

35  
2º ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VARIACION EN EL CONTENIDO DE CITOCININAS LIBRES  
Y CONJUGADAS DURANTE LA GERMINACION DE MAIZ CON  
ALMACENAMIENTO PROLONGADO Y DE COSECHA RECIENTE.

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  
JULIO CESAR OLIVARES PARRA

1 9 9 2

**FALLA DE ORIGEN**



## **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

1.0	OBJETIVO.....	1
2.0	ANTECEDENTES	
2.1	IMPROTANCIA DE LAS SEMILLAS.....	2
	2.1.1 Fitohormonas.....	5
	2.1.2 Descubrimiento de las citocininas.....	6
	2.1.3 Citocininas en semillas de maiz.....	7
	2.1.4 Citocininas sintéticas.....	10
	2.1.5 Citocininas en el tRNA.....	11
	2.1.6 Efectos de las citocininas.....	13
	2.1.7 Metabolismo.....	14
2.2	ALMACENAMIENTO Y DETERIORO DE LAS SEMILLAS.....	20
2.3	LAS CITOCININAS EN EL DESARROLLO DE LA SEMILLA.....	26
2.4	FISIOLOGIA DE LA GERMINACION.....	27
	2.4.1 Concepto de latencia.....	27
	2.4.2 Escarificación.....	28
	2.4.3 Estratificación.....	30
	2.4.4 Inhibidores químicos de la germinación.....	30
	2.4.5 Demora en el desarrollo del embrión.....	31
	2.4.6 Viabilidad.....	32
2.5	GERMINACION.....	34
	2.5.1 Modelo Hormonal de Khan.....	37
2.6	ANALISIS DE CITOCININAS.....	41
	2.6.1 Extracción.....	41
	2.6.2 Purificación.....	44
	2.6.3 Identificación y cuantificación.....	44
2.7	TRABAJOS ANTECEDENTES A ESTE PROYECTO.....	47
3.0	PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
5.0	CONCLUSION.....	67
6.0	BIBLIOGRAFIA.....	68

## 1.0 OBJETIVO

## 1.0 OBJETIVO

En un trabajo previo, llevado a cabo en nuestro laboratorio, se encontró que los niveles de citocininas libres encontradas en semillas de maíz con almacenamiento prolongado (15 a 18 años) son más altos que los encontrados en semillas de cosecha reciente.

Por otra parte se ha observado que las semillas con almacenamiento prolongado han disminuido su viabilidad entre un 50 y 75%.

Se propone, como hipótesis de trabajo, que el mayor contenido de citocininas libres encontradas en las semillas con almacenamiento prolongado pudiera provenir ya sea de la hidrólisis de las citocininas conjugadas presentes en las semillas o de una degradación de los ácidos nucleicos.

El objetivo de este trabajo fue determinar los contenidos de citocininas libres y conjugadas en semillas de maíz a 0, 4, 12 y 24 hrs, de imbibición. Estas determinaciones se hicieron en el genotipo Tuxpeño crema, en dos poblaciones: una de cosecha reciente y otra con almacenamiento prolongado.

## 2.0 ANTECEDENTES

## 2.1 IMPORTANCIA DE LAS SEMILLAS

Las semillas son una forma de supervivencia de sus especies. Son el vehículo que sirve para que la vida embrionaria, casi suspendida, renueve su desarrollo aún años después de que sus progenitores han muerto y desaparecido.

Las semillas protegen y sostienen la vida. Son fortalezas altamente organizadas, bien equipadas con abastecimientos especiales de alimentos.

Las semillas son los vehículos principales para propagar una nueva vida en otro lugar, por medio de los elementos, como lo son los animales y el hombre.

Las semillas proporcionan también alimento a la humanidad, a los animales y a otros seres vivientes.

Son materia prima para gran cantidad de productos empleados por el hombre.

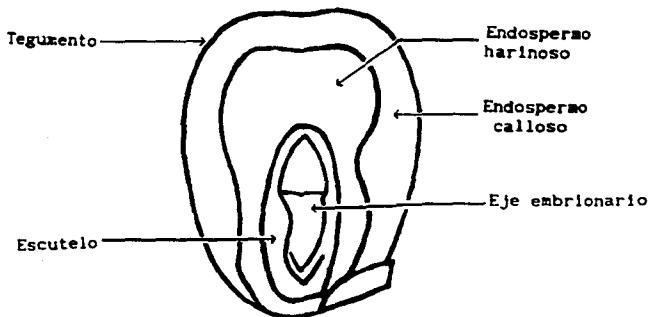
Las semillas son riqueza. Son bellas. Son un símbolo -el símbolo del nacimiento-. Son los mensajeros del auxilio, de la amistad, de la buena voluntad.

Las semillas son una fuente de maravillas. Son objeto de activas investigaciones en la incansable búsqueda del hombre para llegar a comprender las cosas vivientes.

Las semillas son muchas cosas, pero cualquier cosa de ellas -su número, estructuras y formas- tienen importancia para su principal objeto: asegurar la continuidad de la vida. Las semillas son el albergue de las plantas en embrión, los futuros gérmenes de una generación.

## ESTRUCTURA DE LA SEMILLA

Las semillas de muchas plantas varían en su tamaño, forma y color externo, estructura interna, en la cantidad y naturaleza del alimento almacenado. Sin embargo la mayoría de las semillas constan de las siguientes partes (ver la siguiente figura):



Partes principales de un grano de "Zea mays"

- tegumentos (Envoltura o envolturas de la semilla) { testa  
endopleura
- endospermo
- embrión { plúmula  
cotiledones  
hipocotilo  
rádícula



**Tegumentos:** Es la capa protectora de la semilla, habitualmente está formada por dos clase de tejidos superpuestos: la testa y la endopleura. La testa es la envoltura externa normalmente suele ser gruesa y resistente, constituyendo una eficiente capa protectora. La endopleura corresponde a la envoltura interna, esta es más delgada y menos resistente.

**Endospermo:** Es la parte de la semilla que almacena la mayor parte de las reservas alimenticias de la semilla y consta de dos tejidos principales, el endospermo almidonoso y la capa de aleurona; el primero consta de células muertas.

**Escutelo:** Organó del embrión en forma de escudo, que está desarrollado dentro de la semilla. El embrión absorbe los nutrimentos del escutelo, la mayor parte de la cual es a su vez obtenido del endospermo, sirve para conectar el eje embrionario con el endospermo.

**Embrión:** Es la parte fundamental de la semilla, consta de una serie de partes que formarán los órganos correspondientes en la planta adulta.

Las partes constituyentes del embrión son las siguientes:

1. La plúmula-un tallo rudimentario.
2. Los cotiledones-hojas de las semillas (a veces sólo uno).
3. El hipocotilo-parte del embrión entre la unión de los cotiledones y el extremo superior de la raíz rudimentaria; muy corta en algunas semillas.
4. La radícula- raíz rudimentaria.

### 2.1.1 FITOHORMONAS

Las fitohormonas se consideran generalmente como sustancias producidas en pequeñas cantidades en una parte del organismo y transportados a otra parte del mismo donde ejercen marcados efectos sobre el metabolismo y el crecimiento. A diferencia de las hormonas animales, las vegetales no se producen en glandulas cerradas especiales. Tanto las hormonas animales como las vegetales actúan a concentraciones muy bajas. Por esto, se puede decir que cualquier sustancia que actúa a una concentración tan baja es probable que estén actuando de manera catalítica.

El crecimiento de una planta es un proceso muy complejo y ordenado. Estos procesos de crecimiento están controlados principalmente por hormonas vegetales o fitohormonas.

Las fitohormonas se dividen en dos grandes grupos:

Inhibidores del crecimiento	{	ácido abscísico
Reguladores del crecimiento	{	auxinas giberelinas etileno citocininas

En este trabajo unicamente se trataran las citocininas.

### 2.1.2 DESCUBRIMIENTO DE LAS CITOCININAS

Las citocininas fueron descubiertas como resultado de un extenso trabajo en cultivos de tejidos vegetales, llevado a cabo por Skoog en el periodo de 1945 a 1955. Las citocininas se caracterizan por su habilidad para promover la división celular en cultivos vegetales cuando interactúan con una auxina. Para que se lleve a cabo el fenómeno de crecimiento no sólo es necesario la presencia de nutrientes en el medio de cultivo sino que también son necesarias sustancias promotoras del crecimiento.

La idea de que la división celular en vegetales superiores puede controlarse por medio de sustancias químicas, fue propuesto por Wiesner en 1892, hipótesis que fue probada en 1913 por Heberlandt en estudios realizados sobre la parénquima de la papa.<sup>(Davis 1985)</sup> Trabajando Skoog con tejidos de tabaco se percató de la presencia de una sustancia que regula la división celular, demostrando que esta no se lleva a cabo si dicha sustancia está ausente.<sup>(Skoog 1967)</sup> Las sustancias promotoras de la división celular fueron también encontradas en el agua de coco, en los extractos de levaduras, y en el DNA sometido a un tratamiento en autoclave.

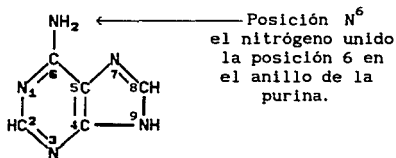
El primer compuesto activo aislado de una fuente natural fue llevado a cabo por Miller a la cual le llamó cinetina, a partir de la degradación del DNA del esperma del arenque sometido por mucho tiempo al autoclave.<sup>(Miller 1955)</sup> A este compuesto se le identificó como la 6-(furfuril amino purina). Esta sustancia induce la división celular cuando está presente en el medio de cultivo a una concentración de 1mg/ml.

Sin embargo, la cinetina no se encuentra en vegetales por lo que es considerada como una citocinina no natural.

Se han encontrado varias sustancias con actividad biológica similar distribuidas en plantas. A estas sustancias inicialmente se les denominaron cininas pero este nombre se sustituyó por el de citocinina. La definición de este término es más fisiológico que químico. El término citocinina fue sugerido por Skoog en 1965 y ahora es generalmente aceptado para describir compuestos que promueven la división celular (CITOCINESIS) en plantas. (McMillan 1980)

#### ESTRUCTURA QUIMICA

Las citocininas son sustancias que tienen en su estructura una base nitrógenada derivada de la purina: la ADENINA, una de las cinco bases nitrógenadas que componen la moléculas de los ácidos nucleicos DNA y RNA (Hill 1973) y un radical unido en la posición N<sup>6</sup> (6-amino derivado) de la purina.



#### 2.1.3 CITOCININAS EN SEMILLAS DE MAIZ

A pesar de conocer la presencia de las citocininas en los tejidos de las plantas, el primer aislamiento e identificación de una citocinina natural de fuentes vegetales se llevó a cabo por D.S. Letham de la Fruit Research Division, de Auckland, Nueva Zelanda y a C.O. Miller de la

universidad de Indiana, en el año de 1963, -nueve años después de haber sido aislada la cinetina. Esta prolongada espera se debió a las complicadas técnicas de purificación de pequeñísimas cantidades de compuestos activos biologicamente a partir de grandes cantidades de materiales vegetales, y a la determinación de su estructura con métodos físicos de limitada sensibilidad-. En este mismo año D.S.Letham presentó un reporte en un simposium en donde dio a conocer el aislamiento de una citocinina natural a partir de semillas de maíz tierno (*Zea mays*), a la cual la nombró "ZEATINA". Posteriormente Letham et al, en 1964 reportaron muchas propiedades de la zeatina y su estructura más probable, la 6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino)purina, una estructura rápidamente confirmada por Show y Wilson en 1964. En reportes posteriores de Miller en colaboración con Letham en 1965 concluyen que, la sustancia aislada por Miller era también la zeatina y desde ese entonces han sido reportadas el aislamiento de la zeatina, su ribósido y ribonucleótido a partir de muchas fuentes naturales.

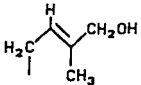
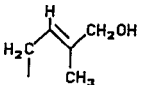
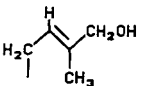
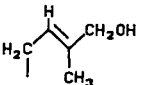
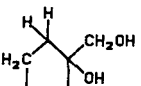
En realidad, en 1968 Letham identificó el ribósido de zeatina (9- $\beta$ -D-ribófuranosil de zeatina) como la sustancia promotora activa de la división celular en el agua de coco. En 1973 él identifica ribósido de zeatina 5'-monofosfato y algunas otras citocininas de la misma fuente.

En 1980 Summons y colaboradores aislaron de las semillas de maíz los glucopiranosidos y ribofuranosidos de citocininas.<sup>(Summons 1980)</sup>

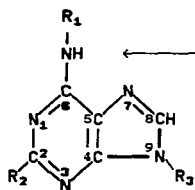
En la tabla 2.1.3. se ilustran todas las citocininas aisladas a partir de semillas de maíz (*Zea mays*).

Tabla 2.1.3.

CITOCININAS ENCONTRADAS EN SEMILLAS DE MAIZ

Citocinina		Sustituyente de la adenina <sup>a</sup>		
NOMBRE QUIMICO	NOMBRE ABREVIADO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
6-(4-Hidroxi-3-metil trans-2-butenilamino purina	Zeatina (Z)		H	H
6-(4-Hidroxi-3-metil trans-2-butenilamino 9-β-D-ribófuranosil purina	Ribósido de Zeatina (ZR)		H	H
6-(4-Hidroxi-3-metil trans-2-butenilamino 9-(β-D-ribófuranosil 5'-monofosfato) purina	Fosforibósido de Zeatina (ZRP)		H	β-D-R <sub>r</sub> <sup>d</sup> S'-[P]
2-Hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino) purina	HO <sup>2</sup> Z		OH	H
6-(3,4-Dihidroxi-3-metilbutilamino) purina	HOZ		H	H

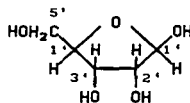
<sup>a</sup> Numeración de la Adenina.



Posición N° 6  
el nitrógeno unido  
la posición 6 en  
el anillo de la  
purina.

<sup>b</sup> Nombre común o nombre abreviado

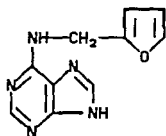
<sup>d</sup> β-D-ribófuranosil.



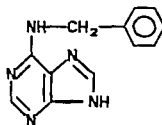
#### 2.1.4 CITOCININAS SINTETICAS

Poco después del descubrimiento de la cinetina, varios grupos de investigadores sintetizaron un gran número de compuestos análogos, probando su actividad citocinética. Como resultado de estos trabajos, se han encontrado innumerables compuestos con propiedades de inducir la división celular, tales como los que se muestran a continuación:

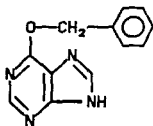
Figura. 2.1.4



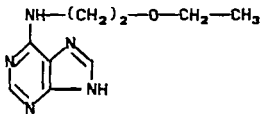
**CINETINA**  
(6-FURFURIL-AMINO-PURINA)



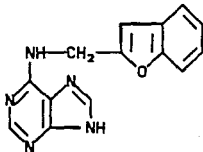
**N-BENZILADENINA**



**6-BENZIL-OXI-PURINA**



**ETOXIETIL-ADENINA**



**BENZOFURFURIL-AMINO-PURINA**

### 2.1.5 CITOCININAS EN EL tRNA

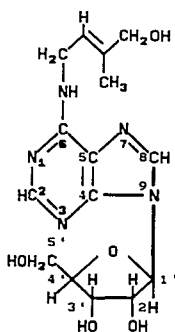
En el año de 1966 la investigación sobre citocininas tomó un interesante rumbo cuando H.G.Zachau y sus colaboradores, identificaron a la  $i^6Ad$  como constituyente de dos especies de  $tRNA^{Ser}$  de levaduras. Posteriormente se observó que la  $i^6Ad$  aparece sólo una vez en las moléculas del  $tRNA^{Ser}$ , situada en la posición adyacente al extremo 3' del anticodón. Después Skoog identificó cuatro citocininas: es decir el ZR,  $i^6Ad$ ,  $MeS^2i^6AdR$  y la  $MeS^2ZR$ , (fig 2.1.5.) en una variedad específica de tRNA. Posteriormente se encontró que las citocininas no están presentes en todas las especies de tRNA que responden al codón del mRNA con la letra inicial U.

Es interesante observar que la distribución de las citocininas a partir de las diferentes fuentes y especies de tRNAs: sólo la  $i^6AdR$  ha sido encontrada en los tRNAs de los animales: la  $i^6AdR$  y la  $MeS^2i^6AdR$  han sido encontradas en los tRNAs de las bacterias; los derivados hidróxilados de la  $i^6AdR$  peculiarmente parecen estar en los tRNAs de las plantas con la única excepción de tener la configuración *cis*.

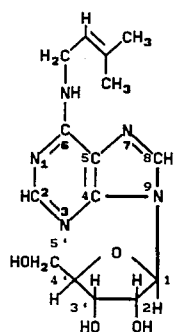
\*ver la tabla 2.1.3 y la figura 2.1.5 para nomenclatura observada de las citocininas.



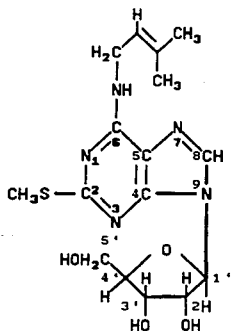
Figura. 2.1.5.



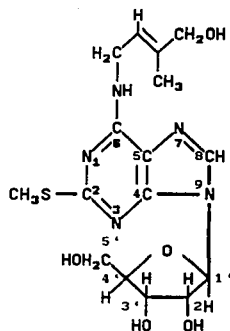
Ribósido de zeatina  
(ZR)



$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)  
adenosina ( $i^6$ Ad)



2-Metiltio- $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)  
adenosina ( $MeS^2i^6AdR$ )



2-Metiltio-cis-ribósilzeatina  
( $MeS^2ZR$ )

### 2.1.6 EFECTOS DE LAS CITOCININAS

Los efectos de las citocininas se pueden dividir en dos grandes grupos.

- 1) Promoción y diferenciación de la división celular.
- ii) Retardación de los procesos de la senescencia.

El efecto de las citocininas dentro de la promoción de la división celular, fue observada por primera vez en cultivos de tejidos vegetales y esta es la base fundamental de la definición de las citocininas. Con respecto a este efecto específico, a la fecha está bien establecido que actúa como un disparador de la mitosis.

Las citocininas también juegan un importante papel en la organogénesis y en la diferenciación celular dentro de los cultivos de los tejidos vegetales. Estos efectos dependen de la concentración relativa del IAA y GA<sub>3</sub>. Los siguientes resultados en el crecimiento de los callos de tabaco a varias concentraciones de citocininas, IAA y GA<sub>3</sub>, es un ejemplo representativo de esto.

- I) sin fitohormonas - poco crecimiento.
- II) únicamente IAA - crecimiento sin diferenciación celular.
- III) únicamente citocininas - crecimiento sin diferenciación celular.
- IV) citocininas y IAA - crecimiento y diferenciación celular.
- V) con una relación de [citocininas]/[IAA] baja - crecimiento y diferenciación celular principalmente en las raíces.
- VI) con una relación de [citocininas]/[IAA] alta - crecimiento y diferenciación principalmente en los brotes y las hojas.
- VII) con una relación de [citocininas]/[GA<sub>3</sub>] baja - crecimiento y diferenciación en plantas de tallo delgado, etioladas, con hojas angostas.

Otros de los efectos que pueden incluirse dentro de la categoría de la diferenciación celular son:

- i) La promoción de la germinación de algunas semillas.
- ii) La promoción y desarrollo de los brotes.

## 2.1.7 METABOLISMO DE CITOCININAS

### ANABOLISMO

Las citocininas se encuentran dentro de la planta tanto en forma libre como formando parte del tRNA. La pregunta que inmediatamente surge es la siguiente ¿Estas dos formas se sintetizan por dos rutas independientes o una forma se deriva de la otra?. A pesar de la poca información a cerca de la biosíntesis de citocininas la respuesta a esta pregunta es clara. En las plantas que están en crecimiento las citocininas libres y las que forman parte del tRNA surgen por caminos o rutas independientes.

En estudios con sistemas vegetales libres de células se ha observado que la cadena lateral de  $\Delta^2$ -isopentenilo se transfiere a la adenina adyacente al extremo 3' del anticodón del tRNA a nivel macromolecular, ya que se encontró que el tRNA tratado con permanganato bajo condiciones suaves libera específicamente al residuo  $\Delta^2$ -isopentenilo de la  $i^6Ad$ , dejando libre a la adenina.

Cuando el tRNA tratado de esta manera se incubó con preparaciones libres de células en presencia de ácido mevalónico marcado se produjo isopentenil adenina marcada en el tRNA.

Por otro lado existen buenas evidencias de que la adenina marcada es convertida, por tejidos vegetales, a citocininas libres marcadas. (Beutelmann 1973) Así, en el cultivo de tejidos de la Vinca rosea se forman, a partir del  $C^{14}$ -ribótido de Zeatina,  $C^{14}$ -adenina y posteriormente aparecen el  $C^{14}$ -ribósido de Zeatina,  $C^{14}$ -Zeatina y los glucósidos de  $C^{14}$ -Zeatina. Otras citocininas que han sido aisladas del tRNA hidrolizados y probablemente también se encuentran adyacentes al

extremo 3' del anticodón son: (*cis*) Z y algunas veces el isómero *trans*; (*cis*) [2(MeS)Z] y el isómero *trans*.

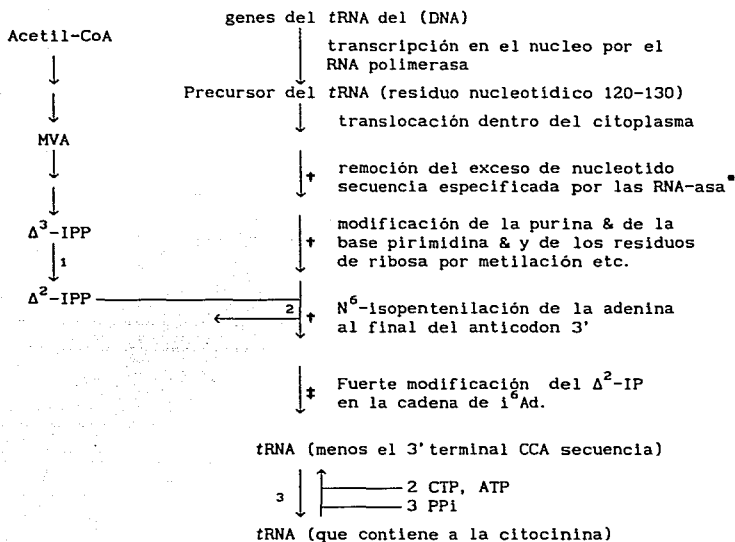
La evidencia de que las citocininas libres en plantas nuevas no se forman por la hidrólisis del tRNA a niveles de mononucleótidos es muy fuerte. Dos ejemplos notables son: (i) las citocininas de tejidos autótrofos contienen citocininas, pero tales tejidos no crecerán en un medio libre de citocininas, por lo que no producen cantidades fisiológicamente significantes de citocininas por el rompimiento del tRNA. (ii) las citocininas del tRNA tales como  $\text{Me}^2\text{i}^6\text{AdR}$ ,  $\text{MeS}^2\text{ZR}$  y el isómero *cis* de la ZR nunca ha sido encontrado en plantas en forma libre. Sin embargo es posible que las citocininas puedan ser liberadas del tRNA de las células vegetales muertas. (Goodwin 1983)

La ruta a través de la cual se sintetizan las citocininas en las plantas es aún desconocida, aunque una de las rutas propuestas es la siguiente: Parece ser probable que un residuo de  $\Delta^2$ -isopentenilo derivado del ácido mevalónico se transfiera al  $\text{N}^6$  de la adenosina o de la adenosina 5'-monofosfato y que a esto se le modifique por una *trans*-hidroxilación de un grupo metilo en el C-3 y/o reducción del doble enlace  $\Delta^2$  (ver la figura 2.1.7.1).

El principal sitio de la biosíntesis de las citocininas libres en las plantas parecen estar en las puntas de las raíces, y de aquí probablemente se distribuyen al resto de la planta por medio de la savia. Las citocininas libres también se sintetizan dentro de los brotes desarrollados, en las semillas y en eje embrionario de las semillas en germinación.



Figura. 2.1.7.2.



Probable ruta para la biosíntesis del tRNA del citoplasma de las citocininas en las células vegetales (una ruta similar probablemente ocurre en el estoma del cloroplasto y la mitocondria para la biosíntesis del tRNA cloroplastico y mitocondrial).

- 1 = isopentenil difosfatasa  $\Delta$ -isomerasa
- 2 = isopenteniltransferasa
- 3 = tRNA citidiltransferasa
- = Algún arreglo de tRNA posiblemente ocurra en el nucleoplasma

- † = este no necesariamente ocurre en este orden
- ‡ = esto paso no ocurre en la formación del i<sup>6</sup>Ad-tRNAs.

## CATABOLISMO

Las investigaciones llevadas a cabo por Summons y sus colaboradores sobre las semillas de maíz demuestran que los productos de degradación de las citocininas principalmente son adenina y ribótido de adenina, que son utilizados en otras rutas metabólicas. Algunas de las citocininas degradadas son transformadas a O-glucósidos de dihidrozeatina y adenosina. (Summons 1980)

Un caso es el siguiente: la principal vía metabólica para transformar el exceso de citocininas exógenas consiste en romper la cadena lateral de las citocininas. Los compuestos de degradación aunados a las pequeñas cantidades de citocininas reducidas y glucosiladas en la cadena lateral son formas que reducen la actividad citocinética. (Mc Graw 1985)

El significado funcional de los metabolitos de las citocininas pueden ser los siguientes:

a) Formas activas de las citocininas.

En medio de un gran número de compuestos que promueven la división celular y el crecimiento del tejido en la planta (actividad citocinética), los compuestos de adenina sustituidos en el nitrógeno seis ( $N^6$ ) son los más activos seguidos por sus correspondientes ribonucleósidos y después por los compuestos encontrados en el tRNA.

b) Formas de almacenamiento.

Las citocininas enlazadas a glucosa son liberadas cuando se requieren en la división celular. Hay evidencias de que las citocininas O-glucosiladas conjugadas pueden formarse durante el almacenamiento. (Summons 1980)

c) Productos de detoxificación.

Los productos de detoxificación son formados a causa de los niveles altos de citocininas exógenas que son perjudiciales, ya que a altas concentraciones estos compuestos actúan como herbicidas.

d) Productos de inactivación.

Los productos de inactivación como los O-glucósidos se han encontrado en semillas y en hojas maduras, también se han observado citocininas conjugadas con glucosa unida en las posiciones 3, 7 o 9 del anillo purínico, hallándose que las citocininas que tienen el glucósido unido a las posiciones 7 o 9 del anillo purínico son citocininas mucho menos activas que las citocininas libres no glucosiladas. Los nucleótidos de citocininas son esenciales en el metabolismo de citocininas, ya que estos son los productos iniciales para la biosíntesis de citocininas, y que en muchos tejidos es el primer metabolito formado en cantidades apreciables a partir de las citocininas exógenas.



## 2.2 ALMACENAMIENTO Y DETERIORO DE LAS SEMILLAS

Existe una polémica sobre las afirmaciones de que algunos tipos de semillas permanecen viables por muchos cientos o miles de años. En la tabla 2.2 se presentan algunas de las más espectaculares afirmaciones al respecto.

Tabla 2.2.

Especie	Localización	Edad	Estado de la semilla
Almacenamiento en seco			
Cebada	Tumba del Rey Tutankamen	1350 años a.c.	No viable
Trigo	Varias tumbas antiguas egipcias	1000 años a.c.	No conocida
Trigo	Tebas	3000-2000 años	No viable
Canna Compacta	Santa Rosa de Tastel Argentina	600 años	viable
Cassia Mutejeiga	Museo de historia natural, Paris	158 años	viable
Loto Indú	Kemigawa, cerca de Tokio	3000 años	viable

Quizá el mito más persistente con respecto a la longevidad de las semillas es la historia de los granos viables de trigo y de la cebada que fueron encontrados en las excavaciones arqueológicas de las construcciones del antiguo Egipto, en la tumba de Tutankamen. Durante los siglos XIX y parte del siglo XX le fue dada mucha credibilidad y publicidad a los reportes de los granos hallados en la tumba sobre su

supuesta germinación. Sin embargo, en recientes y rigurosos estudios científicos, se demostró claramente que los granos muy antiguos sufren degradaciones morfológicas y fisiológicas incluyendo la carbonización. Esto afecta particularmente al embrión y se ve acompañado con una baja viabilidad.

Una de las afirmaciones sobre la longevidad de las semillas que se refiere a la Lupina del artico (*Lupinus articus*), semillas que fueron descubiertas congeladas y sepultadas en el Yukon del Canada. Estas semillas antiquísimas supuestamente fueron llevadas a ese sitio por roedores, ya que en el mismo lugar se encontraron vestigios de madriguera, material fecal y esqueletos de los roedores, aunque aún esta a discusión.

Otra afirmación sobre la longevidad de las semillas se refiere a la *Nelumbium nucifera* (1000-300 años) y la *Chenopodium album* y la *Spergula arvensis* (aprox. 1700 años) las cuales se consideran con cierto excepticismo.

Un record sobre las semillas vivientes más antiguas son probablemente las de *Canna* encontradas en las tumbas Pre-Inca de Santa Rosa de Tastel en Argentina con una edad aproximada de  $620 \pm 60$  años, determinada con carbono 14. Estas semillas fueron germinadas en 1968, pero su crecimiento fue lento y difícil, mostrando la raíz problemas geotrópicos anormales, síntomas típicos de las semillas con almacenamiento prolongado. Esta planta y sus descendientes sobreviven hasta la fecha en el departamento de Botánica de la Universidad de la Plata en Argentina. (Kennet 1980)

## FACTORES QUE INCREMENTAN LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DURANTE SU ALMACENAMIENTO

Las condiciones de almacenamiento que mantienen la viabilidad de las semillas son aquellos que hacen más lentos la respiración y otros procesos metabólicos sin dañar al embrión, las condiciones más importantes para esto son las siguientes:

### Contenido de humedad.

Las semillas se pueden clasificar por su contenido de humedad en recalcitrantes y ortodoxas:

Las recalcitrantes son aquellas semillas que retienen un contenido relativamente alto de humedad durante su almacenamiento para así tener una máxima viabilidad. Muchas clases de semillas de vida corta pierden su viabilidad si el contenido de humedad disminuye. Por ejemplo, si el contenido de humedad de las semillas al madurar en primavera fue del 58%, la viabilidad se perdió cuando el contenido de humedad se redujo por debajo del 30 al 34%. Un ejemplo son las semillas de los cítricos que sólo pueden resistir un secado ligero. Lo mismo ocurre con las semillas de algunas plantas acuáticas tales como el arroz silvestre que pueden almacenarse directamente en agua a bajas temperaturas. Las semillas grandes y carnosas de los encinos, por ejemplo, el nogal americano pierde su viabilidad si se deja secar después de que han madurado, de manera normal se les puede almacenar húmedas por no más de un año.

Por otro lado el segundo tipo de semillas son las ortodoxas que para su almacenamiento requieren de un bajo contenido de humedad para

así tener una máxima viabilidad. Cuando el contenido de humedad se encuentra entre el 18 o el 30% las semillas se deterioran por los microorganismos presentes; cuando se encuentran abajo del 9 o del 8% de humedad, hay una poca o nula actividad de los insectos, pero si se tiene un contenido de humedad del 4 o del 6% es favorable para un almacenamiento prolongado. Si el contenido de humedad es menor del 4% las semillas son inmunes al ataque de los hongos, a la microflora y a las plagas que pueden perjudicarlos. Sin embargo si el contenido de humedad de las semillas es bajo, entre el 1 o el 2%, en algunas semillas pueden registrarse pérdida de viabilidad y reducción en la tasa de germinación. También algunas semillas pueden almacenarse a esos niveles bajos de humedad pero deben de rehidratarse con vapor de agua antes de sembrarlas.

La longevidad de las semillas es máxima si se les almacena en un intervalo de humedad relativa del 20 al 25%. Las variaciones del contenido de humedad en las semillas durante su almacenamiento reducen su longevidad.

En consecuencia, la posibilidad de almacenar con éxito semillas expuestas en una atmósfera abierta varía mucho en las diferentes áreas climatológicas. Los climas secos conducen a la longevidad, mientras que en áreas con alta humedad relativa, la vida de las semillas es más corta.

En las regiones tropicales es muy difícil mantener la viabilidad de las semillas en almacenamiento abierto.

### Temperatura

La temperatura reducida de manera invariable prolonga la vida de almacén de las semillas y, en general, puede contrarrestar el efecto adverso de un contenido elevado de humedad. Harrington ha proporcionado dos reglas prácticas: <sup>(Harrington 1972)</sup>

a) Para semillas que no se ven afectadas en forma adversa por condiciones bajas de humedad, cada descenso del uno por ciento en el contenido de humedad de la semilla entre, el 5 y el 14%, duplica la vida de la misma. b) Cada disminución de 5°C entre 0°C y 44.5°C en la temperatura de almacenamiento también duplica la vida de almacen. Por otra parte, cuando las semillas son almacenadas a baja temperatura pero con una humedad relativa elevada, pueden perder la viabilidad con rapidez cuando se cambian a una temperatura más alta. Las temperaturas inferiores a la congelación cuando menos hasta de -18°C, aumenta la vida de almacén de la mayoría de las clases de semillas pero su contenido de humedad debe estar en equilibrio con una humedad relativa del 70% o menos, o de lo contrario el agua libre de las semillas puede congelarse y ocasionar daños. El almacenamiento con refrigeración debe combinarse con la deshumectación o el sellado de las semillas secas en recipientes a pruebas de humedad.

### Atmosfera de almacenamiento

Se ha intentado modificar la atmósfera de almacenamiento a fin de aumentar la longevidad de varias semillas de vida corta. Los procedimientos para cambiar la atmósfera son crear un vacío, aumentar el contenido de dióxido de carbono o reemplazar el oxígeno por el nitrógeno

u otros gases. Por medio de este método no se han logrado muchos beneficios en el almacenamiento de semillas pero se ha conseguido prolongar la longevidad de algunas semillas de vida corta en algunas plantas tropicales.

### 2.3 LAS CITOCININAS EN EL DESARROLLO DE LA SEMILLA

Como se ha mencionado anteriormente, las citocininas en el maíz se encuentran tanto en forma libre bases (libres y glucósidos), como en forma enlazada (ribótidos). Respecto al sitio de la planta en que se sintetizan las citocininas, aún quedan muchas incógnitas, pero se sabe que la actividad citocinética se incrementa marcadamente durante el desarrollo de la semilla y decrece con la maduración. Este comportamiento es consistente con el papel desempeñado por las citocininas en el control del crecimiento de la semillas, (Davey 1979) según la fig. 2.3.

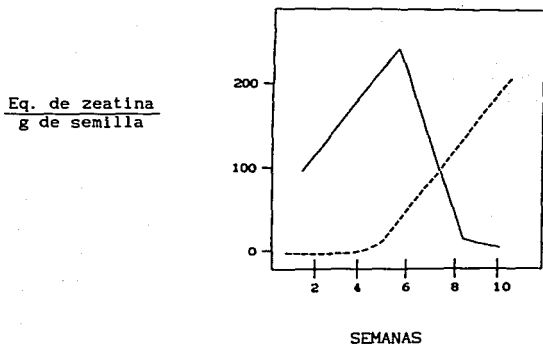


Fig. 2.3 Citocininas en el desarrollo de semillas de *Lupinus albus*; citocininas (-); crecimiento de la semilla en peso fresco (--).

Estas evidencias muestran una relación entre las fitohormonas y el crecimiento del embrión. Durante el crecimiento de la semilla hay un incremento de giberelinas activas. El periodo de división y agrandamiento celular en el embrión y en el 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 embriogénico puede ocurrir en presencia del ABA, pero el crecimiento germinativo no es posible.

Puede ser que la función del ABA sea el de prevenir que el embrión pase directamente de la embriogénesis a la germinación. Esto implica la necesidad de un periodo de senescencia sobre el embrión.

## **2.4 FISILOGIA DE LA GERMINACION**

### **2.4.1 CONCEPTO DE LATENCIA**

Todas las semillas requieren de condiciones adecuadas de humedad y temperatura para su germinación y el crecimiento subsecuente de la plántula. Hasta que estas condiciones no sean alcanzadas, la semilla permanecerá quiescente, desarrollando un nivel muy bajo de metabolismo y permaneciendo viva, pero no permitirá cambios metabólicos que en último término conducirán a la división celular, crecimiento y emergencia del embrión. Otras semillas son aún más restrictivas en sus requisitos para su germinación. Algunas de ellas pueden necesitar condiciones o tratamientos especiales de luz, algunas de ellas requieren de la ruptura de la cubierta de la semilla, otras requieren de tratamientos



específicos de temperatura y otras más requieren de una cierta penetración de cantidades relativamente grandes de agua para la remoción de inhibidores químicos. Se dice que las semillas con estas necesidades especiales (además de suficiente humedad y temperatura apropiada) permanecen latentes hasta que se llenen estas necesidades. Las semillas que requieren solamente de humedad y temperatura apropiada, se dice que están quiescentes (pero no latentes) antes de la germinación.

Se dice que una semilla está latente cuando su germinación está impedida por sus propios mecanismos internos. Si la semilla es capaz de germinar de inmediato cuando esta es expuesta a condiciones adecuadas de temperatura, se dice que está quiescente o no latente.

La diferencia entre estos dos tipos de semillas estriba en que los primeros el control de la germinación se debe a mecanismos internos de la semilla, y en la segunda a factores ambientales externos.

#### **2.4.2 ESCARIFICACION**

En muchas semillas, la germinación no se inicia hasta que se rompe la cubierta de la semilla. Este proceso se llama escarificación. La dura cubierta de la semilla puede servir para mantener al agua o al oxígeno fuera de la semilla, o en pocos casos puede ser tan dura que mantiene encerrado al embrión. Muchas semillas tienen esta característica, incluyendo a ciertas legumbres y malvas. La escarificación puede llevarse a cabo experimentalmente meliando o raspando las semillas con una navaja, o tratándolas con ácido sulfúrico o con solventes orgánicos (los cuales aparentemente disuelven ciertas sustancias grasas las cuales mantendrían fuera al agua), o aún hirviéndolas por corto tiempo.

En la naturaleza, la necesidad de escarificación es de valor obvio. Si una semilla tiene que ser escarificada no puede germinar cuando se desprende de la planta progenitora; tiene que esperar hasta que las fuerzas de la naturaleza hayan tenido tiempo de romper la cubierta de la semilla. De aquí que la germinación no se efectúe en el otoño, sino solamente en la primavera siguiente, después que ha ocurrido la escarificación y cuando las temperaturas son favorables.

La escarificación en la naturaleza se lleva a efecto por varias fuerzas. Un cierto árbol de los desiertos del suroeste de los Estados Unidos germina solamente después de que las semillas han sido arrastradas por las barrancas del desierto seco por un chaparrón. Si son arrastradas demasiado lejos por la corriente, se fragmentarán, y si no son arrastradas lo suficiente, la escarificación será incompleta y no germinarán. A menudo se pueden encontrar varios árboles de este tipo a unos trescientos metros más abajo que los árboles progenitores a la entrada de la barranca. Un chaparrón suficientemente grande arrastra a las semillas a esa distancia y le suministra al suelo suficiente humedad para el crecimiento subsecuente de las plántulas.

En algunos casos las aves pueden efectuar este proceso de escarificación al pasar las semillas por su tracto digestivo, y en pocos casos, tales como el chaparral frecuentemente incendiado de los climas mediterraneos, el fuego es necesario para romper la cubierta de la semilla, asegurando la germinación rápida de muchas semillas tan pronto como haya suficiente humedad después de un incendio. Más comunmente, la escarificación se logra por los procesos normales de la descomposición.

#### 2.4.3 ESTRATIFICACION

Algunas semillas, incluyendo muchas rosáceas, requieren de un prolongado periodo de frío antes de que germinen. Esta característica también es de obvio valor de supervivencia, ya que dichas semillas no germinarán en el otoño sino hasta la primavera siguiente. Mientras están en condiciones húmedas, deben ser tratadas con bajas temperaturas de ( $0^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}$ ), comunmente por un periodo de meses. En la práctica hortícola, se dejan al exterior durante el invierno en capas conteniendo las semillas húmedas, o pueden colocarse en un cuarto de almacenamiento frío. Este proceso se llama estratificación.

Los mecanismos de latencia, tales como la necesidad de frío o de escarificación, prolongan el periodo previo a la germinación, y entonces se dice que la semilla está pasando por una sobremaduración durante este periodo. La necesidad del frío puede ser una adición a la necesidad de escarificación o concebible aún para condiciones particulares de luz y otras condiciones ambientales. (Salisbury 1968)

#### 2.4.4. INHIBIDORES QUIMICOS DE LA GERMINACION

Las semillas de tomate, melón o naranja germinan fácilmente cuando son plantadas en el suelo. Dentro de los frutos mismos, las semillas estan sujetas a humedad y temperatura ideales y uno puede preguntarse, ¿Por que no germinan? (muchos de nosotros hemos observado ocasionalmente una semilla de naranja en germinación dentro del fruto, pero estos casos son relativamente raros). Puede demostrarse que estas semillas permanecen latentes en respuesta a sustancias químicas presentes en los frutos mismos.

Se conocen también otros ejemplos de inhibidores de la germinación. Muchas semillas no germinan hasta que no han sido embebidas extensivamente por agua corriente. Nuevamente, el valor de dicha necesidad bajo condiciones naturales no es difícil de discernir. Una semilla germinará solamente después de una fuerte tormenta que sea capaz de remover a su inhibidor químico y de humedecer al suelo a profundidades considerables. Por ejemplo en el desierto, algunas semillas probablemente requieren quince milímetros de lluvia antes de que sean removidos sus inhibidores de manera que puedan germinar. Una cantidad menor no provocará la germinación, como tampoco lo hacen las lluvias cortas y separadas por intervalo de tiempo. Aparentemente el nivel del inhibidor es reestablecido después de una lluvia corta y se mantiene hasta que llega suficiente lluvia de una vez para remover y humedecer completamente el suelo.

#### **2.4.5 DEMORA EN DESARROLLO DEL EMBRION**

Otro mecanismo de latencia parece estar relacionado con el tiempo que tarda el embrión para completar su desarrollo, después de que la semilla ha sido separada de la planta progenitora. Esto es en algunas semillas, como las del acebo, Ginho y Gretum, que no germinarán inmediatamente después de ser recolectadas, simplemente porque no están "maduras" todavía. La única forma de vencer la latencia de estas semillas es permitiendo suficiente tiempo para que el embrión esté maduro.

#### 2.4.6 VIABILIDAD

La larga vida de almacenamiento del embrión dentro de la semilla, no solamente asegura la supervivencia de las especies, sino que hace probable la distribución y la propagación de los mismos a través de largas distancias, ya sea en el medio silvestre o por mediación del hombre.

Las semillas viables probablemente nunca están por completo inactivas. Los procesos vitales continúan en tanto las semillas guardan las condiciones favorables para germinar y producir una planta. Si se supiera como impedir o suspender completamente todos esos procesos, sería posible mantener la viabilidad indefinidamente.

La actividad dentro de la semilla es tan pequeña que no es posible medirla con ningún método conocido en la actualidad. Sin embargo, si en un tiempo determinado la semilla no encuentra las condiciones favorables que le permita germinar, ciertas sustancias se agotan, se deteriora el poder germinativo y las semillas mueren. La sequedad y el frío disminuyen la actividad y protegen los delicados sistemas balanceados dentro de la semilla.

La palabra viabilidad significa "que esta vivo", es decir, una semilla viable es aquella que, en circunstancias apropiadas, es capaz de germinar, de vivir y desarrollarse normalmente. Una semilla viable puede o no tener una germinación inmediata.

El secado de las semillas es la fase normal y final de la maduración, en este estado la mayoría de las especies de las semillas retienen notablemente su viabilidad. La longevidad de las semillas está

en función de la conservación de su viabilidad, y esta está estrechamente asociada con la humedad que contienen los recipientes donde se almacenan.

Antiguamente los recipientes o envases para guardar las semillas eran sólo vasijas de barro, ahora el empaque moderno recurre a decenas de métodos y materiales para conservar la calidad original de las semillas. La forma en que se empacan las semillas afecta sus características físicas de tamaño, peso, color, contenido de humedad y pureza (ausencia de semillas de las hierbas, material inerte y otras semillas), también es importante la ausencia de organismos patógenos, insectos, roedores y el daño mecánico. La mejor manera para conservar la buena viabilidad y vigor de muchas clases de semillas, es almacenándolas en un lugar seco y frío (cercano o abajo del punto de congelación).

## 2.5 GERMINACION

Las semillas de la mayoría de las plantas son incapaces de germinar cuando están encerradas dentro del fruto y más aún si este permanece unido a la planta madre.

Una semilla esta formada por un embrión y su provisión de alimento almacenado, rodeados por ciertas cubiertas protectoras. En el momento en que la semilla es separada de la planta madre, su metabolismo se encuentra en el nivel más bajo y no hay en ella señales aparentes de actividad de crecimiento, esta semilla contiene la información genética del DNA de los cromosomas del embrión, información que le fue transmitida durante la fertilización.

Durante la germinación de la semilla, el metabolismo celular se incrementa y el embrión reanuda su crecimiento activo y las cubiertas de las semillas se rompen para luego emerger la plántula.

Durante el desarrollo de la plántula los genes se vuelven activos o permanecen inactivos de acuerdo con un programa codificado y predeterminado. Los genes activos, efectúan la síntesis de proteínas hasta que son desactivados en un punto posterior del desarrollo; en consecuencia, las enzimas específicas y las proteínas estructurales disponibles en un período determinado constituyen la base para el crecimiento diferencial y el desarrollo.

Para que la germinación se lleve a cabo son necesarias estas tres condiciones:

PRIMERA: La semilla debe ser viable. Esto es, que el embrión necesariamente deberá estar vivo, y tener la capacidad de germinar.

SEGUNDA: Las condiciones internas de la semilla deben ser favorables para la germinación. Esto es, necesariamente deben haber desaparecido las barreras físicas y químicas para la germinación.

TERCERA: La semilla debe encontrarse en las condiciones ambientales apropiadas. Los requerimientos fundamentales son la disponibilidad de agua, temperatura apropiada, una provisión de oxígeno y, a veces, de luz. Las condiciones internas de la semilla pueden cambiar con el tiempo y en consecuencia los requerimientos ambientales también pueden variar debido a que se ven afectados por el estado interno de la semilla.

La germinación puede ser definida como el conjunto de eventos fisiológicos y bioquímicos que experimenta la semilla hasta el establecimiento de la plántula como un organismo autótrofo. (Bernal 1986)

La germinación se inicia con la absorción de agua por la semilla (imbibición) y termina cuando aparece exteriormente la radícula.<sup>(Wilkins 1969)</sup> Entre los numerosos eventos que se llevan a cabo se encuentran, por ejemplo: La hidratación de proteínas, el cambio de estructuras subcelulares, la respiración, la síntesis de macromoléculas,



y la elongación celular. Estrictamente hablando, la germinación no incluye el crecimiento de la planta, el cual comienza cuando la germinación termina.

El proceso de la germinación se inicia con la activación o despertar y puede completarse en un período de minutos o de horas. La semilla seca absorbe agua, la absorción inicial de agua significa la imbibición de la misma por coloides de la semilla seca, lo cual ablanda las cubiertas de la semilla y ocasiona la hidratación del protoplasma. Como resultado de ello, la semilla se hincha y sus cubiertas pueden romperse. Dado que la absorción es en gran parte un proceso físico, puede efectuarse aún en semillas no viables. Con la absorción de agua se activan los componentes del sistema responsable de la síntesis de proteínas (es decir diversas moléculas de DNA, RNA). Este sistema se formó durante el desarrollo de la semilla, se volvieron activos a medida que esta maduró. Las enzimas producidas por la síntesis de proteínas controlan las actividades metabólicas de la célula.<sup>(Conn 1972)</sup> Algunas de ellas se produjeron durante el desarrollo de la semilla y deben volverse a activar, otras se sintetizan después del inicio de la germinación.

La segunda etapa de la germinación comprende la digestión y la translocación. La absorción del agua y la respiración continúan a un ritmo constante, los sistemas celulares se han activado y los sistemas de síntesis de proteínas están funcionando para producir diversas enzimas, materiales estructurales, compuestos reguladores, ácidos nucleicos etc, para efectuar las funciones celulares y sintetizar nuevos

materiales. Aparecen las enzimas y empiezan a digerir los materiales de reserva (grasas, proteínas, carbohidratos) que están contenidos en los tejidos de almacenamiento (cotiledones, endospermo, perispermo) transformándolos a compuestos químicos más sencillos: Estos compuestos luego son translocados a los puntos de crecimiento del eje embrionario para ser usados en la formación de nuevas partes de la planta. En diferentes especies de plantas, los patrones metabólicos dependen en gran parte de los tipos de reservas químicas de las semillas. Las grasas y los aceites (los constituyentes alimenticios principales de las semillas de la mayoría de las plantas superiores) se convierten enzimáticamente a ácidos grasos y finalmente a azúcares. El almidón, presente en muchas semillas como una fuente de energía, se convierte en azúcares. La secuencia de los patrones metabólicos que ocurren durante la germinación significa la activación de enzimas específicas en el momento adecuado y la regulación de su actividad. El control puede efectuarse dentro de las células por diversos procesos bioquímicos y pueden depender de la presencia de sustancias químicas específicas.

#### 2.5.1 MODELO HORMONAL DE KHAN

En el control de la germinación de las semillas se ha implicado a cuatro clases de fitohormonas vegetales.<sup>(Galston 1969)</sup> Las citocinas son hormonas endógenas naturales que al parecer participan en la germinación de las semillas, probablemente a nivel del sistema de transcripción de DNA→RNA. En algunas plantas estos compuestos pueden anular la acción inhibitoria que el ABA ejerce sobre las giberelinas en

la germinación. Muchos fisiólogos en vegetales piensan que la germinación está regulada por equilibrios entre diversas sustancias promotoras e inhibidoras, siendo la giberelina el principal promotor y el ABA el inhibidor.<sup>(Aven 1948)</sup> vease la figura 2.5.1

Fig 2.5.1

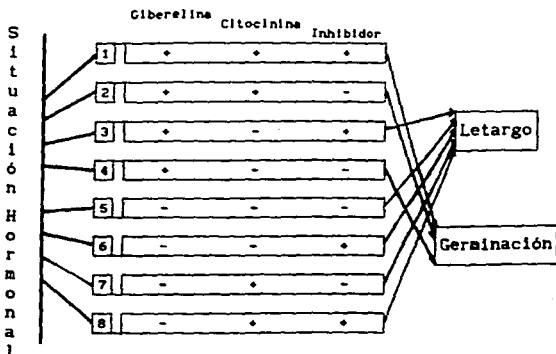


Fig. 2.5.1 Según este modelo, la germinación se efectúa sólo en presencia de la giberelina. Si está presente un inhibidor, anula los efectos de la giberelina. Y la germinación no se realiza (No.3). Pero si luego se añade citocininas, ésta bloquea los efectos del inhibidor y permite que se lleve a cabo la germinación ejem. (No.1).<sup>(Khan 1971)</sup>

Según este modelo el papel primario en el control de la germinación esta dado a las giberelinas. El papel secundario se les atribuye a los inhibidores y a las citocininas, que tienen una función tanto preventiva como permisiva respectivamente. Este modelo es interesante porque

explica que la dormancia no solamente es el resultado de la presencia de los inhibidores, sino que también puede originarse por la falta de las giberelinas o de las citocininas. Esto no quiere decir que la germinación en la naturaleza sea controlada por la presencia o ausencia total de las fitohormonas.

#### VARIACION DE CITOCININAS DURANTE LA GERMINACION DE SEMILLAS DE ZEA MAYS

Asa Julin-Tegelman en 1979 investigó la variación de las citocininas endógenas en semillas de maíz durante dos días de imbibición, analizando citocininas libres (bases libres y ribósidos) y citocininas enlazadas (ribótidos). (Asa Julin-Tegelman 1979) Sus experimentos indican que las semillas de maíz seco contienen mayor cantidad de citocinas libres que de sus correspondientes ribótidos. A las cuatro horas de imbibición el nivel de citocininas 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 cuarenta y ocho horas de imbibición el contenido de citocininas libres decrece hasta un 20% por debajo del nivel que contienen la semillas secas, mientras que los ribótidos de citocininas se mantienen a un nivel bajo durante la imbibición, fig. 2.5.2.

Fig. 2.5.2.

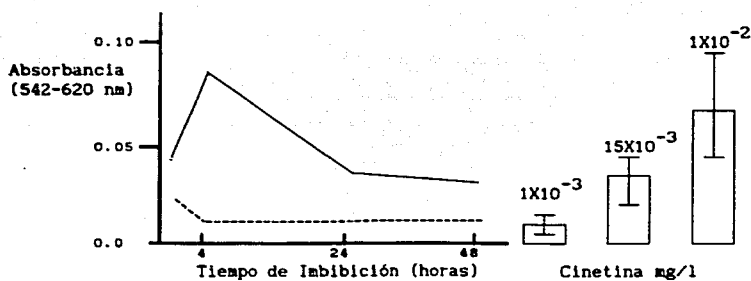


Fig. 2.5.2 Niveles endógenos de citocininas libres -bases libres, ribósidos- (-) y robótidos de citocininas (--) durante 48 horas de imbibición. El contenido de citocininas se expresa en absorbancia. Extractos equivalentes a 2 gramos de semilla seca fueron probados por el bioensayo del amaranto. Las barras verticales indican S.E.M., N=4.

## 2.6 ANALISIS DE CITOCININAS

Los análisis de fitorreguladores están dirigidos principalmente al aislamiento, purificación e identificación de estos.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los problemas básicos en el estudio de sustancias endógenas de crecimiento, son las cantidades tan pequeñas que se tienen en las plantas, ya que generalmente son del orden de nanogramos por gramo de tejido fresco, por lo cual es muy difícil su aislamiento en grandes cantidades y con una alta pureza para su análisis.

Existen varios métodos para la extracción y purificación de estas hormonas. Una de las dificultades para seleccionar el procedimiento de extracción adecuado es que, estas sustancias pueden ser de composición química desconocida. Además, es muy difícil que los procedimientos de aislamiento y análisis no alteren la estructura y las propiedades del material.

Los métodos analíticos para 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.

### 2.6.1 EXTRACCION

A pesar de que la separación es un paso esencial para poder identificar a las fitohormonas, realmente se han desarrollado pocos métodos de aislamiento. La finalidad de todo proceso de extracción es el

de separar las sustancias que nos interesan de los demás componentes que están presentes en la muestra, con la menor pérdida posible. Para ello una de las técnicas más comunes es la extracción por medio de disolventes.

#### EXTRACCION POR MEDIO DE DISOLVENTES

El principio empleado aquí es el siguiente: Cuando se tiene dos disolventes inmiscibles entre si (los polares en la fase acuosa y los no polares en la fase orgánica), la sustancia que se estudia pasa preferentemente a uno de los disolventes, dependiendo del coeficiente de partición que se tenga en ese sistema en particular.

Las citocininas se extren con etanol o metanol acuoso, y a una temperatura baja para evitar la degradación enzimática o química, ya que existe la posibilidad de que los ribótidos de citocininas liberen a los ribósidos por la acción de la fosfatasa y también de que algunas veces, los ribósidos de citocininas al hidrolizarse, liberen a las bases libres.

Los disolventes menos polares que el etanol o el metanol no pueden ser utilizados para la extracción de citocininas debido a la baja solubilidad de éstas sustancias.

En la solución alcoholica se encuentran disueltas las bases libres, los ribósidos y los ribótidos de citocininas, pero también junto con estas se extraen otras sustancias.

La isopenteniladenina es una de las bases libres de las citocininas que tienen dos valores de pKa. El primer valor de pKa=3.4 se debe al nitrógeno exocíclico protonado, y el valor de pKa=10.4 se le

atribuye a la disociación del grupo NH del anillo de imidazol.<sup>(Mc Millan 1980)</sup> Como se observa, la base de las citocininas libres son compuestos anfotéricos.

Los ribósidos de citocininas presentan una débil basicidad debido a los grupos NH del imidazol que son bloqueados por los grupos ribósilos.

Los ribótidos de citocininas también son anfotéricos debido al grupo fosfato.

Por su naturaleza anfóterica y su baja solubilidad en disolventes orgánicos, las citocininas no pueden ser fraccionadas usando procedimientos generales de extracción. En la tabla 2.6.1 se muestran los coeficientes de partición de distintos disolventes orgánicos.<sup>(Letham 1974)</sup>

Los coeficientes de partición de las bases libres de las citocininas estan dados por la siguiente relación: Coeficiente de partición (Kd).

Tabla 2.6.1 Coeficientes de partición  $Kd = \frac{[C]_{org.}}{[C]_{ac.}}$  de las bases libres de citocininas.

	pH	Coeficiente de partición		
		Zeatina	Cinetina	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	6.880
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	10.7



Como se observa en la tabla 2.6.1, el solvente más apropiado para extraer citocininas es el n-Butanol ya que implica una eficaz purificación debido a sus altos coeficientes de partición en éste disolvente a pH=7, las extracciones hechas con n-Butanol tienen la ventaja de aislar las bases y los nucleósidos de citocininas dejando en la fase acuosa, a pH=7, los nucleótidos de citocininas.<sup>(Letham 1973)</sup>

### 2.6.2 PURIFICACION

Después de evaporar el n-butanol con el cual se han extraído las citocininas, estas son purificadas por algún tipo de cromatografía (en papel, capa fina, o columna -intercambio iónico-). Generalmente se utiliza la cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico para la purificación de citocininas, ya que es uno de los procedimientos más fáciles para eliminar a los 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 los ácidos fuertes se eluyen con solución amoniacal.<sup>(Dekhuijzen 1975)</sup>

### 2.6.3 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION

La identificación de las citocininas vegetales se llevó a cabo por el método fisicoquímico de (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. Este tipo de análisis se aplica a un gran número de compuestos, incluyendo tanto a compuestos no volátiles como a sustancias inestables al calor.

Las ventajas que se tienen por este método son las siguientes:

- a) Recuperación de la muestra sin ninguna alteración química, lo cual le permite estar disponible para analizarse por otro método.
- b) El gran poder de resolución; separaciones más rápidas de los componentes que con columnas convencionales.
- c) Mayor velocidad de separación de los componentes. Los análisis se realizan en un tiempo menor al de una hora.

El principio mecánico del instrumento consiste en hacer pasar la fase móvil a través de la columna a velocidades lineales de flujo que pueden ser hasta de 100 veces más rápidas que en una columna de cromatografía tradicional. La muestra es inyectada al sistema cerca de la parte superior de la columna, al salir el eluyente de la columna, que puede o no contener un componente de la mezcla, este penetra al detector. Frecuentemente se utiliza un detector ultravioleta con longitud de onda fija de 254nm (o en ciertos casos de 280nm). La respuesta del detector está en función de la concentración de la muestra.

Las diferentes técnicas de HPLC para el análisis de citocininas son las siguientes: partición en fase normal, partición en fase inversa, adsorción e intercambio iónico.<sup>(Horgan 1981)</sup>

#### **HPLC, FASE NORMAL**

Esta técnica tiene un mecanismo de separación algo complejo, debido en parte a la estabilidad de la fase estacionaria, razón por la cual, se prefiere que el material de empaque esté compuesto por las fases polares enlazadas, esto es, materiales que contengan como base

silica gel con superficie recubierta (enlaces covalentes Si-O), ya que esta tienen una gran variedad 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**

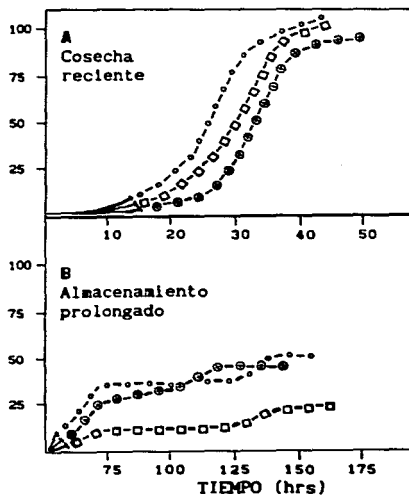
La limitación del uso de la fase normal, ha originado el desarrollo de la técnica por fase inversa. Una de las ventajas importante de HPLC, por fase inversa es que pueden utilizarse como fases móviles, disoluciones acuosas, lo que favorece el análisis de muestras vegetales debido a su naturaleza acuosa predominante. Los materiales de empaque utilizados se basan en partículas de silica gel teniendo como fase enlazada una superficie recubierta de grupos hidrocarbonados tales como C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> y C<sub>22</sub>. El material más usado es el C<sub>18</sub> (octadecil silano, ODS). Al no ser 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.

## 2.7 TRABAJOS ANTECEDENTES A ESTE PROYECTO

Los trabajos anteriores a este proyecto se han llevado a cabo con el fin de dar una explicación a la baja viabilidad en las poblaciones de semillas con almacenamiento prolongado, respecto a la viabilidad de la población de semillas de cosecha reciente. En uno de los trabajos <sup>(Sanchez 1986)</sup> realizados se muestra la diferencia durante la germinación de las semillas en ambas poblaciones a varios tiempos de imbibición, utilizando tres diferentes genotipos de maíz (Mezquital, Tuxpeño, y Universal), fig. 2.7.1

Fig. 2.7.1 germinación de las semillas de maíz de cosecha reciente (A) y de almacenamiento prolongado (B) en los genotipos Mezquital (---), Tuxpeño (-□-□-), Universal (-e-e-).

%  
D  
e  
G  
e  
r  
m  
i  
n  
a  
c  
i  
ó  
n



En las figuras anteriores se puede observar la baja viabilidad en las semillas con almacenamiento prolongado, en el que únicamente el Mezquital alcanza como máximo un 50% de germinación a las 150 horas de

incubación, mientras que este mismo 50% de germinación se logra a las 25 horas en las semillas de cosecha reciente.

Para explicar esta diferencia en viabilidad se llevaron a cabo en el laboratorio varios trabajos que consistieron, primero, en adaptar el método de extracción y cuantificación por HPLC para citocininas libres, (Nishinari 1980) tanto en elote como en semilla seca de varios genótipos de maíz. Se encontró que aproximadamente el 85% de las citocininas están contenidas en el eje embrionario de la semilla seca, y el restante 15% aparece en el escutelo. (Rojas 1986, Camacho 1986)

Para la realización de estos trabajos se utilizó la Zeatina como estándar en el cromatógrafo, encontrándose que en los extractos de elote se halla presente esta citocinina, mientras que en los extractos de semilla seca no fue detectada. En las siguientes ilustraciones se presentan los cromatogramas de dichos trabajos.

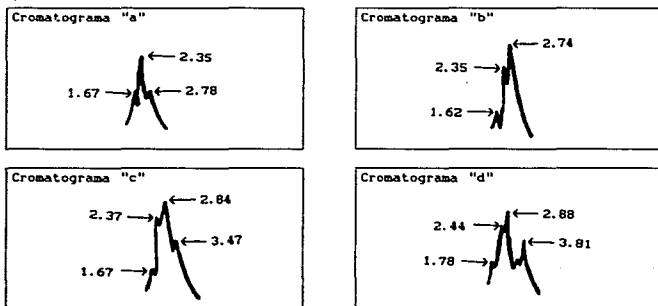


Fig. 2.7.2 Cromatogramas de citocininas extraídas de *Zea mays*, analizadas por HPLC (Cromatografía líquida); eluyente MetOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v. a) a partir de elote; b) elote enriquecido con Zeatina; c) semilla de maíz; d) semilla de maíz enriquecida con Zeatina.

El cromatograma "a" corresponde a los extractos de elote, la señal con  $t_r$ (tiempo de retención)=2.78 minutos se identificó como zeatina, ya que esta señal aumenta cuando los extractos se enriquecen con zeatina, (señal 2,7 minutos en el cromatograma "b"). El cromatograma "d" que corresponde a los extractos de semilla secas enriquecidos con zeatina, muestra una señal con  $t_r$ =3.81 min. la cual no aparece en los extractos de semillas secas sin enriquecer con zeatina, el cromatograma "c", indica que las semillas secas no se detecta zeatina.

Otro estudio llevado a cabo en el mismo laboratorio consistió en la determinación y cuantificación, de citocininas libres (bases libres y ribósidos) en semillas de maíz con almacenamiento prolongado y de cosecha reciente de tres génotipos de maíz (Mezquital, Tuxpeño y Universal) obteniéndose los siguientes resultados.<sup>(Palma 1989)</sup>

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

Tabla 4.7.1 Niveles de citocininas libres (bases libres y ribósidos) en el eje embrionario de maíz a distintos tiempos de imbibición, utilizando el Ribósido de Zeatina como estandar. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de zeatina /eje.

(A) almacenado.

(NA) no almacenado

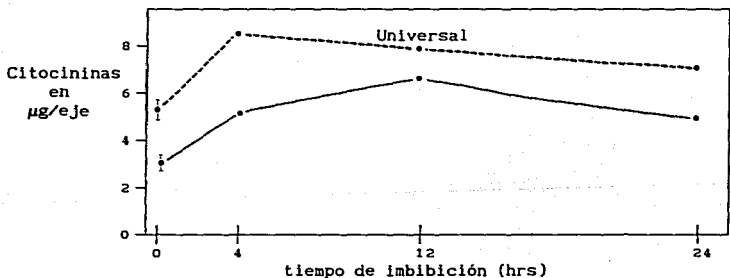
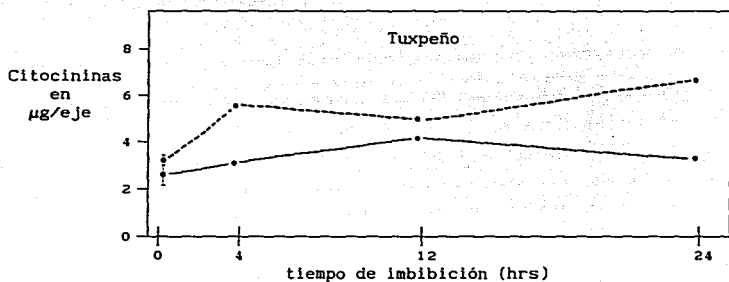
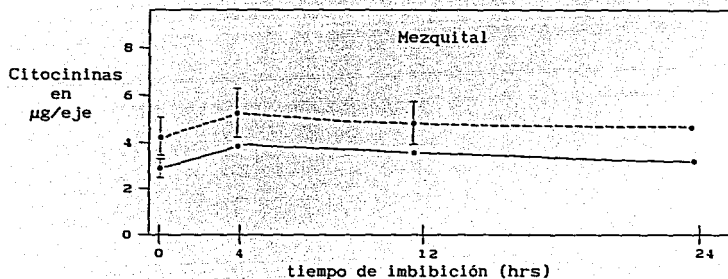


Fig 2.7.3 Niveles de citocininas en el eje embrionario de varios genotipos de maíz, a diferentes tiempos de imbibición.

(---) Con almacenamiento prolongado.

(—) De cosecha reciente.

En este trabajo se observó que existe un incremento de citocininas en los ejes embrionarios durante las primeras cuatro horas de imbibición de las semillas con almacenamiento prolongado en comparación con las semillas de cosecha reciente. Después de las primeras cuatro horas sucede que hay una disminución gradual en casi la totalidad de los casos.



### 3.0 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.0 PARTE EXPERIMENTAL

#### GENOTIPO DE MAIZ ANALIZADO

El genotipo de maiz utilizado fue el Tuxpeño Crema I, tanto de cosecha reciente como de almacenamiento prolongado (cosecha 1972).

#### TUXPEÑO CREMA I.

Es un tipo de maiz formado por 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 esta manera, la semilla con origen Tuxpeño Crema I (1972), proviene del segundo ciclo de selección masal de 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 la planta y de la mazorca. La planta es muy alta y alcanza su floración a los 130 días después de la siembra. La semilla con origen Tuxpeño Crema I (1984), proviene del décimosegundo ciclo de selección masal estratificada hecha en Chapingo en 1982 y aumentada en 1984. Las plantas siguen siendo altas; la floración masculina ocurre a los 112 días después de su siembra y el rendimiento de las plantas casi sigue siendo el normal. Las características de la planta y de la mazorca son muy similares a la de la raza Tuxpeño.

## APARATOS

- Un baño a temperatura constante GCA/PRECISION SCIENTIFIC CIRCULATING SYSTEM-254.
- Una centrifuga clinica marca METTICH.EBA III.
- Un cromatógrafo de líquidos marca Waters Assoc., columna radial pak C<sub>18</sub> acoplado a un espectrofotómetro UV-VIS marca Perkin-Elmer modelo LC-55 como detector.
- Una bomba de vacío marca CENCO-MEGAVAC.

## REACTIVOS

Los reactivos y disolventes utilizados fueron grado R.A. y se usaron sin previa purificación:

- |   |                     |
|---|---------------------|
| Acido Clorhídrico.  | n-Butanol.          |
| Alcohol Etilico.  | n-Hexano.           |
| Alcohol Metilico.   | Hidróxido de sodio. |
| Fosfatasa, alcalina (Ortofosfórico-monoester fosfohidrolasa) tipo I-S P7640 de Mucosa intestinal de Bovino. |                     |
| Ribósido de Zeatina (Isómero Trans).  |                     |

#### CONDICIONES DEL ALMACENAMIENTO

En el campo, la semilla recién cosechada de la mazorca contiene una humedad aproximada que oscila entre el 15 y 18%.

Las semillas son desgranadas de la mazorca manualmente y estas son depositadas en bolsas de manta, para luego secarse al sol o con aire caliente dentro de una secadora hasta alcanzar la humedad del 8 ó del 10%. Son almacenadas en unas cajoneras y llevadas al interior de un cuarto a temperatura y humedad ambiente.

#### CONDICIONES DE GERMINACION

A partir de un lote de maíz Tuxpeño Crema I (ya sea de cosecha reciente o con almacenamiento prolongado) se escogen y son pesados diez gramos de semillas aproximadamente, estas se llevan al interior de un recipiente de vidrio, entre dos capas de algodón humedecidas con agua destilada, cubriendo el recipiente con una hoja de aluminio, para luego ser germinadas dentro de un baño GCA/ PRECISION SCIENTIFIC CIRCULATING SYSTEM-254 a 25°C durante 0, 4, 12 y 24 horas de incubación.

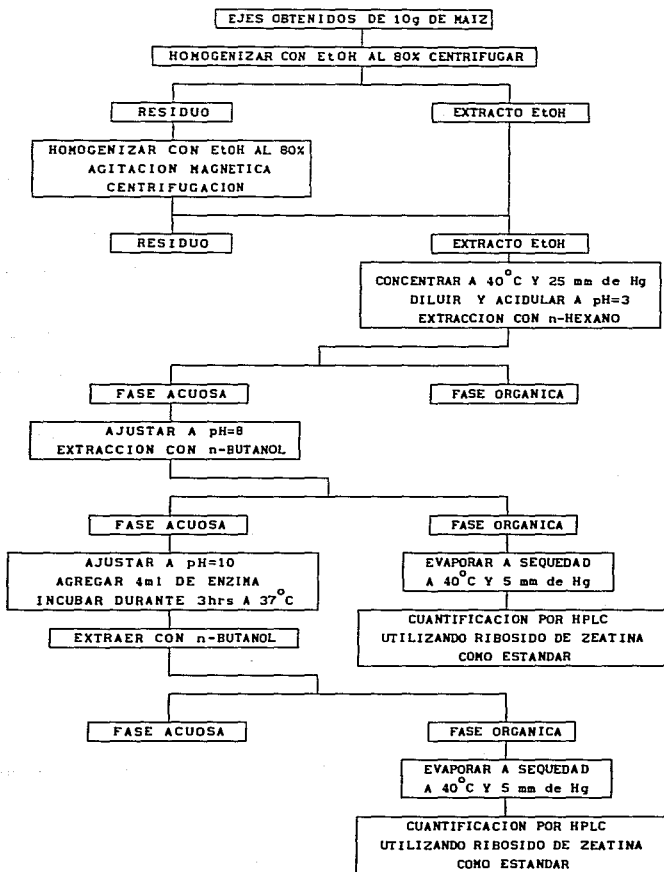
## EXTRACCION DE CITOCININAS

En el laboratorio se adaptó y perfeccionó el método de Nishinari y Syono<sup>(Nishinari 1980)</sup> para la extracción de citocininas libres y conjugadas a partir de los ejes embrionarios de las semillas de maiz de la siguiente manera.

Los ejes embrionarios se homogenizan con 30ml de etanol al 80% dentro de un mortero, enfriado en un baño de hielo-sal, el homogenizado es centrifugado por espacio de 20 minutos a 3200 RPM. El líquido sobrenadante se separa y al residuo se le agregan 20ml de etanol al 80% los cuales se agitan magnéticamente dentro de un baño de hielo-sal para luego volverse a centrifugar durante otros 20 minutos más. Los extractos etanólicos se juntan y se concentran a 40°C y 25mm de Hg. El concentrado se diluye con agua destilada hasta un volumen de 20ml y se acidula hasta un pH=3 con HCl 1N, extrayendose tres veces con fracciones de 10ml de n-Hexano. La fase acuosa es ajustada a un pH=8 con NaOH 1N, para luego ser extraída tres veces con fracciones de 10ml de n-Butanol saturado de agua, los extractos butanólicos se juntan y se concentran a sequedad a 40°C y 5mm de Hg.

La fase acuosa se ajusta a un nuevo pH=10 con NaOH 1N y se le agregan 4ml de enzima (fosfatasa alcalina ortofosfórica-monoester fosfohidrolasa tipo I-S, P-7640 de concentración 1µg/ml), y se incuba en el baño a la temperatura constante de 37°C, durante tres horas. Posteriormente la solución se extrae tres veces con fracciones de 10ml cada una de n-Butanol saturado de agua. Se juntan los extractos butanólicos y se concentran a sequedad a 40°C y 5mm de Hg. (Ver esquema 2.3.1).

METODO DE EXTRACCION



## ANALISIS DE LOS EXTRACTOS BUTANOLICOS

El análisis de los extractos butanólicos (citocininas extraídas) se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), de partición inversa que utiliza octadecilsilano ( $C_{18}$ ) como fase estacionaria no polar en la columna. Esta clase de separación cromatográfica de citocininas ha sido utilizada por Kannangara, T. y Holland, J.<sup>(Kannangara 1978, Holland 1978)</sup> Los extractos obtenidos se disuelven en 10ml de metanol y se inyectan 10 $\mu$ l al cromatógrafo de líquidos, que utiliza una fase móvil la cual consiste en una mezcla de metanol-agua 70:30 V/V. Este método de separación de citocininas es eficiente según los experimentos de Ernstsén, A. y Jensen, F.<sup>(Ernstsén 1985)</sup> utilizando altas concentraciones indicadas de alcohol metílico.

La velocidad de flujo de la fase móvil es de 1.5ml/min; como detector de citocininas se utiliza un espectrofotómetro de U.V. con una longitud de onda fija de 254nm ya que a esta longitud de onda las citocininas son detectables hasta en cantidades de 4ng.<sup>(Kannangara 1978)</sup>

## 4.0 RESULTADOS Y DISCUSION



#### 4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Como ya se mencionó en la introducción, en este trabajo se determinaron los contenidos de citocininas (bases libres y ribósidos por una parte y ribótidos por otra), utilizando como estandar ribósido de zeatina, en semillas secas de maíz de la variedad Tuxpeño Crema. Las determinaciones se hicieron a 0, 4, 12 y 24 horas de imbibición y en dos poblaciones distintas del genotipo utilizado: una de cosecha reciente y otra con almacenamiento prolongado, siguiendo el método de extracción de Nishinari y Syono adaptado en nuestro laboratorio según aparece en la parte experimental.

Dichas determinaciones se hicieron con el objeto de comparar el contenido de citocininas libres con respecto al contenido de citocininas conjugadas, para poder dar una explicación aproximada a la pérdida de viabilidad que se ha observado en las semillas con almacenamiento prolongado.

En un trabajo anterior <sup>(Palma 1989)</sup> a este se cuantificaron los contenidos de citocininas libres (bases libres y ribósidos) en semillas de maíz con almacenamiento prolongado y de cosecha reciente de tres genotipos de maíz (Mezquital, Tuxpeño, y Universal) a 0, 4, 12 y 24 horas de imbibición. Los resultados obtenidos (Ver tabla 4.7.1 y Fig. 2.7.3 pág. 47) muestran que en todos los casos, a tiempo 0, el contenido de citocininas es mayor en las semillas con almacenamiento prolongado que en las semillas de cosecha reciente. Se encontró también un incremento en los contenidos de citocininas a las 4 horas de imbibición, siendo este mayor en las semillas con almacenamiento prolongado que en

las de cosecha reciente, en prácticamente todos los casos. Después de las cuatro horas se observa una disminución en casi todos los casos.

De acuerdo con la literatura se pueden argumentar dos razones para el incremento observado en los niveles de ribósidos de citocininas en las semillas con almacenamiento prolongado:

- 1) La hidrólisis de los ribótidos de citocininas a los correspondientes ribósidos ó.
- 2) La degradación de los ácidos nucleicos debido al envejecimiento de las semillas.

Para discriminar entre las dos posibilidades anteriores, en este trabajo se hicieron determinaciones de los ribósidos de citocininas presentes en los ejes embrionarios de semillas del genotipo Tuxpeño Crema y posteriormente se determinaron los contenidos de ribótidos presentes.

En todos los casos, las determinaciones se realizaron en los ejes embrionarios de la semilla a los diferentes tiempos de imbibición, dado que en nuestro laboratorio se había comprobado que<sup>(Rojas 1986)</sup> el 85% de las citocininas se encuentran en esta parte de la semilla.

Como se señala en la parte experimental, los extractos butanólicos se llevaron a sequedad, posteriormente se disolvieron en Metanol y se analizaron por HPLC, usando como estándar el Ribósido de Zeatina y como eluyente  $M_{e}OH/H_{2}O$  70:30 v/v.

En la fig. 4.1 se muestran los Cromatogramas de los primeros extractos butanólicos (citocininas libres y ribósidos) a tiempo cero para el genotipo Tuxpeño Crema de cosecha reciente. En estos cromatogramas se observan en la curva "a", la señal que aparece con un

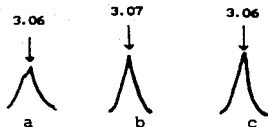


Fig. 4.1 Cromatogramas de extractos de ejes embrionarios para el genotipo Tuxpeño Crema de cosecha reciente a cero horas de imbibición "a". El cromatograma "b" corresponde al Ribósido Zeatina. Y el cromatograma "c" pertenece al extracto enriquecido con el estándar de Ribósido de Zeatina.

tiempo de retención (tr) de 3.06 min. La curva "b" muestra el tr observado para el estándar de Ribósido de Zeatina y la curva "c" corresponde al extracto enriquecido con estándar. El crecimiento de la señal que se obtiene en la muestra enriquecida (con respecto a la curva "a") indica que dicha señal corresponde al Ribósido de Zeatina.

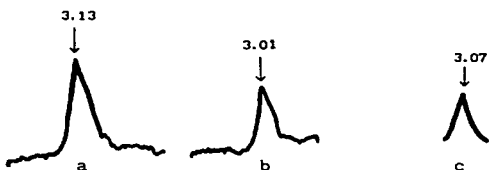


Fig. 4.2 Cromatogramas de los extractos de los ejes embrionarios correspondientes a las semillas de maíz Tuxpeño Crema de (cosecha reciente) con tiempo de imbibición de doce horas .  
 a) Tuxpeño Crema enriquecido con Ribósido de Zeatina (con enzima).  
 b) Tuxpeño Crema enriquecido con Ribósido de Zeatina (sin enzima).  
 c) Stándar del Ribósido de Zeatina.

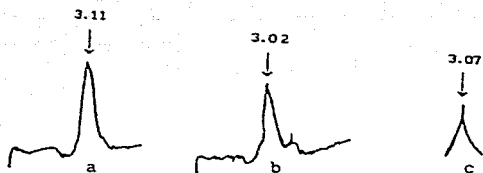


Fig. 4.3 Cromatogramas de extractos de los ejes embrionarios de las semillas de maíz del Tuxpeño Crema (con almacenamiento prolongado) con tiempo de imbibición de doce horas.

- a) Tuxpeño Crema enriquecido con Ribósido de Zeatina (con enzima).
- b) Tuxpeño Crema enriquecido con Ribósido de Zeatina (sin enzima).
- c) Stándar del Ribósido de Zeatina.

Los cromatogramas 4.2.a, y 4.2.b, muestran las señales que aparece a  $tr=3.13$ , y  $3.01$ , los cuales al compararse con el cromatograma "c" que corresponde al estándar del Ribósido de Zeatina con  $tr=3.07$ , confirma que la citocinina extraída de las semillas del Tuxpeño Crema de cosecha reciente, tanto del primer extracto (bases libres y ribósidos) como del extracto posterior a la hidrólisis enzimática (ribótidos), es precisamente el Ribósido de Zeatina.

Lo mismo sucede en la fig. 4.3 en donde se hace la comparación de los cromatogramas 4.3.a, y 4.3.b, correspondientes a los extractos de las semillas del Tuxpeño Crema con almacenamiento prolongado comparados con el estándar del Ribósido de Zeatina, se concluye que la citocinina aislada de estos extractos de semillas es también Ribósido de Zeatina.

En la mayoría de los casos estudiados se tiene una señal integrada con las condiciones utilizadas observándose la completa separación del Ribósido de Zeatina.

## ANALISIS DEL METODO DE EXTRACCION

En los primeros extractos etanólicos, primer paso en el método de extracción, también se extraen junto con las citocininas, otras fitohormonas además de un gran número de sustancias. Estas extracciones se hacen a baja temperatura para minimizar la degradación enzimática o química de los ribótidos que pueden liberar ribósidos de citocininas por la acción de la fosfatasa, además de que algunas veces las bases libres se forman por la hidrólisis de los ribósidos de citocininas. Después de concentrar estos extractos, el residuo se diluye con agua ajustando el pH=3, ya que uno de los pKa de las citocininas es 3.4, correspondientes al nitrógeno exóclíclico protonado. La fase acuosa se lava con hexano para eliminar compuestos neutros y ácidos. La fase acuosa se ajusta a un pH=8. En este valor de pH las citocininas estan como las bases libres, ya que el segundo valor de pKa de citocininas es aproximadamente 10.4 y corresponde al grupo NH del 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 pH=8 tabla (2.6.1.). En la fase acuosa quedan citocininas con grupos funcionales ácidos en su cadena lateral y ribótidos de citocininas por sus grupos fosfatos aniónicos a éste valor de pH, los cuales se muestran en la tabla 2.1.3. En la fase butanólica se extraen bases libres y ribósidos de citocininas, sin embargo no se descarta la posibilidad de extraer también el Ribósido de Adenina.

Después de establecer que se detecta Ribósido de Zeatina por el método utilizado, junto con otras citocininas y que en la mayoría de los casos todas forman una sola señal en los

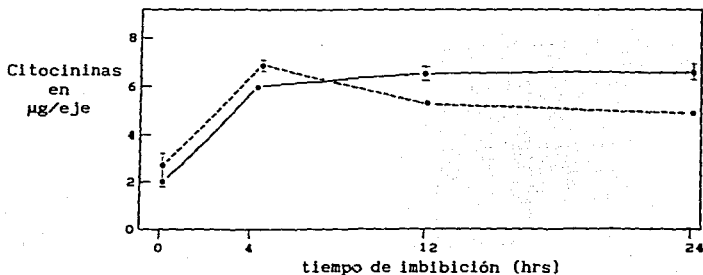
cromatogramas obtenidos, se determinó el contenido de citocininas en semillas secas del genotipo indicado, tanto de almacenamiento prolongado como de semillas de cosecha reciente. Sólo se tomaron los datos en los cromatogramas que mostraban una señal. Para esto se utilizó el Ribósido de Zeatina como estándar, obteniendo los resultados que a continuación se indican.

Gráfica 4.1

Genotipo	Pobl.	0 hrs	4 hrs	12 hrs	24 hrs
Tuxpeño	A	2.8±0.2	6.95	5.34	5.1
	NA	2.4±0.4	5.7±0.01	6.4±0.1	6.7±0.02

(A) Almacenado

(NA) No Almacenado



Niveles de citocininas libres (bases libres y ribósidos) en el eje embrionario del genotipo de maíz Tuxpeño crema, a los distintos tiempos de imbibición.

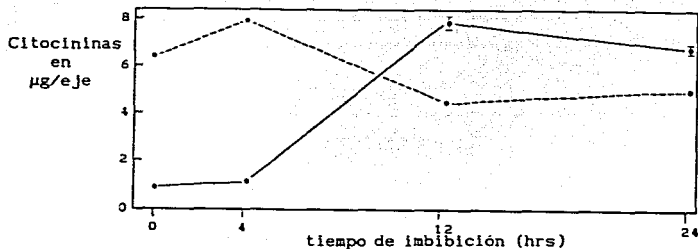
(---) tuxpeño con almacenamiento prolongado.

(—) Tuxpeño de cosecha reciente.

Gráfica 4.2

Genotipo	Pobl.	0 hrs	4 hrs	12 hrs	24 hrs
Tuxpeño	A	6.72	8.21	4.82	5.21
	NA	0.83	1.3±0.05	8.3±0.3	7.3±0.12

(A) Almacenado  
(NA) No Almacenado

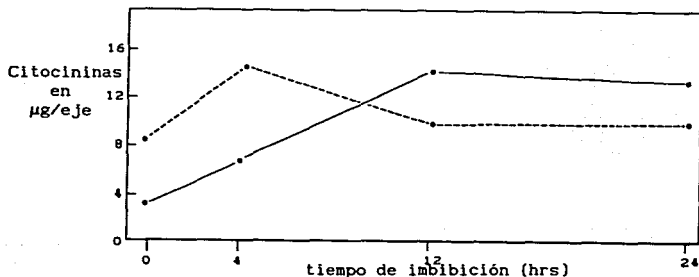


Niveles de citocininas conjugadas (ribótidos) en el eje embrionario del genotipo de maíz Tuxpeño crema, a los distintos tiempos de imbibición.  
(---) Tuxpeño con almacenamiento prolongado.  
(—) Tuxpeño de cosecha reciente.

Gráfica 4.3

Genotipo	Pobl.	0 hrs	4 hrs	12 hrs	24 hrs
Tuxpeño	A	9.05	15.16	10.16	10.31
	NA	3.23	7.13	14.84	14.156

(A) almacenado.  
(NA) no almacenado.



Niveles de citocininas totales (libres + conjugadas) en el eje embrionario del genotipo de maíz Tuxpeño Crema, a los distintos tiempos de imbibición.  
(---) Tuxpeño con almacenamiento prolongado.  
(—) Tuxpeño de cosecha reciente.

En la gráfica 4.2 se muestra que en la semilla seca el contenido de ribótido de zeatina en semillas con almacenamiento prolongado es mucho más alto que en semillas de cosecha reciente.

Durante la germinación se observa un incremento importante de los ribótidos de zeatina en las semillas de cosecha reciente después de las 4 horas de imbibición, mientras que las semillas con almacenamiento prolongado presentan sólo un ligero incremento al inicio de la germinación y después de 4 horas se observa un decremento importante en el contenido de estas citocininas.

En estos experimentos se hace evidente la incapacidad del eje embrionario para sintetizar, después de las 4 horas de imbibición, tanto ribósidos como ribótidos de citocininas, cualquiera que sea la vía de síntesis. Por otra parte, los altos contenidos iniciales de ribótidos y ribósidos en las semillas con almacenamiento prolongado parecen indicar que aparentemente la viabilidad de la semillas no tienen una relación directa los contenidos de citocininas, dado que estas semillas han perdido su viabilidad a pesar de tener altas concentraciones de ribósidos y ribótidos.

Bray<sup>(Bray 1983)</sup> ha encontrado que es sensible y se degrada el RNA de las semillas con el almacenamiento ya sea prolongado o en condiciones inadecuadas, dado que se han encontrado RNA altamente degradado en embriones de semillas de trigo almacenados.



Así, los niveles altos de citocininas que se encontraron en los ejes de las semillas de maíz del genotipo Tuxpeño con almacenamiento prolongado es probablemente el resultado de este proceso de degradación.

Aunque esto parece ser lo más probable queda por hacer determinaciones que pongan en evidencia las condiciones en la que se encuentra el RNA en las semillas, ya que si se encontrará que este está muy degradado se tendría un apoyo para la propuesta que se hace aquí.

Dado que los contenidos de ribótidos encontrados son también más altos en las semillas almacenadas que en las de cosecha reciente, esto no puede explicar que los ribósidos provengan de una hidrólisis de los ribótidos, por lo que se piensa que el origen más probable de la degradación de los ácidos nucleicos.

## 5.0 CONCLUSIONES

## 5.0 CONCLUSIONES

-Se determinaron los contenidos de citocininas libres (bases libres y ribósidos) y de citocininas conjugadas (ribótidos) en el genotipo de maíz Tuxpeño Crema usando dos poblaciones distintas: una de cosecha reciente y otra con almacenamiento prolongado.

-Las determinaciones se hicieron en los ejes embrionarios de las semillas del genotipo mencionado a cuatro diferentes tiempos de imbibición: 0, 4, 12 y 24 horas.

-Las cuantificaciones del contenido de citocininas en los extractos de los ejes embrionarios se determinaron por HPLC usando ribósido de zeatina como estándar.

-Se encontró que al tiempo 0 y a las 4 horas de imbibición los contenidos tanto de ribósidos como de ribótidos son mayores en las semillas con almacenamiento prolongado que en las de cosecha reciente. Después de las cuatro horas de imbibición se observa un decremento en los contenidos tanto de ribósidos como de ribótidos en las semillas con almacenamiento prolongado mientras que en las de cosecha reciente ambas citocininas se incrementan.

-Se sugiere, como conclusión, que las mayores cantidades de ribósidos y de ribótidos en las semillas con almacenamiento prolongado provengan de la degradación de los ácidos nucleicos del embrión, debido a los largos tiempos de almacenamiento.

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

- Amen, R. D., A model of seed Dormancy, Bot. Rev 34:1-31 (1948).
- Bernal, L. H. Cuadernos de Posgrado 19. Fac. de Quim., UNAM (1986).
- Beutelmann, P. Planta. 112, 181-190 (1973).
- 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).
- Bray, M. C. Journal of Experimental Botany, 34 (145) 1047-1054 (1983).
- Brenner, M. L. Burr, B. and Burr, F. Plant Physiol. 59, 5-7 (1976).
- Brenner, M. L. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 511-38 (1981).
- Camacho, F. E. Determinación de Reguladores de Crecimiento en Maíz. TESIS, FAC. DE QUIMICA. U.N.A.M. (1986).
- Conn, E. C. y P. K. Stumpf. Outlines of Biochemistry 3a. Ed. Cap.19 Biosintesis of proteins. New York: John Wiley & Sons Inc, 1972.
- Davey, J. E., Van Standen, J. Plant Physiol. 63, 873-877 (1979).
- Ernstsen, A. and Jensen, F. J. Liq. Chromatogr. 8 (2) 369-373 (1985).
- Galton, A. W. y P. J. Davies, Hormonal regulation in higher plants. Science, 163: 1288-97 (1969).

Harrington, J. F., Seed storage and longevity. in T. T. Kozlowski (Ed.), Seed Biology. New York: Academic Press, Págs. 145-254.

Hill, T. A. Endogenous plant growth substances. pág. 1,29. First editon. Clowes & Sons. Great Britain (1973).

Holland, J. A., McKerrel, E.H., Fueli, K.J. and Burrows, W.J., J. Chromatogr. 166, 545, (1978).

Horgan, R. Prog. Phytochem. 7, 137 (1981).

Kannangara, T. Durley, R. C. and Simpson, G. M. Physiol. Plant. 44, 295-299, (1978).

Khan, A. A., Cytokinins: permisive rolle in seed germination, Science, 171: 853-59, (1971).

Kennet, V. Thimann. Senescence in Plants. CRC PRESS. Pág. 15-7, (1980).

Kungg-Woo Lee, P. Kessler, B. and Thimann, K. V. Physiol. Plant. 31, 11-4, (1974).

Letham, D. S. Phytochemistry. 12, 2445-2455 (1973).

Letham, D. S. Goodwin, P.B. and Higgins, T. J. V. Phytohormones and Related Compounds: A comprensive Treatise. Elsevier North-Holland. Vol. I. Pág. 238 (1978).

Letham, D. S. Planta. 118, 361-364 (1974).

Mc Graw, B. A. *Phytochemistry*. 24, (1), 9-13, (1985).

Mc. 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).

Miller, C. O. Skoog, F. Okumura, F. S. Von Saltza, M. H. J. *Am. Chem. Soc.* 77, 2662 (1955).

Nishinari, N. and Syono, K. *Plant and Cell Physiol.* 21, 1143 (1980).

Palma de la Cruz, A. *Variación en el contenido de citocininas durante la germinación de maíz nuevo y con almacenamiento prolongado*. TESIS, FAC. DE QUIMICA, UNAM (1989).

Rojas, E. E. *Niveles de citocininas en Maíz*. TESIS, FAC. DE QUIMICA. UNAM (1986).

Sanchez de J. E. Sepulveda G., Reynoso E., Molina G. J. Albores M. J. *Exp. Bot.* (enviado a publicación).

Sheldrake, A. R. *Biol. Rev.* 48, 509-559, (1973).

Short,<sup>(I)</sup> K. C. and Torrey, J. G. J, *Plant Physiol.* 49, 155-160, (1972).

Short,<sup>(II)</sup> K. C. and Torrey, J. G. J, *Exp. Bot.* 23, 1099-1105, (1972).

Skoog, F. Hamzi, H. Q. Szweykowska, A. M. *Phytochemistry*. 6, 1169, (1967).

Smith, A. R. and Van Staden, J. J. Exp. Bot. 29, #112, 1067-1075 (1978).

Smith, A. R. and Van Staden, Chemical Abstracts, 91, 16S07h (1979).

Summons, R. E. Entsch, S. Lethan, D. S. Gollnow, B. I. Planta. 147, (5) 422 (1980).

Wareing, P. F. and Phillips, I. D. J. The Control of Growth and

Wilkins, M. B. Physiology of Plant Growth and Development.  
Mc. Graw-Hill. Pág. 637 (1969).