% a 12%. Esto disminuye la viabilidad en un 50%. En cambio en almacén abierto las semillas mantienen una atmósfera de Nitrógeno que pueden retener su viabilidad considerablemente.

En términos generales, la humedad y temperatura son los principales factores que determinan la viabilidad en el almacenamiento de semillas.⁷

2.2.3 BASES BIOQUIMICAS PARA EL DETERIORO DE SEMILLAS ORTODOXAS.

El almacenamiento de semillas bajo condiciones adversas reduce

su viabilidad o capacidad de germinación (algunas veces hasta cero) o amplían la viabilidad, no necesariamente una declinación en la germinación, sino un desarrollo anormal del retoño (poco vigor).⁷

RESPIRACION Y SINTESIS DE ATP.

En embriones y ejes viables la actividad e integridad de la mitocondria se incrementa con el tiempo después de iniciada la imbibición y, con el tiempo, la producción de ATP es más eficiente junto con el consumo de oxígeno. La producción de ATP comienza muy pronto después de iniciada la imbibición, y el ATP suficiente se produce en un corto tiempo para otros procesos metabólicos que comienzan.⁷ En embriones no viables, por ejemplo del maíz, la mitocondria se hincha y la estructura de su membrana interna se distorsiona. En los embriones no viables los organelos incrementan su desorden después de la imbibición. No es sorprendente que el contenido de ATP en semillas no viables sea considerablemente menor que en las correspondientes viables (tan bajo como 1% en *Trifolium incarnatum*) y por lo tanto, es insuficiente para soportar los procesos metabólicos esenciales para la germinación. Quizás, entonces, las mitocondrias extraídas de las semillas deterioradas están parcialmente incompletas.⁷

PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS.

Los embriones de cereales y ejes embrionarios viables de legumbres y otros, inician la síntesis de proteínas bajo imbibición. Por otro lado, embriones viejos pero viables de ciertos cereales muestran signos de reducción en la síntesis de proteínas.

En embriones de cereales no viables, la inabilidad para la síntesis de proteínas está acompañada por una marcada disminución de la capacidad para la síntesis de RNA.⁷

Por otro lado, la disminución gradual de viabilidad por almace-

namiento prolongado de semillas, se ve acompañada por una reducción en la integridad del RNAr,³¹ como lo indica la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Relación entre la integridad del RNA ribosomal y germinación de semillas secas, reportado en 1980.³¹

Especie	Año de recolección.	% de germinación.	Tiempo para completar la germinación (días)	% de RNAr íntegro
N. glutinosa	1978	98	2.8	88
N. glutinosa	1973	97	3.7	82
N. tabacum	1978	82	5.1	63
N. tabacum	1973	72	17.7	23

Otras investigaciones llegan a los mismos resultados sobre la degradación de ácidos nucleicos por almacenamiento prolongado de semillas.³²

El RNAm es imperfecto en semillas no viables, y aunque es capaz de catalizar síntesis de proteínas in vitro, los productos pueden ser defectuosos o incompletos.³³

También se sabe que al incrementar el período de almacenamiento se dañan los cromosomas, ésto se detecta por el número de células aberrantes formadas. Probablemente durante el envejecimiento se activan las DNAsas nucleares (enzimas que degradan el DNA), lo que da por resultado una degradación parcial del DNA molecular.

La cantidad de DNAsas en embriones secos de centeno es más alta en semillas no viables que en el material viable. Esta y otras evi-

dencias son indicativas de una fragmentación parcial del DNA en componentes de peso molecular bajo, durante el envejecimiento en almacenamiento seco,³⁴ tabla 2.4.

Tabla 2.4 Contenido de DNA con alto peso molecular extraído de embriones de centeno de diferente viabilidad.³⁴

Viabilidad (%)	Contenido de DNA con alto peso molecular (mg/g de peso seco)
95	10.2
64	9.7
15	7.8
0	3.1

Cuando las semillas de lechuga y fresno se almacenan con alto contenido de humedad, pero en estado dormante, mantienen su capacidad de germinación por largos períodos (muy parecido a semillas encontradas en el suelo) y permanecen con poco daño en el cromosoma tabla 2.5. Esta tabla muestra la pérdida de viabilidad de semillas de lechuga almacenadas a un bajo contenido de humedad (9.7%) originado por la inactividad de sistemas enzimáticos capaces de reparar el daño sufrido en organelos del citoplasma, DNA y otras macromoléculas. A un contenido de humedad más bajo (5.7%) no hay daño apreciable para afectar la germinación, porque las enzimas degradativas no pueden operar a un bajo contenido de agua.³⁵ Para este tipo de semillas, llamadas "recalcitrantes", la reparación enzimática sólo puede ocurrir en un alto contenido de humedad y el daño sufrido por almacenamiento puede repararse continuamente y no acumularse totalmente.

Aunque en semillas secas "ortodoxas," que requieren bajo contenido de humedad para tener máxima viabilidad, deterioradas por almacenamiento, el mecanismo de reparación se active en el período de imbibición, ésta reparación podría ser insuficiente si el daño fuese muy grande originando una pérdida de viabilidad.

Tabla 2.5 Efectos del almacenamiento a diferentes contenidos de humedad sobre la germinación y degradación de los cromosomas en la radícula de lechuga.³⁵

Contenido de agua en semillas almacenadas (%)	Germinación (%)	Cromosomas aberrantes (%)
9.7	17	45
7	80	17
5.1	100	10
alto contenido de humedad	100	2
no almacenadas	100	2

Las aberraciones cromosómicas causan una disminución en la viabilidad de semillas.

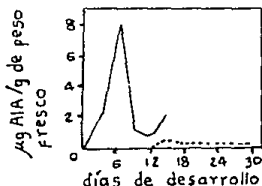
Semillas tratadas con agentes insecticidas o plaguicidas como malathion muestran baja viabilidad y parecen tener una mayor síntesis temprana de DNA.³⁶

2.3 HORMONAS EN EL DESARROLLO DE SEMILLAS

AUXINAS

El ácido indolacético (AIA), auxina principal, se presenta en varias formas de enlace; en semillas inmaduras de maíz, por ejemplo, existen arabinósidos de AIA, indolacetato de miositol, arabinósido de AIA inositol. Estos compuestos se consideran precursores del AIA, el cual en el transcurso de la germinación, libera de ellos enzimáticamente y se transporta probablemente a la punta del coleptilo de la semilla en crecimiento. En maíz y otros cereales se extraen del endospermo. Durante el desarrollo de muchas semillas se ha observado un incremento en el contenido de AIA libre; mismo que disminuye al completarse la maduración debido a que se convierte metabólicamente a formas enlazadas y a otros productos, esto sucede principalmente en el endospermo,³⁷ fig. 2.2

Fig. 2.2 Auxinas (AIA) en el desarrollo de semillas de guisantes. AIA en el embrión (----), AIA en el endospermo (—).



GIBERELINAS

Al finalizar 1982 se conocían 64 giberelinas, la mayoría encontradas en granos en desarrollo. Muchas giberelinas conjugadas han sido identificadas como glucósidos y glucopiranosil esterés.

La actividad de la giberelina puede ser interconvertida, en guisantes por ejemplo, se han identificado dos caminos:

1) $AG_{12} \rightarrow \rightarrow \rightarrow AG_{20} \rightarrow AG_{29} \rightarrow$ catabolito de AG_{29}

2) $AG_{12} \rightarrow \rightarrow \rightarrow AG_9 \rightarrow AG_{51} \rightarrow$ catabolito de AG_{51}

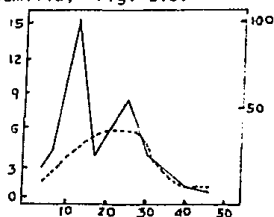
Todas estas giberelinas al final son activas excepto AG_{29} , AG_{51} y sus catabolitos.

La interconversión conduce al final a la inactivación de las giberelinas endógenas. En el desarrollo de la semilla, la mayoría de las giberelinas son activas, y la inactividad se observa solamente al final de la maduración. Parte de la disminución de giberelinas libres en semillas maduras se debe a conjugaciones por dar glucósidos, glucosil ésteres y catabolitos giberélicos, pero la mayoría de éstos son desconocidos.⁷

ACIDO ABSCISICO

Esta hormona se ha aislado de semillas inmaduras de varias especies. La forma libre del inhibidor puede encontrarse en concentraciones altas, especialmente en legumbres. Las formas enlazadas glucósido y glucosil éster, son las más comunes. Ambas formas libres y enlazadas se localizan en varias partes de la semilla (embrión y endospermo). Como sucede con otros reguladores del crecimiento en semillas inmaduras, el ABA aumenta su concentración durante el desarrollo de la semilla; generalmente presenta uno o dos máximos y después declina rápidamente durante el secado de la semilla,⁷ fig. 2.3.

Fig. 2.3 ABA en el desarrollo de granos de trigo. Extracción total de ABA libre a partir del grano (—) junto con su contenido de agua (---)⁷

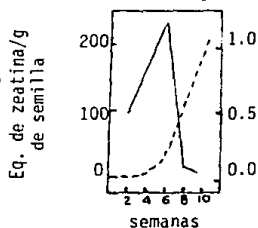


CITOCININAS

Como ya se mencionó anteriormente, las citocininas en el maíz se encuentran tanto en forma libre como en forma enlazada, formando ribósidos, ribótidos, glucósidos, etc.

No está claro en que parte de la planta se sintetizan las citocininas. La actividad citocinética se incrementa marcadamente durante el desarrollo de la semilla y declina con la maduración. Este comportamiento es consistente con el papel desempeñado por las citocininas en el control del crecimiento de la semilla,³⁸ fig. 2.4

Fig. 2.4 Citocininas en el desarrollo de semillas de *Lupinus albus*; citocininas (-); crecimiento de la semilla en peso fresco (---).



Estas evidencias muestran una relación entre las fitohormonas y el crecimiento del embrión. Durante el crecimiento de la semilla hay aumento de giberelinas activas; el período de división y alargamiento celular en el embrión y endospermo se lleva a cabo cuando las citocininas libres se encuentran en sus niveles altos. El inhibidor ABA está asociado más con la detención del crecimiento del embrión que con la promoción, no obstante, el desarrollo embriogénético puede ocurrir en presencia del ABA, pero al crecimiento germinativo no es posible.

Puede ser que la función de ABA sea prevenir que el embrión pase directamente de la embriogénesis a la germinación, lo que implica un período de senescencia sobre el embrión.³⁹

2.4 GERMINACION

En la literatura científica el término germinación es objeto de un uso indefinido y algunas veces incorrecto y por lo tanto es importante aclararlo. La germinación se inicia con la absorción de agua por la semilla (imbibición) y termina cuando aparece exteriormente la radícula.^{7,40} Por consiguiente incluye numerosos eventos; por ejemplo, hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas, elongación celular. Estrictamente hablando, la germinación no incluye el crecimiento de la planta, el cual comienza cuando la germinación termina. Los procesos que ocurren en la naciente radícula, tal como la movilización de mayores reservas almacenadas, no son parte de la germinación, son procesos postgerminativos.⁷

El progreso de la germinación puede determinarse aproximadamente por medición de agua absorbida o por la respiración, pero esas mediciones dan sólo indicaciones amplias de lo que los procesos de germinación pueden alcanzar. Únicamente la etapa de la germinación que podemos medir fácil y precisamente es su terminación, la emergencia de la radícula.⁷ En la fig. 2.5 se muestran las partes principales de un grano de maíz (*Zea mays*).⁷

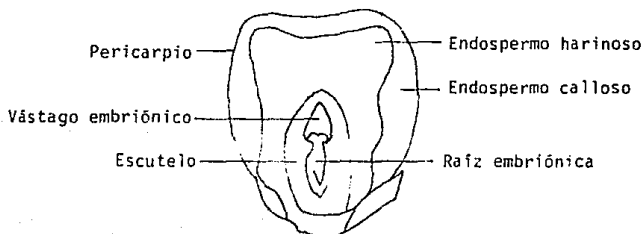


Fig. 2.5 Partes principales de un grano de *Zea mays*.⁷

2.4.1 HORMONAS EN LA GERMINACION

La evidencia de que las hormonas pueden requerirse para la germinación de semillas, se originó a partir de estudios sobre la naturaleza y causa de la dormancia en semillas. Estudios iniciales indicaron que los niveles de inhibidores en semillas están relacionados con la dormancia y los niveles de promotores de la germinación con el rompimiento de la misma. Entre los inhibidores de la germinación podemos mencionar el ABA, como el más potente descubierto en la naturaleza.⁴¹

Uno de los resultados más importantes en la investigación de fitohormonas en semillas fueron los de los estudios sobre el papel de AG_3 en granos de cereales. El descubrimiento de que de todas las hormonas que se encuentran en la naturaleza, sólo las giberelinas pueden sustituir al embrión en la iniciación de los eventos conducentes a la movilización de sustrato en granos de cebada, apoyan fuertemente la posibilidad de que estas hormonas son el agente primario en la regulación de la germinación. Estudios con aleurona de cereales revelan el mecanismo bioquímico por medio del cual actúan estas hormonas:

Primero la absorción de agua origina que el embrión produzca pequeñas cantidades de giberelinas, ya que está demostrado que el embrión es la fuente natural de giberelinas. Las giberelinas entonces se difunden a la capa de aleurona que rodea a las células almacenadoras de alimento en el endospermo, originando la formación de enzimas para desintegrar los alimentos de reserva en el endospermo. Una de las enzimas que más se activa es α - amilasa.⁴⁰

Como las auxinas tienen una estructura parecida al aminoácido triptofano y las citocininas tienen una base de adenina es posible también que se originen de la degradación de proteínas y ácidos nu-

cléicos, respectivamente.¹⁸ De ésta forma se difunden hacia el embrión para su desarrollo, fig. 2.6.

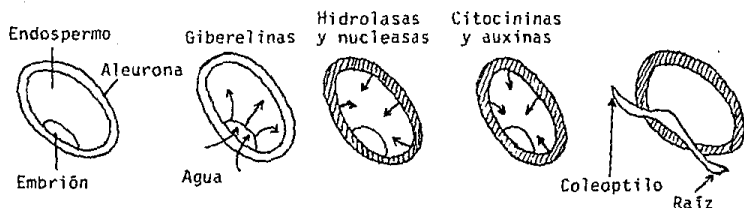


Fig. 2.6 Germinación de una semilla de cereal.

Este modelo hormonal de germinación no está muy completo, ya que citocininas y auxinas se encuentran presentes antes de iniciar la germinación y no solamente provienen de la degradación de macromoléculas. Las citocininas y las auxinas se encuentran inactivas en forma enlazada y se liberan al iniciar la germinación, como ya se comentó anteriormente.

Pareciera ser que las hormonas actúan secuencial y mecánicamente en la germinación de semillas, lo cierto es que existe una interacción entre hormonas para regular la germinación.

La participación de citocininas como reguladores de la germinación fue dado a conocer en 1971; éstas, junto con giberelinas y ABA forman los tres reguladores naturales más importantes de la germinación y dormancia en semillas.^{42,43}

ANTAGONISMO CITOCININA-INHIBIDOR

Los experimentos demuestran que las hormonas pueden oponerse (o modificar) los efectos de las otras hormonas en la germinación. Por ejemplo, la inhibición de ABA en la germinación de semillas de lechuga es revertida por citocininas.⁴⁴ El antagonismo entre citocininas e inhibidores inmediatamente sugiere el uso de citocininas para el rompimiento de la dormancia, ya que algunos estudios indican que los inhibidores son uno de los factores más importantes del estado dormante.^{41,45}

PAPEL PERMISIVO DE CITOCININAS

Giberelinas, inhibidores y citocininas pueden integrarse para explicar la regulación hormonal en la dormancia y la germinación. Los procesos inducidos por AG_3 , tales como síntesis de α - amilasa en cereales, se inhiben por ABA y el efecto se revierte solamente por citocininas y no por un exceso de AG_3 .^{46,47} Estas y otras investigaciones demuestran que las fitohormonas pueden tener designadas funciones en el control de la germinación y dormancia asumiendo las giberelinas el papel primario, e inhibidores y citocininas asumiendo los papeles "preventivo" y "permisivo", respectivamente.

El término "permisivo" es usado por primera vez por Khan⁴² para indicar una acción específica en una fitohormona. Este término ha sido usado para describir interacciones hormonales en tejidos animales. Un notable ejemplo es el caso de la insulina, la presencia de ésta es esencial para que estrógenos y prolactina promuevan el crecimiento del útero y glándulas mamarias. La insulina, por decirlo así, no tiene un efecto directo sobre éstos procesos. De igual forma, las citocininas aunque no afectan la germinación directamente, aparecen como

esenciales para completar los procesos germinativos inducidos por giberelinas cuando éstos procesos son bloqueados por inhibidores.⁴²

Las citocininas se requieren para eliminar el bloqueo en la germinación impuesta por inhibidores, en ausencia de tal bloqueo, las citocininas no son indispensables.

Un exceso de inhibidor no sólo puede ser la causa de la dormancia en semillas, también la dormancia puede ser el resultado de poca cantidad de giberelinas (en ausencia de inhibidores), o poca cantidad de citocininas (en presencia de inhibidor).⁴²

2.4.2 MODELO HORMONAL DE KHAN PARA EXPLICAR LA DORMANCIA Y GERMINACION.

En base a observaciones de que las giberelinas, inhibidores y citocininas afectan la germinación Khan propuso un modelo hormonal para explicar la dormancia y la germinación.^{42,43} El modelo propone que las tres clases de hormonas son reguladores importantes de éstos fenómenos en semillas. Estas hormonas pueden agruparse en ocho situaciones hormonales o fisiológicas que determinan la dormancia o germinación en semillas. El modelo se representa esquemáticamente en la fig. 2.7.

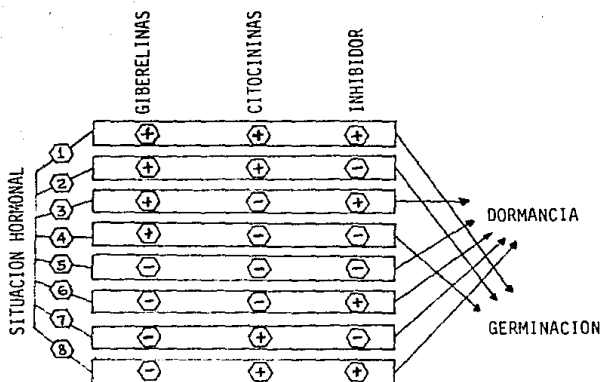


Fig. 2.7 Un modelo para explicar el mecanismo hormonal en la dormancia y germinación de semillas utilizando giberelinas, inhibidor y citocininas. La presencia de un tipo de hormona a concentración fisiológica es designada con el signo (+) y su ausencia o concentración baja por el signo (-).⁴²

La presencia o ausencia de una de las tres clases de hormonas, a concentraciones fisiológicamente activas puede originar una dormancia o germinación en semillas. Unas observaciones importantes de este esquema se muestran a continuación.

La dormancia en semillas se presenta cuando:

- a) Hay ausencia de giberelinas (situación 5-8) estén o no presentes citocininas e inhibidores.

- b) Que exista inhibidor y giberelinas pero no estén presentes las citocininas (situación 3).

La germinación ocurre en presencia de giberelinas y:

- a) Ausencia de inhibidor, sea que las citocininas estén (situación 2) o no lo estén (situación 4).
- b) Presencia de inhibidor, con citocininas oponiéndose al efecto de ésta (situación 1).

Este modelo da claramente a las giberelinas el papel primario en el control de la germinación como lo demuestran muchas investigaciones. El papel de los inhibidores y citocininas en la germinación son secundarios y esencialmente preventivo y permisivo, respectivamente. Es interesante observar en este modelo, que la dormancia no solamente resulta de la presencia de inhibidores, como se cree generalmente, sino que también se puede originar por la ausencia de giberelinas, o citocininas. Todo lo dicho anteriormente no quiere decir que la germinación en la naturaleza sea controlada por la presencia o ausencia absoluta de hormonas.

2.4.3 VARIACION DE CITOCININAS DURANTE LA GERMINACION DE ZEA MAYS.

Asa Julin-Tegelman (1979) investigó la variación de la actividad citocinética endógena en maíz durante dos días de imbibición, analizando citocininas libres (bases libres y ribósidos) y citocininas enlazadas (ribótidos).⁴⁸ Sus experimentos indican que las semillas de maíz seco contienen 70% más de citocininas libres que sus correspondientes ribótidos. A las 4 hr. de imbibición el nivel de ci-

tocininas libres se incrementa aproximadamente a un 90% y los ribótidos en el mismo tiempo disminuyen a un 33%.

La mínima cantidad en que disminuyen los ribótidos de citocininas no explica el gran incremento de citocininas libres. Después de 48 hrs. de imbibición el contenido de citocininas libres decrece a un 20% por debajo del nivel que contiene las semillas secas, mientras que los ribótidos de citocininas se mantienen a un nivel bajo durante la imbibición, fig. 2.8

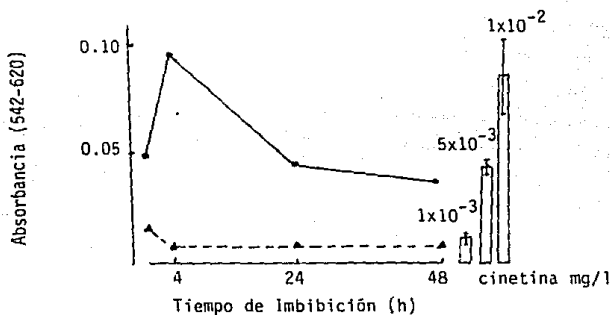


Fig. 2.8 Niveles endógenos de citocininas libres (bases libres, ribótidos) (-) y ribótidos de citocininas (---) durante 48 hrs. de imbibición. El contenido de citocininas se expresa en absorbancia. Extractos equivalentes a 2 gr. de semilla seca fueron probados por el bioensayo del amaranto. Las barras verticales indican S.E.M., N = 4.

Otros resultados importantes sobre los cambios en los niveles endógenos de citocininas durante la germinación en semillas de maíz, fueron obtenidos por Smith y Van Stadey (1978).⁴⁹ Las citocininas fueron separadas por cromatografía en papel dividiéndolas en dos fracciones: La fracción A contiene compuestos polares tales como glucosido de zeatina, ribósido de glucosil zeatina y la fracción B que contiene compuestos menos polares como zeatina, ribósido de zeatina y sus respectivos dihidro derivados. La variación de éstas citocininas se muestran en la tabla 2.6.

Tabla 2.6 Actividad citocinética detectada en extractos de semillas de maíz maduro y extractos de semillas 1, 2 y 3 días de imbibición. La actividad citocinética es expresada como equivalentes en μ g de cinetina/g de peso seco.

Días de imbibición	Fracción A	Fracción B	Total
0	1.12	0.48	1.60
1	1.24	0.39	1.63
2	0.93	0.50	1.43
3	0.13	0.30	0.43

Como puede observarse en la tabla, hay una disminución en la actividad citocinética principalmente en la fracción A.

Estos investigadores también analizaron la variación de citocininas en el embrión y endospermo. A los tres días de imbibición, en el endospermo hay una disminución en los niveles de actividad citocinética en la fracción A de los extractos, comparado con el endospermo del material seco. Lo mismo pasa con la fracción B.

En el caso de las extracciones obtenidas del embrión, los niveles de actividad citocinética detectada en la fracción A se mantienen altos durante la imbibición. Hay una disminución en los niveles de actividad en la fracción B durante el período imbibicional. Esto probablemente se debe a la inmediata utilización de las bases libres en el desarrollo inicial del eje embrionario.⁴⁹

Todo parece indicar que los glucósidos de citocininas presentes en el endospermo son transportados al embrión para utilizarlos en su crecimiento, ya que por otro lado en el embrión se detecta una alta actividad de β -glucosidasa.⁴⁹

El crecimiento del embrión depende de las citocininas del endospermo. Al separar el endospermo, existe poco desarrollo del embrión y una disminución en la velocidad de su crecimiento; aplicando citocininas y en particular glucósidos, sustituyen parcialmente al endospermo.⁵⁰ Investigaciones sobre los metabolitos de citocininas muestran evidencias de que citocininas O-glucosil conjugadas pueden ser formas de almacenamiento de citocininas.⁵¹

2.5 ANALISIS DE CITOCININAS

Generalmente los niveles endógenos de hormonas vegetales son muy bajos, por lo que es muy difícil aislarlos en suficiente cantidad y pureza para analizarlos por métodos espectroscópicos, por lo que es necesario usar otras técnicas.

Los métodos analíticos de fitohormonas, generalmente consisten en los siguientes pasos:

- a) Extracción con disolventes activos y disolventes orgánicos.

- b) Purificación o aislamiento utilizando principalmente métodos cromatográficos.
- c) Identificación y cuantificación por métodos biológicos y fisicoquímicos.

2.5.1 EXTRACCION

Las citocininas se extraen con etanol acuoso o metanol acuoso. Disolventes menos polares no pueden ser utilizados para la extracción de citocininas por la baja solubilidad de éstas. Las extracciones se realizan frecuentemente a baja temperatura para minimizar la degradación enzimática o química, debido a la posibilidad de que los ribótidos de citocininas liberen ribósidos por la acción de la fosfatasa y que algunas veces los ribósidos de citocininas al hidrolisarse liberan sus bases libres.⁵²

También es conocido que las enzimas tales como la fosfatasa y ribonucleasa pueden actuar en la solución alcohólica a baja temperatura.⁵³

En la solución alcohólica se encuentran bases libres de citocininas, ribósidos y ribótidos de citocininas, pero junto con éstas también se extraen gran cantidad de sustancias que son separadas por extracciones en las que intervienen las propiedades básicas de las citocininas.

La isopentenil adenina, una de las bases libres de citocininas, tienen dos valores de pKa, 3.4 y 10.4. El pKa 3.4 se atribuye al nitrógeno exocíclico protonado y el pKa 10.4, se atribuye a la disociación de el grupo NH en el anillo de imidazol.¹⁰ Como puede observarse, las bases de citocininas libres son compuestos anfotéricos.

Por otro lado, los ribósidos de citocininas presentan una débil basicidad ya que los grupos NH del imidazol son bloqueados por los grupos ribosil. De ésta forma, 6-(3-metilbut-2-enil amino)-9- β -D-ribofuranosil purina presenta un valor de Pka igual a 3.8, mientras que su base libre tiene un pka de 3.4. Los ribótidos de citocininas también son anfotéricos debido al grupo fosfato.

Por la naturaleza anfotérica y su baja solubilidad en disolventes orgánicos, las citocininas no pueden ser fraccionadas usando procedimientos generales de extracción.

En la tabla 2.7 se muestran los coeficientes de partición en distintos disolventes orgánicos.⁵⁴

Tabla 2.7 Coeficientes de partición ($K_d = [C]_{org.} / [C]_{ac.}$) de bases libres de citocinina.⁵⁴

	PH	Coeficiente de Partición		
		Zeatina	Cinetina	Isopentenil adenina
Eter dietílico	7.0	0.032	0.810	2.33
Eter dietílico	3.0	0.011	0.237	0.322
Eter de petróleo	7.0	0.0004	0.0006	0.003
Eter de petróleo	3.0	0.0003	0.0004	0.001
Acetato de etilo	7.0	0.240	3.29	6.88
Acetato de etilo	3.0	0.049	1.78	1.49
n- Butanol	7.0	6.25	20.6	40.4
n- Butanol	3.0	1.59	8.51	16.7

Como puede observarse en la tabla, las extracciones con n-Butanol son muy eficaces en la purificación de citocininas por sus altos coeficientes de partición en éste disolvente a pH = 7. Las extracciones con n-butanol tienen la ventaja de aislar bases y nucleosidos de citocininas dejando en la fase acuosa a pH = 7 nucleótidos de citocininas y citocininas con grupos carboxilo en la cadena lateral.¹⁷

2.5.2 PURIFICACION

Después de evaporar el n-butanol con el cual se han extraído las citocininas, éstas son purificadas por algún tipo de cromatografía. Generalmente se utilizan las cromatografías en papel, capa fina y columna (intercambio iónico). La cromatografía en papel y capa fina frecuentemente se utiliza para identificar citocininas por métodos biológicos (bioensayo).⁵⁵ La cromatografía en papel y capa fina permiten separar compuestos de estructuras muy similares por ejemplo, los isómeros de Zeatina-7- β -D-glucosido y Zeatina-9- β -D-glucósido.⁵⁶

La cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico son extensamente usadas en la purificación de citocininas por que es uno de los procedimientos más fáciles para eliminar inhibidores presentes en el extracto. Se utilizan resinas de intercambio catiónico tanto en forma protonada como en forma de amonio. Existe la posibilidad de que los nucleósidos y los nucleótidos liberen sus correspondientes bases libres de citocininas, cuando las resinas de ácidos fuertes se eluyen con solución amoniacal lo que origina un calentamiento local.⁵²

Resinas de intercambio aniónico fueron utilizadas por Letham.⁵⁴ El problema de éstas resinas es que los nucleótidos y nucleosidos de citocininas que tienen grupos carboxilo, son retenidos fuertemente

en la resina y sólo pueden eluirse con ácido fórmico.

2.5.3 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION

Como ya se mencionó anteriormente, se pueden utilizar métodos biológicos y/o fisicoquímicos para identificar y cuantificar fitohormonas.

METODOS BIOLOGICOS.

Para éste método las citocininas se purifican generalmente por cromatografía en papel y capa fina. Es común que los métodos biológicos se realicen por bioensayo o ensayo inmunológico.

BIOENSAYO.

Un bioensayo consiste en medir la respuesta que un órgano o tejido manifiesta al ponerse en contacto con la sustancia a prueba, en éste caso citocininas. De ésta forma se obtiene una curva patrón que relaciona la respuesta del organismo y la dosis de sustancia a identificar. La respuesta puede ser elongación del tallo, biosíntesis de pigmentos, incremento en la biomasa u otra respuesta específica.

Los bioensayos tienen varios problemas inherentes: Requieren de varias horas y algunas veces de días o semanas;⁵⁷ las sustancias a identificar deben aplicarse exógenamente a los tejidos ensayados, dando por resultado baja sensibilidad debido a los problemas de su transporte hasta el sitio de acción. Estos problemas, junto con los requerimientos de un gran número de réplicas acaban con la precisión del análisis. Cualquier impureza en un extracto biológico, incluyen do inhibidores u otra molécula activa, comprometen la interpretación del bioensayo. Por ésta razón se han desarrollado métodos inmunoló-

gicos y fisicoquímicos.

ENSAYOS INMUNOLOGICOS.

Los ensayos inmunológicos se aplicaron originalmente al estudio de hormonas animales. Por su alta selectividad, mínima purificación de la muestra y sensibilidad igual o mayor que la de los métodos fisicoquímicos, tienen un gran valor analítico en las investigaciones de medicina clínica y endocrinología, aplicándose también a la determinación de fitohormonas,⁵⁸ tal como radioinmunoensayos (RIE) y la enzima inmuno ensayo (EIE).

Para este método, se requiere la formación de un anticuerpo para el compuesto de interés. Debido a que los fitorreguladores, son moléculas pequeñas es difícil obtener un anticuerpo específico. Por esta razón se necesita unir éste compuesto a una molécula grande, usualmente una proteína. En todos los casos han sido conejos los productos de los anticuerpos.

Las moléculas del anticuerpo aparecen en el suero sanguíneo (antisuero) y en los tejidos del conejo en respuesta a la inyección del antígeno, dando por resultado la formación del complejo antígeno-anticuerpo. La formación de éste complejo puede ser estudiada por medio de la reacción de la precipitina, formación de un precipitado al interactuar el antisuero con el antígeno.

La determinación cuantitativa se realiza usando un elemento químico radiactivo como integrante del antígeno y midiendo posteriormente la radiactividad presente en el complejo. Su principal desventaja es el largo proceso para la obtención de los anticuerpos específicos.⁵⁸

MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS

Estos métodos se aplican a todos los tipos de fitohormonas, ya que presentan una gran sensibilidad, precisión y rapidez de análisis, casi imposible de obtener por bioensayo.

La mayoría de éstos métodos permiten aislar, identificar y muchas veces cuantificar fitohormonas en el mismo proceso. Como ejemplos tenemos la cromatografía en papel y capa fina para aislamiento e identificación; cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y CAPA FINA.

Este tipo de cromatografía permite distinguir entre sí, citocininas libres, ribótidos y ribósidos de citocininas, utilizando los disolventes apropiados. Las citocininas se detectan revelando con el reactivo de nitrato de plata/azul de bromofenol originando una mancha azul; también pueden identificarse con luz U.V. ya que absorben fuertemente alrededor de 254 nm.¹⁰

CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).

La CG es una técnica rápida en la separación de mezclas aunque tiene el inconveniente de analizar compuestos volátiles. Por esta razón es necesario formar derivados volátiles para identificar y cuantificar fitohormonas.

Las citocininas se analizan como derivados trimetil sililados en CG. Los grupos hidroxilo tanto de la cadena lateral como en la parte del azúcar y la posición 9 del esqueleto de purina son susceptibles de formar derivados sililados. Después de completar la trimetil sililación, la mezcla de reacción se inyecta al CG.

La CG se denomina cromatografía gas-líquido porque las paredes de la columna se recubren con una capa de líquido no volátil, fase estacionaria, sostenida sobre un soporte sólido y utilizando como eluyente un gas inerte que puede ser He, N, o Ar.

La secuencia en el análisis por CG consiste en introducir la muestra por inyección a un bloque de calentamiento, donde se vaporiza instantáneamente y se arrastra en forma de vapor por medio de un gas inerte hacia la entrada de la columna. Los solutos se absorben en la fase estacionaria y después son eluidos al hacer pasar gas portador puro. Cada soluto se moverá a su propia velocidad a través de la columna dependiendo de sus proporciones de partición en la fase móvil y estacionaria. Los componentes separados entran a un detector, conectado a la salida de la columna. El tiempo de retención identifica al componente, y el área del pico, señal para cada componente, indica la proporción del componente en la mezcla.

Existen muchos tipos de detectores que siguen de un modo continuo la composición de gas efluente de la columna tales como celdas de conductividad térmica (DCT), detectores de ionización de flama (DIF), detectores de captura de electrones y espectrómetro de masas (EM).

El EM es el detector más selectivo que puede ser acoplado al CG. El acoplamiento CG-EM, combina el poder de separación con la calidad de detección selectiva, respectivamente. Por el método CG-EM se han analizado derivados sililados de citocininas.^{59,60}

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).

En años recientes la HPLC se ha usado como la técnica de separación más poderosa que se encuentra disponible para el aislamiento y cuantificación de fitohormonas.

La HPLC tiene varias ventajas sobre la CG. HPLC se aplica a un gran número de compuestos, incluyendo compuestos no volátiles y sustancias inestables al calor. Tiene la ventaja de recuperar la muestra sin ninguna alteración química, lo que permite a la muestra estar disponible para otro método de análisis.

Otras ventajas de HPLC son: gran poder de resolución; separaciones más rápidas de los componentes que con columnas convencionales; velocidad de separación mayor, ya que éstas pueden realizarse en menos de una hora.

El proceso consiste en hacer pasar la fase móvil a través de la columna a velocidades lineales de flujo que puede ser hasta 100 veces más rápidas que en la columna de cromatografía tradicional. La muestra se inyecta al sistema cerca de la parte superior de la columna. Al salir de la columna el eluyente que puede o no contener un componente de la mezcla penetra al detector. Casi siempre se usa un detector ultravioleta con longitud de onda fija 254 nm (o en ciertos casos 280 nm). La respuesta del detector está en función de la concentración de la muestra.

Las diferentes técnicas de HPLC usadas para el análisis de muestras son: partición en fase normal, partición en fase inversa, adsorción e intercambio iónico.⁶¹

HPLC, FASE NORMAL

Esta técnica tiene un mecanismo de separación algo complejo, debido en parte a la inestabilidad de la fase estacionaria. Por esta razón, se prefiere que el material de empaque tenga fases polares enlazadas.⁶¹ Estos materiales que tienen como base sílica gel con superficie recubierta (enlaces covalentes Si-O), tienen una gran va-

riedad de sustituyentes polares que van a originar un tiempo de retención mayor en los componentes más polares de la muestra por analizar.

HPLC, FASE INVERSA

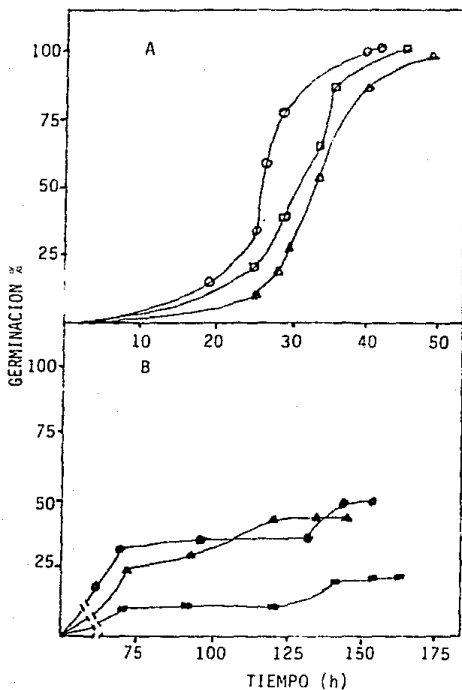
El límite de uso de la fase normal, ha originado un desarrollo en la técnica por fase inversa. Una ventaja importante de HPLC, fase inversa, es que puede utilizarse como fase móvil, disoluciones acuosas, lo que favorece el análisis de muestras vegetales debido a su naturaleza predominantemente acuosa. Los materiales de empaque que usa se basan en partículas de sílica gel teniendo como fase enlazada una superficie recubierta de grupos hidrocarbonados tales como C_2 , C_6 , C_8 , C_{18} y C_{22} . El material más usado es el C_{18} (octadecil silano, ODS). Al ser no polar la fase estacionaria origina un tiempo de retención mayor en los componentes menos polares de la muestra por analizar, en contraposición a lo que se observa en la fase normal.

HPLC por adsorción e intercambio iónico se han utilizado muy poco en el análisis de fitohormonas por muchos problemas inherentes a éstos sistemas.

2.6 TRABAJOS QUE ANTECEDEN A ESTE PROYECTO

Se han realizado algunos trabajos que anteceden a este proyecto con el fin de dar una explicación a la baja viabilidad en la población de semillas de maíz con almacenamiento prolongado con respecto a la población de semillas de cosecha reciente. Uno de estos trabajos muestra la diferencia en la germinación de las semillas de ambas poblaciones, utilizando los genotipos Mezquital, Tuxpeño y Universal, fig. 2.8.⁶²

Fig. 2.9 Germinación de semillas de maíz de cosecha reciente (A) y de almacenamiento prolongado (B) en los genotipos Mezquital (—○—○—), Tuxpeño (—□—□—) y Universal (—▲—▲—).



En ésta figura puede observarse claramente la poca viabilidad en semillas con almacenamiento prolongado, en el que sólo el genotipo Mezquitil alcanza como máximo un 50% de germinación en 150 horas mientras que el 50% de germinación en semillas de cosecha reciente se logra en solo 25 horas para este genotipo.

Otros trabajos antecedentes de éste y que también se realizaron en nuestro laboratorio^{63,64} consistieron en adaptar el método de extracción y cuantificación por HPLC de citocininas tanto en elote como en semilla seca de varios genotipos de maíz. En estos trabajos se usó Zeatina como estándar en el cromatógrafo y se encontró que en los extractos de elote se haya presente ésta citocinina, mientras que en los extractos de semilla seca no se detectó. En la fig. 2.10 se presentan cromatogramas de los trabajos mencionados.

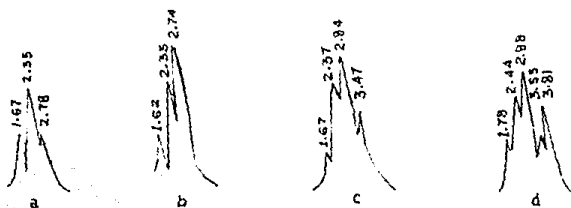


Fig. 2.10 Cromatogramas de ctocininas extraídas de *Zea mays*, y analizadas por HPLC; eluyente MetOH/H₂O 70:30 v/v. a) a partir de elote; b) elote enriquecido con Zeatina; c) semilla de maíz; d) semilla de maíz enriquecida con Zeatina.

Como se ve en el cromatograma "a" correspondiente a extractos de elote, la señal con $t_r = 2.78$ min. es identificada como zeatina ya que ésta señal aumenta cuando los extractos se enriquecen con zea

tina, señal 2.7 min. en el cromatograma "b". En el cromatograma "d" correspondiente a extractos de semillas secas enriquecidos con zeatina se muestra una señal con $t_r = 3.81$ min. que no aparece en extractos de semillas secas sin enriquecer con zeatina, cromatograma "c", lo que indica que en semillas secas de maíz no alcanza a detectarse la zeatina.

Otro resultado significativo de los estudios anteriores^{63,64} es haber determinado que el 85% de las citocininas presentes en el embrión de la semilla seca se encuentran concentradas en el eje embriónico, mientras que el 15% restante se encuentra en el escutelo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

A. MATERIALES

Aparatos

-Un baño a temperatura constante GCA/PRECISION SCIENTIFIC CIRCULATING SYSTEM-254.

-Una centrifuga clínica marca METTICH.EBA III.

-Un cromatógrafo de líquidos marca Waters Assoc., columna radial pak C₁₈ y acoplado a un espectrofotómetro UV-VIS marca Perkin-Elmer modelo LC-55 como detector.

Reactivos

Los reactivos y disolventes son R.A y se utilizaron sin previa purificación: Etanol, Acido Clorhídrico, n-Hexano y NaOH son reactivos "Baker Analyzed"; n-Butanol es Reactivo Analítico de PROD. QUIM. MONTERREY; Metanol, MERCK para análisis; 6(γ,γ'-dimetilalilamina)-purina, Zeatina y Ribosil-Zeatina isómeros trans, son de SIGMA Chemical Company.

Genotipos de maíz analizados

Los genotipos de maíz analizados, tanto almacenados como no almacenados son los siguientes: Criollo del Mezquital, Tuxpeño Crema I y Compuesto Universal.

CRIOLLO DEL MEZQUITAL

Es una variedad perteneciente a la raza cónica, adaptada a las siembras de temporal en la Mesa Central. Esta variedad fue colectada en el Valle del Mezquital en el estado de Hgo. Por sus características de la tolerancia a la sequía, fue sometida a partir de 1973 a un programa de selección masal visual estratificada para resisten-

cia a la sequía. La semilla con origen Criollo del Mezquite 1973 proviene del primer ciclo de selección masal para resistencia a sequía en Chapingo. El origen 1985 es un aumento de la semilla del 7° ciclo de selección para resistencia a sequía.

TUXPEÑO CREMA 1

Es un compuesto formado con las variedades más rendidoras de la raza tuxpeño adaptadas a la faja costera del Golfo de México. El compuesto fue introducido a Chapingo en 1970 y sometido a selección masal visual estratificada a partir de 1971. De ésta manera, la semilla con origen Tuxpeño Crema 1 1972 proviene de segundo ciclo de selección masal en Chapingo en 1972. Para este año el compuesto estaba muy mal adaptado en Chapingo por lo que su rendimiento era muy bajo, debido principalmente a su alta susceptibilidad a las enfermedades de planta y mazorca. La planta era muy alta y alcanzaba la floración masculina a los 130 días después de la siembra. La semilla con origen Tuxpeño Crema 1 1984 proviene del 12° ciclo de selección masal visual estratificada hecha en Chapingo en 1982 y aumentada en 1984. Las plantas siguen siendo muy altas; la floración masculina ocurre a los 112 días y el rendimiento de las plantas es casi normal. Las características de la planta y mazorca son muy similares a las de la raza tuxpeño.

COMPUESTO UNIVERSAL

Es un compuesto de compuestos ya que intervienen en su formación cinco compuestos de la raza Chalqueño, tres compuestos de la raza Cónica y una variedad de la raza Cónico Norteño. En uno de los cinco compuestos de Chalqueño intervienen algunas líneas autofecundadas de la raza Celaya. Los compuestos y variedades componentes constituirían

para el año de 1968 (año en que fue formado el Compuesto Universal) el germoplasma más valioso del programa de mejoramiento genético de maíz de la Mesa Central.

La semilla con origen Compuesto Universal 1970 proviene del primer ciclo de recombinación de los componentes del compuesto. La recombinación fue hecha en un lote aislado sembrado bajo riego en Chapingo en Abril de 1970. La semilla con origen Compuesto Universal 1984 proviene del ciclo 12 de selección masal visual estratificada en el compuesto original 1970.

El compuesto posee las características generales de planta y mazorca de la raza Chalqueño. Las plantas son altas, las mazorcas son grandes y cónicas: florea a los 100 ó 105 días y alcanzan la madurez comercial a los 180 días. Está adaptado a las siembras de maíz de riego en la Mesa Central, las cuales se inician a fines de marzo y principios de abril.

Condiciones de almacenamiento de semillas en Chapingo.

La semilla cosechada en mazorca en el campo tiene una humedad que fluctúa entre 15 y 18%. Se desgrana y deposita en bolsas de manita: se seca al sol o con aire caliente en una secadora hasta que alcanza una humedad de 8 a 10%. Se almacena en cajoneras en un cuarto con humedad y temperatura ambientales.

B. METODO

Condiciones de germinación.

En un recipiente de vidrio se colocan las semillas de maíz en-

tre dos capas de algodón humedecidas con agua destilada tapando el recipiente con papel aluminio. Las semillas se ponen a germinar en un baño a 25°C durante, 0, 4, 12 ó 24 hrs.

Extracción de Citocinas.

Se realiza con semillas nuevas y con almacenamiento prolongado de los genotipos mencionados anteriormente. Las citocinas son determinadas en los ejes embrionarios obtenidos de 10 gramos de semilla aproximadamente.

Se adaptó el método de Nishinari y Syono⁵⁵ para la extracción de citocininas a partir de ejes embrionarios del maíz, en la forma que a continuación se indica:

Los ejes embrionarios se homogenizan en un mortero con 30 ml. de etanol al 80%, enfriando exteriormente en un baño de hielo-sal. El homogenizado se centrifuga por 20 min. a temperatura ambiente. Al residuo obtenido se agregan 20 ml. de EtOH al 80% y se somete a una agitación magnética en un baño de hielo-sal 20 min. El residuo se vuelve a centrifugar 20 min. Los extractos etanólicos se juntan y se concentran al vacío a 40°C y 25 mmHg. El concentrado se diluye con agua destilada hasta un volumen de 20 ml. y se acidula a pH 3 con HCl 1N, extrayéndose tres veces con fracciones de 10 ml de n-Hexano. La fase acuosa se ajusta a pH 8 con NaOH 1N y se extrae tres veces con fracciones de 10 ml de n-Butanol saturado de agua. Los extractos n-butanólicos se juntan y se concentran a sequedad a 40°C y 5 mmHg.

Análisis

El análisis de las citocininas extraídas se lleva a cabo por

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) de partición inversa, ya que se utiliza octadecilsilano (C_{18}) como fase estacionaria no polar en la columna. Este tipo de cromatografía ha sido utilizado en la separación de citocininas por Kannangara, T. y Holland, J.^{65,66}

El extracto obtenido se disuelve en 5 ml de metanol y se inyectan 100 μ l al cromatógrafo de líquidos. La fase móvil es una mezcla de metanol-agua 70:30 v/v. Los experimentos de Ernstsen, A. y Jensen, F.⁶⁷ demuestran que una separación eficiente de citocininas se logra utilizando altas concentraciones de metanol.

La velocidad de flujo de la fase móvil es de 1.5 ml/min.

Como detector de citocininas se usa un espectrofotómetro con longitud de onda fija de 254 nm. Las citocininas absorben fuertemente a ésta longitud de onda, a tal grado que se pueden detectar cantidades hasta de 4 ng.⁶⁸

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION .

Como ya se mencionó en la introducción, en éste trabajo se determinaron los contenidos de citocininas utilizando como estándar ribósido de zeatina en semillas secas de maíz y a varios tiempos de imbibición con tres genotipos diferentes utilizando dos poblaciones distintas: unas de cosecha reciente y otras con almacenamiento prolongado. Dichas determinaciones se hicieron con el objeto de establecer si existe una relación entre el contenido de citocininas y la pérdida de viabilidad que se ha observado en las semillas con almacenamiento prolongado de los genotipos estudiados, fig. 2.9.

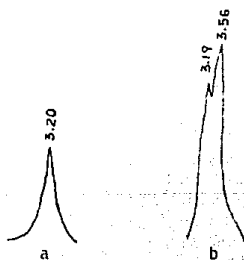
En todos los casos, las determinaciones se hicieron en los ejes embrionarios de semillas a distintos tiempos de imbibición. El eje embrionario se seleccionó para las determinaciones dado que, como ya se mencionó en los antecedentes, se encontró en una investigación anterior que en ésta parte se encuentra concentrado el 85% de citocininas de las que cuenta el embrión.

Con el objeto de probar y optimizar el método de extracción y cuantificación, las primeras pruebas se realizaron con semillas de maíz del genotipo H-30, obteniéndose los siguientes cromatogramas:

Fig. 4.1 Cromatogramas obtenidos de extractos de ejes embrionarios correspondientes a semillas del genotipo H-30; eluyente 70:30 v/v

a) Extracto de eje embrionario.

b) Extracto de eje embrionario enriquecido con Zeatina.

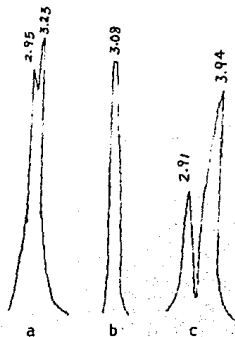


En la fig. 4.1 se puede observar que no se detecta la Zeatina en semillas de maíz, resultado que está de acuerdo con los trabajos indicados en la fig. 2.10.^{63,64}

El hecho de que en extracto de elote se observe la presencia de Zeatina, mientras que en el extracto de semillas seca no se observe dicha citocinina, puede deberse a la observación de que durante el desarrollo de la semilla se detecte una marcada actividad citocinética, misma que declina con la maduración,³⁸ pág. 24, fig. 2.4. Posiblemente la Zeatina, al ser una de las citocininas más activas en la naturaleza,⁴⁹ sea almacenada en alguna forma inactiva en la semilla seca, por ejemplo O-glucosilzeatina¹⁶ y por ésta razón no se detecte en el extracto de la semilla seca por HPLC.

Para identificar el compuesto(s) cuya señal se encuentra a un tiempo de retención (tr) de 3.2 min. fig. 4.1, se utilizaron 3 citocininas como estándar: ribósido de Zeatina, Isopenteniladenina y Zeatina. Los cromatogramas de extractos de eje embrionario enriquecidos con estas citocininas estándar se muestran en la fig. 4.2.

Fig. 4.2 a) cromatograma de extracto de eje embrionario en semillas de maíz H-30 y Zeatina (Z); b) cromatograma de extracto y Ribósido de Zeatina (RZ); c) cromatograma de extracto e isopentiladenina (IP) eluyente MetOH/H₂O 70:30 v/v.



El cromatograma 4.2.b muestra que la citocinina extraída del eje embrionario es Ribósido de Zeatina. Sin embargo al analizar otra muestra de ejes embrionarios de semillas H-30 se observa una ligera separación de tres componentes, fig. 4.3, los cuales fueron comparados con los estándares de Zeatina y Ribósido de Zeatina ya que la señal para Isopenteniladenina tiene un tiempo de retención mayor (3.94 min.) que la señal de la muestra (tr = 2.91 min.) fig. 4.2.c.

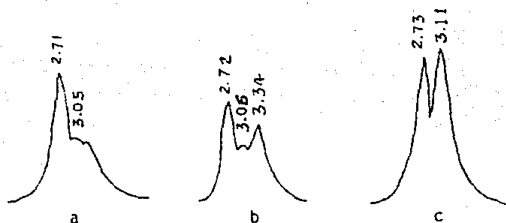


Fig. 4.3 Cromatogramas de extracto de ejes embrionarios en maíz H-30: a) extracto; b) extracto más Zeatina; c) extracto más ribósido de Zeatina. Eluyente MetOH/H₂O 70:30 v/v.

En la fig. 4.3.a se logran separar 3 componentes de la muestra: el de tr = 2.71 min. que se encuentra en mayor cantidad; el de tr = 3.05 min. que parece ser Ribósido de Zeatina fig. 4.3.c y otra señal que no alcanza a integrar y parece ser Zeatina fig. 4.3.b.

En la mayoría de los casos estudiados no se logran separar los componentes de las muestras y generalmente se obtiene una sola se-

nal con las condiciones experimentales utilizadas. Esta señal es grande, y cuando esporádicamente se logra separar en sus componentes, éstos muestran dos o tres señales pequeñas en el cromatograma como en el caso del mezquital viejo a tiempo cero de imbibición, fig. 4.4.a, sin embargo al aplicar otro extracto de Mezquital viejo a tiempo cero de imbibición se obtienen una sola señal grande, fig. 4.4.b. Lo mismo pasa con Tuxpeño nuevo a tiempo cero de imbibición en el que aparecen dos pequeñas señales, fig. 4.5.a, la mayor de $tr = 3.06$ min. y otra de tr menor que no alcanza a integrar; la señal integrada es muy probable que sea Ribósido de Zeatina cuyo $tr = 3.07$ min., fig. 4.5.b, y también es probable que ésta sea la citocinina que se encuentra en mayor proporción en la semilla seca de Tuxpeño nuevo; en otro extracto, para este genotipo se obtiene una señal grande a $tr = 3.06$ min. fig. 4.5.c, cuyo tr es muy cercano a Ribósido de Zeatina ($tr = 3.07$ min.).

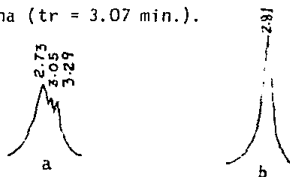


Fig. 4.4 Cromatogramas de extractos de ejes embrionarios para el genotipo Mezquital viejo a cero horas de imbibición.

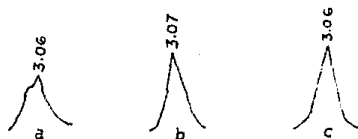


Fig. 4.5 Cromatogramas de extractos de ejes embrionarios para el genotipo Tuxpeño nuevo a cero hr. de imbibición "a" y "c"; 4.5.b, cromatograma de Zeatina.

Los estudios se realizaron con dos poblaciones diferentes para cada genotipo: semillas de almacenamiento prolongado, 15-18 años (viejos) y semillas de cosecha reciente (nuevos), eluyente MetOH/H₂O, 70:30 v/v.

Los cromatogramas indican la extracción de Ribósido de Zeatina a partir de ejes embrionarios de los genotipos de maíz estudiados.

En algunos experimentos logró observarse la separación de otras citocininas que no corresponden exactamente a Ribósido de Zeatina ya que tiene un r_f ligeramente menor. Esta puede circunscribirse en un número reducido de citocininas considerando:

- a) Análisis del método de extracción utilizado.
- b) Todas las citocininas que se han extraído de Zea mays, mostradas en la tabla 2.1.

ANÁLISIS DEL METODO DE EXTRACCION.

En los extractos EtOH, primer paso en el método de extracción, aparte de las citocininas se extraen las otras fitohormonas,¹⁰ además de un gran número de sustancias. Estas extracciones se hacen a baja temperatura para minimizar la degradación enzimática o química de los ribósidos que pueden liberar ribósidos de citocininas por la acción de las fosfatasa, además de que algunas veces las bases libres se forman por hidrólisis de los ribósidos de citocininas.⁵² Después de concentrar los extractos EtOH, éstos se diluyen con agua ajustando a pH3, ya que uno de los pKas de las citocininas es 3.4 correspondientes al nitrógeno exocíclico protonado.¹⁰ La fase acuosa se lava con hexano para eliminar compuestos neutros y ácidos. La

fase acuosa se ajusta a pH8. En éste valor de pH las citocininas no tienen carga neta (-) ya que el segundo valor de pKa de citocininas es aproximadamente 10.4 y corresponde al grupo NH en el anillo de imidazol. De la fase acuosa se hacen extracciones con n-butanol ya que existe un alto coeficiente de partición de citocininas en éste disolvente a pH8, tabla 2.7; en la fase acuosa quedan citocininas con grupos funcionales ácidos en su cadena lateral y ribósidos de citocininas¹⁵ por sus grupos fosfato aniónicos a éste valor de pH, los cuales se muestran en la tabla 2.1. En la fase butanólica se extraen bases libres, ribósidos y glucosidos de citocininas,^{15,55} sin embargo no se descarta la posibilidad de extraer también Ribósido de Adenina.

A continuación se muestran los nombres de posibles citocininas aisladas por el método de extracción utilizado, más polares que Ribósido de Zeatina y que aparecen en la tabla 2.1.

9-glucosil dihidrozeatina

0-glucosilzeatina

9-glucosilzeatina

Smith y Van Staden han registrado altas concentraciones de glucósidos de citocininas en extractos de embriones de semillas de maíz durante la imbibición. Es probable que la señal con tiempo de retención ligeramente menor que el de Ribósido de Zeatina y que aparecen en algunos cromatogramas mostrados en las figs. 4.3-4.5 corresponda a cualquiera de los tres glucósidos de citocininas mostrados anteriormente.

Después de establecer que se detecta Ribósido de Zeatina por el método utilizado, junto con otra u otras citocininas y que en

la mayoría de los casos todas forman una sola señal en los cromatogramas obtenidos, se determinó el contenido de citocininas en semillas secas de los genotipos ya indicados tanto de almacenamiento prolongado como de semillas de cosecha reciente. Sólo se tomaron los datos en los cromatogramas que mostraban una señal. Para esto se utilizó Ribósido de Zeatina como estándar, obteniendo los resultados que a continuación se indican.

Tabla 4.1 Niveles de citocininas en el eje embrionario de maíz con almacenamiento prolongado (15-18 años) y de maíz de cosecha reciente (no almacenadas). Su utilizó Ribósido de Zeatina como estándar. Las citocininas se expresan en μgr de Ribósido de Zeatina/eje.

Tipo de Semilla	Mezquita1	Tuxpeño	Universal
No almacenadas	2.2 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3	2.8 \pm 0.4
Almacenadas	4.2 \pm 0.8	2.8 \pm 0.2	5.2 \pm 0.4

Por otro lado también se determinó el contenido de citocininas a diferentes tiempos de imbibición de las semillas con el objeto de establecer como varían dichas citocininas durante el proceso de germinación. Los resultados se muestran en la tabla 4.2 y la gráfica de los mismos en la figura 4.6.

Tabla 4.2 Niveles de citocininas en el eje embrionario de maiz a distintos tiempos de imbibición, tanto de almacenamiento prolongado como de cosecha reciente. Se utilizó Ribósido de Zeatina como estándar. Las citocininas se expresan en μg de Ribósido de Zeatina/eje. A = almacenado; NA = no almacenado.

Genotipo	Pob.	0	4	12	24
Mezquital	A	4.2 \pm 0.8	5.1 \pm 1	4.8 \pm 0.8	4.7
	NA	2.5 \pm 0.4	3.5	3.3	2.8
Tuxpeño	A	2.8 \pm 0.2	5.3	4.6	6.0
	NA	2.3 \pm 0.3	3.0	4.0	2.9
Universal	A	5.2 \pm 0.4	8.2	4.7	6.8
	NA	2.8 \pm 0.4	5.0	6.5	4.5

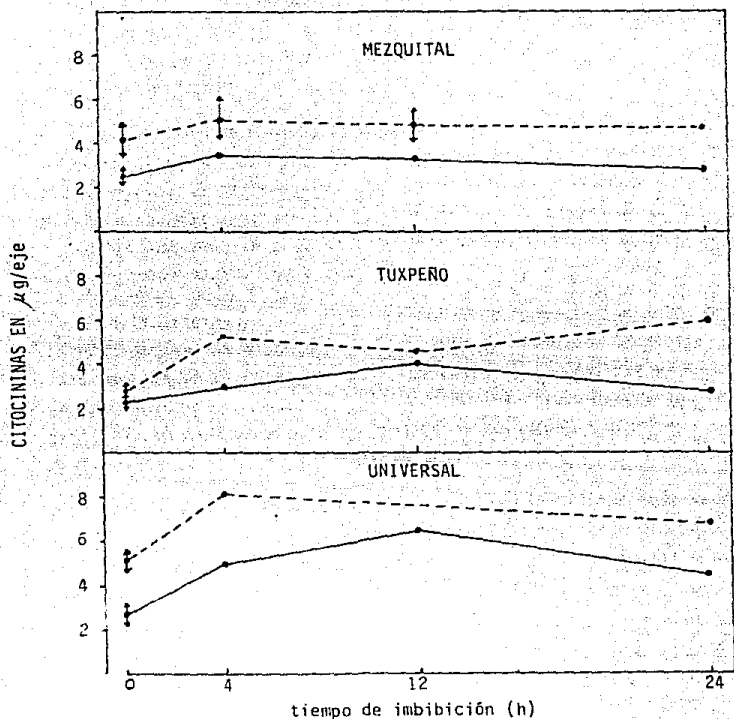


Fig. 4.6 Niveles de citocininas en el eje embrionario de varios genotipos de maíz, tanto de almacenamiento prolongado (---) como de cosecha reciente (—), a distintos tiempos de imbibición.

En la tabla 4.1 se puede observar que los ejes embrionarios de los genotipos de maíz con almacenamiento prolongado presentan un mayor contenido de citocininas que los mismos genotipos de maíz de cosecha reciente.

En la figura 4.6 se puede observar que existe un incremento de citocininas en los ejes embrionarios durante las primeras 24 horas de imbibición de semillas con almacenamiento prolongado en comparación con las semillas de cosechas reciente. Este incremento alcanza un máximo, observándose después una disminución gradual en casi la totalidad de los casos.

En la literatura no se encuentran datos sobre el contenido de citocininas en semillas con almacenamiento prolongado. Por esta razón se pueden proponer dos posibles causas para explicar el mayor contenido de citocininas observado en los ejes embrionarios de semillas con almacenamiento prolongado en relación al observado en semillas de cosecha reciente (tabla 4.1):

- Podría ser probable que el contenido de citocininas observado en semillas con almacenamiento prolongado se incremente por una hidrólisis del grupo fosfato de los ribótidos de citocininas, que se sabe existen en las semillas.¹⁷
- Otra posible causa del incremento de citocininas en los ejes embrionarios de semillas con almacenamiento prolongado pudiera ser la degradación natural de los ácidos nucleicos originado por envejecimiento de las semillas, fig. 4.7.

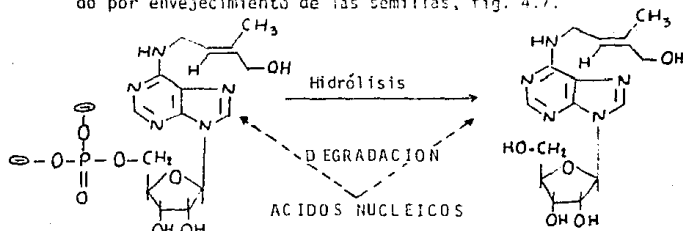


Fig.4.7 Hipótesis para explicar el incremento de citocininas en ejes embrionarios de semillas de maíz con almacenamiento prolongado.

Esta hipótesis se basa en resultados de investigaciones como las siguientes:

- Se han aislado citocininas por degradación natural del DNA almacenado por mucho tiempo,¹³ lo cual no es sorprendente puesto que las citocininas tienen una base de adenina, y ésta forma parte de los ácidos nucleicos.
- Se han encontrado citocininas en el RNAt de mamíferos, hongos y plantas.¹⁰
- En semillas almacenadas por mucho tiempo se observa, en sus ejes embrionarios, una destrucción de organelos como la mitocondria⁷ y una degradación de macromoléculas como los ácidos nucleicos,³¹ y paralelamente se ha observado que en ejes embrionarios de semillas no viables, como el centeno, se detecta una mayor actividad de DNAsas (enzimas que degradan el DNA).⁷

Sin embargo éstas posibles explicaciones requieren de una demostración experimental.

En la fig. 4.6 se observa que la concentración de citocininas de semillas con almacenamiento prolongado se mantienen más altas que las citocininas de semilla de cosecha reciente durante la imbibición. La mayor cantidad de citocininas en semillas con almacenamiento prolongado, respecto a semillas de cosecha reciente, no explica la poca viabilidad de aquellas semillas dado el papel biológico de las citocininas, pero sí podría explicarlo por degradación de ácidos nucleicos a causa del envejecimiento de las semillas.³¹

Si una semilla tiene degradadas macromoléculas como los ácidos

nucléicos, es muy probable que no germine aunque presente un alto contenido de citocininas.

En la fig. 4.6 también se observa un aumento de citocininas en general para todas las semillas durante las primeras horas de imbibición. Estos resultados parecen estar de acuerdo con los trabajos de Smith y Van Staden⁴⁹ en el que reportan un incremento de citocininas en el embrión del maíz durante la imbibición, principalmente de las citocininas más polares que Zeatina. Asa-Julintegelman⁴⁸ reportó que la actividad citocinética aumenta a las 4 horas de imbibición y posteriormente disminuye drásticamente en las semillas de maíz, fig. 2.8; los niveles de citocininas no necesariamente tienen que seguir este comportamiento en el eje embrionario. Smith y Van Staden^{49,50} sugieren que en la imbibición puede haber un transporte de glucósidos de citocininas desde el endospermo al embrión. Esto explicaría el aumento de citocininas en el eje embrionario.

Como se desprende de esta discusión, es necesario llevar a cabo más investigaciones para establecer la localización y cambios en los niveles endógenos de citocininas en semillas de maíz durante la germinación.

5. RESUMEN Y CONCLUSION

5. RESUMEN Y CONCLUSION

1. Se hizo una amplia revisión bibliográfica en los siguientes puntos:
 - a) Papel y cambios que presentan las fitohormonas, y en particular las citocininas, tanto en la maduración como en la germinación de semillas.
 - b) Almacenamiento y deterioro de semillas.
 - c) Análisis de citocininas.
2. Las citocininas fueron extraídas a partir de ejes embrionarios de semillas de maíz utilizando el método de Nishinari y Syono.⁵⁵ La determinación del contenido de citocininas se llevó a cabo a las 0, 4, 12 y 24 horas de imbibición. La purificación y cuantificación se realizó por HPLC utilizando Ribósido de Zeatina como estándar.

Se trabajó con los genotipos de maíz: Criollo del Mezquite; Tuxpeño Crema y Compuesto Universal, tanto de semillas con almacenamiento prolongado (15-18 años) como de semillas de cosecha reciente.
3. Con las condiciones experimentales utilizadas se pudo identificar Ribósido de Zeatina en los extractos de ejes embrionarios de los genotipos de maíz estudiados, sólo que al encontrarse en pequeñas proporciones muchas veces no alcanza a separarse o definirse de la(s) otra(s) citocinina(s) ligeramente más polar(es), apareciendo de ésta forma una sola señal en

la mayoría de los casos que incluye a todas ellas.

Para dar una explicación de las pequeñas cantidades de Ribósi do de Zeatina detectada, se propone que ésta se encuentra en alguna forma inactiva de almacenamiento en la semilla seca de maíz, por ejemplo, algún tipo de glucósido de citocinina.

4. Se determinó el contenido de citocininas en los ejes embrionarios de semillas secas para cada uno de los genotipos indicados. Los resultados muestran que los ejes embrionarios de los genotipos con almacenamiento prolongado presentan un mayor contenido de citocininas que los mismos genotipos de maíz de cosecha reciente. Estos resultados no explican la poca viabilidad de semillas con almacenamiento prolongado, dado el papel biológico de las citocininas.

La pérdida de viabilidad en semillas de maíz con almacenamiento prolongado, y por otro lado los inesperados mayores niveles de citocininas encontrados en sus ejes embrionarios pudieran explicarse proponiendo como hipótesis una degradación natural de ácidos nucleicos originados por el envejecimiento de las semillas.

5. Se determinó el contenido de citocininas a diferentes tiempos de imbibición. Los resultados muestran un incremento de citocininas en los ejes embrionarios tanto de semillas con almacenamiento prolongado como en las de cosecha reciente. Este incremento alcanza un máximo, observándose después una disminución gradual en casi la totalidad de los casos. Los niveles de citocininas en los ejes embrionarios de semillas con almacenamiento prolongado se mantienen más altos que en las co-

rrespondientes semillas de cosecha reciente durante las primeras 24 horas de imbibición.

6. Es importante llevar a cabo más investigaciones para establecer la localización y cambios en los niveles endógenos de citoquinas en semillas de maíz durante la germinación, principalmente utilizando métodos fisicoquímicos de análisis.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

1. Wareing, P.F. and Phillips, I. D. J. The Control of Growth and Differentiation Plants. Pags. 64-67. 3rd Edition. Pergamon Press, Great Britain (1981).
2. Went, F. W. Rev. Trav. Bot.; Neerland. 25, 1 (1920).
3. Meyer, S. B. Introduction Plant Physiology. Pág. 375. Do Van Nostrand Company, N. Y. (1973).
4. Naagen-Smit, A. J. Am. J. Botany. 33, 118 (1946).
5. Cohen, J. D. and Bardurski, R. S. Ann. Rev. of Plant Physiol. 33, 403-430 (1982).
6. Greulanch, V. A. y Adams, J. E. Las Plantas. Introducción a la Botánica Moderna. Pág. 408-417. Primera edición. Editorial Limusa. Méx. (1970).
7. Bewley, D. J. and Black, M. Seeds. Physiology of Development and Germination. Plenum Press. Pág. 2, 3, 70, 74-86, 89-110. N. Y. (1985).
8. Davies, D. D., Giovanelli, J. Rees, T. Bioquímica Vegetal. Pág. 358. Ediciones Omega España (1969).
9. Cross, B. E. and Norton, K. Tetrahedron Letters. 6003 (1966).
10. Mac Millan, J. Hormonal Regulation of Development. Vol. I.

Molecular Aspects of Plant Hormonal Regulation of Development.
Vol. I. Molecular Aspects of Plant Hormones. Pág. 48, 38-
47, 117, 125-128. Germ. (1980).

11. Davis, G. C. Hein, M. B. Neely, B. C. and Sharp, C. R. Analytical Chemistry. 57, #6, 638A (1985).
12. Skoog, F. Hamzi, H. Q. Szweykowska, A. M. Phytochemistry. 6, 1169 (1967).
13. Miller, C. O. Skoog, F. Okumura, F. S. Von Saltza, M. H. J. Am. Chem. Soc. 77, 2662 (1955).
14. Lehtam, D. S. Phytochem. 5, 269 (1966).
15. Letham, D. S. Phytochem. 12, 2445 (1973).
16. Summons, R. E. Entsch, B. Letham, D. S. Gollnow, B. I. Planta. 147 (5), 422 (1980).
17. Letham, D. S. Phytochemistry. 12, 2445-2455 (1973).
18. Sheldrake, A.R. Biol. Rev. 48, 509-559, (1973).
19. Letham, D. S. Goodwin, P. B. and Higgins, T. J. V. Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise. Elsevier North-Holland. Vol. 1. Pág. 238 (1978).
20. Short, K. C. and Torrey, J. G. Plant Physiol. 49, 155-160 (1972).

21. Short, K. C. and Torrey, J. G. J. Exp. Bot. 23, 1099-1105 (1972).
22. Kung-Woo Lee, P. Kessler, B. and Thimann, K. V. Physiol. Plant. 31, 11-14 (1974).
23. Beutelmann, P. Planta. 112, 181-190 (1973).
24. Bernal, L. H. Cuadernos de Posgrado 19. Fac. de Qufm., UNAM (1986).
25. Hall, R. H. Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 415-444 (1973).
26. Klemen, F. and Klambt, D. Physiol. Plant. 31, 186-188 (1974).
27. Mc Gaw, B. A. Phytochemistry. 24 (1), 9-13 (1985).
28. Brigg, R. W. Jones, L. R. Walbot, V. Annual Review of Plant Physiology. 34, 163-224 (1983).
29. Kenneth, V. Thimann. Senescence in Plants. CRC PRESS. Pág. 15-17 (1980).
30. Woodstock, L. W. Simkin, J. and Schroeder, E. Seed Sci. Technol. 4, 301-311 (1976).
31. Brocklehurst, P. A. Fraser, R. S. S. Planta. 148, 417-421 (1980).
32. Roberts, B. E. Biochem. J. 131, 275-286 (1973).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

33. Blowers, L. E. Stormonth, D. A. and Bray. C. M. *Planta*. 150, 19-25 (1980).
34. Osborne, Saron, R. and Ben-Ishai, R. *Isr. J. Bot.* 29, 259-272 (1980-81).
35. Villiers, T. A. *Plant Physiol.* 53, 875-878 (1974).
36. Vazquez, R. J. Cuadernos de Posgrado-11, 74-86; Fac. de Quím. UNAM (1984).
37. Euwens, C. J., Schwabe, W. W. J. *Exp. Bot.* 26, 1-14 (1975).
38. Davey, J. E., Van Staden, J. *Plant Physiol.* 63, 873-877 (1979).
39. Brenner, M. L. Burr, B. and Burr, F. *Plant Physiol.* 59, 5-76 (1977).
40. Wilkins, M. B. *Physiology of Plant Growth and Development*. Mc.Graw-Hill. Pág. 637 (1969).
41. Letham, D. S. Goddwin, P. B. and Higgins, T. J. V. *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise Elsevier North-Holland*. V. II, 372-377 (1978).
42. Khan, A. A. *Science*. 171, 853-859 (1971).
43. Khan, A. A. *Bot. Rev.* 41, 391-420 (1975).
44. Fountain, D. W. and Bewley, D. J. *Plant Physiol.* 58, 530-536 (1976).

45. Webb, D. P. Van Staden, J. and Wareing, P. F. J. exp. Bot. 24, #81, 741-50 (1973).
46. Khan, A. A. and Downing, R. D. Physiol. Plant. 21, 1301 (1968).
47. Khan, A. A. Plant Physiol, 43, 1463 (1968).
48. Asa Julin-Tegeľman. Plant Science Letters. 14, 259-262 (1979).
49. Smith, A. R. and Van Staden, J. J. Exp. Bot. 29, #112, 1067-1075 (1978).
50. Smith, A. R. and Van Staden, J. Chemical Abstracts. 91, 16807h (1979).
51. Mc Gaw, Brian, A. Phytochemistry. 24 (1), 9-13 (1985).
52. Dekhuijzen, H. M., Gevers, E. C. Physiol. Plant. 35, 297-302 (1975).
53. Bielski, R. L. Anal. Biochem. 9, 431-442 (1964).
54. Letham, D. S. Planta. 118, 361-364 (1974).
55. Nishinari, N. and Syono, K. Plant and Cell Physiol. 21, 1143 (1980).
56. Horgan, R. Analytical Procedures for Cytokinins. Cambridge: Cambridge Univ. Press. Págs. 97-113 (1978).

57. Fletcher, R. A. Fletcher R. A. Kallidumbil, V. Steele, P. Plant Physiol. 69, 675 (1982).
58. Weiler, E. W. and Spanier, K. Planta 153, 326 (1981).
59. Young, H. Anal. Biochem. 79, 226 (1977).
60. MacLeod, J. K. Summons, R. E. and Letham, D. S. J. Org. Chem. 41, #25, 3959 (1976).
61. Horgan, R. Prog. Phytochem. 7, 137 (1981).
62. Sánchez de Jiménez, E. Sepulveda G., Reynoso E., Molina G. J., Albores M. J. Exp. Bot. (enviado a publicación).
63. Rojas, E. E. Niveles de Citocininas en Maíz. TESIS, FAC. DE QUIMICA, UNAM (1986).
64. Camacho, F. E. Determinación de Reguladores de Crecimiento en Maíz. TESIS, FAC. DE QUIM. UNAM (1986).
65. Kannangara, T. Durley, R. C. and Simpson, G. M. Physiol. Plant. 44, 295 (1978).
66. Holland, J. A., McKerrell, E.H., Fueli, K.J. and Burrows, W.J. J. Chromatogr. 166, 545 (1978).
67. Ernsten, A. and Jensen, F. J. Liq. Chromatogr. 8 (2) 369-379 (1985).
68. Kannangara, T. Durley, R. C., Simpson, G. M. Physiol. Plant. 44, 295-99 (1978).