00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y SENSIBILIDAD AL DETERIORO DE ALGUNOS CULTIVARES DE MAIZ"

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

Presenta

FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

México, D.F. Abril de 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.....1
ANTECEDENTES 3
INTRODUCCION.....5
OBJETIVO.....23
MATERIAL Y METODOLOGIA.....24
RESULTADOS.....32
DISCUSION.....54
CONCLUSIONES.....63
BIBLIOGRAFIA.....64

RESUMEN

La calidad de un lote de semillas se puede determinar mediante características fisiológicas como la viabilidad y el vigor. En general, las semillas recién cosechadas son de alta calidad, presentan altos niveles de viabilidad y vigor, sin embargo durante el almacenamiento su calidad disminuye, es decir, se deterioran.
El deterioro de semillas en el almacén va acompañado de daños en la función e integridad de macromoléculas y estructuras celulares. En el embrión de maíz existen carbohidratos solubles que le sirven al mismo para su nutrición en las primeras etapas de la germinación. También se ha propuesto que tales carbohidratos en niveles apropiados pudieran proteger estructuras celulares en el estado seco. Tal efecto protector quizá se perdería durante el almacenamiento y por ello la semilla se deteriora. En base a lo anterior en este trabajo se ha hipotetizado que pudiera existir una correlación entre el contenido de carbohidratos en el embrión y la sensibilidad al deterioro que la semilla presenta.
Para investigar lo anterior se determinó la calidad inicial -la viabilidad, la velocidad de germinación y el crecimiento de la plántula, así como la integridad membranal entre otros parámetros cuantificables- de 5 cultivares de maíz: el híbrido trilineal CPS-HT-1 (HT 1)= A_6 (A_6) y las colectas Tepecintle 100 (T_{100}), Tepecintle 5963 (T_{5963}), Pepitilla 1346 (P_{1346}) y Pepitilla 49 (P_{49}). Posteriormente se determinó el efecto del tiempo de almacenamiento en 75% de HR y 30°C sobre la calidad inicial de los mismos cultivares.
Mediante cromatografía de gases se cuantificó el contenido de carbohidratos solubles en etanol de embriones de semillas control y a diferentes tiempos de almacenamiento.
Los resultados encontrados son concluyentes en que en general los

5 materiales empleados en este trabajo mostraron un mismo índice de calidad de semilla antes de ser almacenadas solo mostrando diferencias en la salida de iones y azúcares entre los 2 pepitillas y el resto de los cultivares.
Por otro lado su sensibilidad al deterioro (la velocidad a perder calidad en el almacén) fue diferente encontrandose que el más sensible fue A_{06} mientras que T_{100} y T_{5903} fueron los más resistentes. Por su parte P_{1346} y P_{49} son materiales con sensibilidad intermedia.
En cuanto al contenido de carbohidratos, inicialmente todos los materiales presentaron un bajo contenido de monosacáridos, su azúcar más abundante fue la sacarosa la cual tuvo el mismo nivel en todos ellos. Por su parte la rafinosa mostró diferentes niveles en todos los cultivares. La relación sacarosa/rafinosa (S/R) en A_{06} fue de 12 mientras que en los otros 4 materiales fue de alrededor de 4. Durante su almacenamiento a los 3 meses A_{06} presentó un aumento significativo de monosacáridos, mismo que ocurrió a los 4 meses en 3 de las colectas o no se presentó como en T_{5903}. Tal aumento en general no estuvo correlacionado con una disminución significativa en los niveles de sacarosa y rafinosa, los cuales permanecieron constantes durante todo el almacenamiento en 3 de los cultivares solo disminuyendo significativamente en A_{06} y P_{49}. Además hubo una tendencia en las 4 colectas analizadas a aumentar la relación S/R conforme avanzaba el tiempo de almacenamiento, lo que no se observó en A_{06}. T_{5903} por su parte se deterioró sin acumular monosacáridos en forma dramática pero teniendo un incremento significativo en fructosa. Los resultados encontrados en 4 de los cultivares A_{06}, P_{49}, P_{1346} y T_{100} muestran que al parecer existe relación entre los cambios en los niveles de carbohidratos de los embriones de maíz durante el almacenamiento con el deterioro de la semilla. T_{5903} por su parte se deteriora, pero sus carbohidratos se modifican solo ligeramente.

ANTECEDENTES

La disminución del vigor y la viabilidad durante el almacenamiento de semillas está asociada con alteraciones en la integridad membranal(49), así como con reacciones deletéreas en el citoplasma, por ejemplo la inactivación de algunas enzimas (3).
Los azúcares: sacarosa, rafinosa y estaquiosa protegen membranas (10, 17, 21, 34, 38,) y la actividad enzimática (17, 20) en el estado seco. Aparentemente los azúcares solubles reemplazan al agua en la formación de puentes de hidrógeno y de esta forma mantienen las estructuras hidrofílicas en su orientación hidratada aún cuando el agua no esté presente (10, 15).
Este efecto protector de los azúcares solo se presenta en ciertas relaciones de sacarosa a rafinosa o estaquiosa (10).
En semillas quiescentes el principal azúcar presente en el embrión es la sacarosa y en menor proporción se encuentran los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa (1, 5). Algunos autores proponen que estos azúcares son los responsables de la integridad membranal y del estado vitrificado en que se encuentra el eje embrionario de semillas quiescentes recién cosechadas. Este estado vitrificado evitaría las reacciones que requieren difusión protegiendo de esta manera a la semilla durante el estado seco (9, 39, 70).
La interconversión de azúcares puede ocurrir en semillas secas. Se ha reportado que los carbohidratos solubles declinan durante el deterioro de la semilla (5). Este decremento podría disminuir el efecto protector de los azúcares en la integridad membranal o podría limitar la habilidad de la semilla para mantener el estado vitrificado lo cual a su vez permitiría que se realizaran las reacciones deletéreas que conducen al deterioro de la semilla. Lo anterior sugiere que la composición de azúcares del embrión puede indicar el comportamiento de una semilla durante su almacenamiento.

Para demostrar esta posibilidad, en este trabajo se determinó y comparó la composición de azúcares de cultivares de maíz con su sensibilidad al deterioro en el almacén.

INTRODUCCION

La germinación y el crecimiento de la plántula son algunos de los criterios con base en los cuales se puede establecer la calidad agronómica de una semilla (61). En general las semillas recién cosechadas presentan gran calidad es decir tienen alta viabilidad y alto vigor. La alta viabilidad significa que alrededor de un 100 % de las semillas germinan, es decir, están vivas. Por otro lado aunque se puede establecer el nivel de vigor en una semilla con base en criterios como serían la velocidad de germinación y el crecimiento de la plántula; el vigor en sentido estricto se define como todo el conjunto de características que le permiten a una semilla llegar a establecerse como plántula independiente aún en condiciones desfavorables.

El nivel de calidad en semillas de una misma especie varía de acuerdo al cultivar y en términos generales las semillas recién cosechadas presentan mayor calidad que sus contrapartes almacenadas (64).

Durante el desarrollo fisiológico normal de una semilla como el maíz, ésta atraviesa por una etapa natural de desecación (pérdida de agua) que se lleva a efecto al final de su maduración y que es necesaria para que la semilla pueda germinar con normalidad. Este tipo de semillas que toleran la pérdida de agua son llamadas ortodoxas (23, 55).

La etapa de desecación aunque normal es estresante y dañina para las semillas ortodoxas y para enfrentarla, estas tienen que prepararse y adquirir la llamada tolerancia a la desecación. La manera en como la semilla enfrenta o desarrolla su etapa de desecación podría estar relacionada con su calidad inicial y comportamiento después de la cosecha.

TOLERANCIA A LA DESECACION

Por tolerancia a la desecación se entiende la capacidad de un organismo de resistir la desecación (pérdida de toda su agua disponible), suspendiendo su metabolismo y posteriormente reasumirlo en forma normal cuando hay aporte de agua (6).

El fenómeno de la tolerancia a la desecación ha interesado a los científicos desde hace más de 2 siglos aunque este interés surgió de algunas observaciones en animales y no de la observación de la germinación de las semillas secas cuando eran humedecidas.

A mediados del siglo XVII existía la pregunta de si los animales podrían resucitar después de la muerte. La cual, los primeros naturalistas consideraban que se presentaba después de la desecación. Tal pregunta surgió de las observaciones hechas por diferentes estudiosos de aquella época como Leeuwenhoek (1702) y Needham (1745) entre otros (40). Posteriormente en 1878 Claud Bernard incrementó aún más el interés en el fenómeno de la tolerancia a la desecación y en los estudios de biología anhidra o anhidrobiología con su observación de que la habilidad para resistir desecación era una característica común en una amplia variedad de animales inferiores, entre ellos varias especies de nemátodos, tardígrados y rotíferos además de las semillas de las plantas (40). En la actualidad se conoce que el fenómeno de la tolerancia a la desecación ocurre en un enorme rango de taxa, incluyendo numerosos invertebrados, bacterias, esporas de hongos, levaduras etc.

En el reino de las plantas también hay numerosos ejemplos de organismos tolerantes a la desecación. Además de las semillas y el polen de plantas superiores se conocen alrededor de 60 ejemplos de plantas pertenecientes a las monocotiledóneas, dicotiledóneas, helechos y selaginelas. De igual forma también existen un gran número de musgos, líquenes y algas que también resisten la pérdida de agua (6).

El que la tolerancia a la desecación sea un ferómeno tan extendido entre los organismos ha sugerido que tal vez presente algunas ventajas adaptativas para los que la poseen (41).

Tolerancia a la desecación en plantas

Como ya se mencionó anteriormente, en el reino vegetal se puede apreciar tolerancia a la desecación tanto en las estructuras vegetativas como en las reproductoras.
Las plantas xerófitas que habitan en climas extremosos como los desérticos, han tomado diversas estrategias para sobrevivir en tales climas, algunas de ellas, las llamadas xerófitas efímeras, han disminuido en forma importante su ciclo de vida de tal manera que solo mantienen sus estructuras vegetativas durante el período en el que existe agua. Otras plantas presentan modificaciones estructurales en sus raíces, tallos y hojas que les permiten captar agua lo más rápidamente posible y conservarla durante bastante tiempo (14). Una tercera estrategia mostrada por las plantas desérticas es la de enfrentar directamente la desecación y tolerarla; este tipo de plantas pueden resistir el secado y posteriormente con la rehidratación reasumir normalmente sus actividades metabólicas y fotosintéticas y se les conoce como plantas tolerantes o resistentes a estrés hídrico o estrés de sequía; este tipo de plantas también son conocidas como poilkilohídricas (6).
Entre las plantas que pueden resistir la desecación se encuentran unas cuantas especies de plantas superiores y una gran cantidad de plantas inferiores como helechos, musgos, líquenes y algas (6). Estas últimas aunque no habitan comunmente en climas desérticos, sí estan expuestas en forma continua a condiciones cambiantes que incluyen períodos de sequedad a los cuales necesitan estar adaptadas.
En el caso de las estructuras reproductivas (las cuales

desarrollan la tercera estrategia para protegerse de la pérdida de agua) y hablando en particular de las semillas, hay que decir que no todas ellas son tolerantes a la desecación y las que muestran tolerancia no en todas las etapas de su desarrollo tienen esta capacidad (36).

Ya desde 1973 Roberts (23, 55) calificó y nombró las semillas de acuerdo al daño que presentaban durante el secado. A aquellas que podían ser secadas hasta bajos contenidos de humedad, del orden de 0.05 g H_2O g^{-1}peso húmedo (ph) y toleraban temperaturas de congelación, las llamó semillas ortodoxas; ahora se sabe que este tipo de semillas tienen que ser almacenadas en bajas humedades relativas y bajas temperaturas para mantener su viabilidad por un tiempo prolongado.

Por otro lado aquellas semillas que no podían ser secadas abajo de un contenido de humedad crítico (0.30 g H_2O g^{-1}ph) y no resistían temperaturas de congelación, las denominó semillas recalcitrantes. En 1984 Hanson(23) sugirió que el término "sensible a la desecación" describe más exactamente a las semillas recalcitrantes. Este tipo de semillas pierde viabilidad una vez que son secadas a un contenido de H_2O abajo de su valor crítico de humedad, teniendo entonces que ser almacenadas en un medio con alto contenido de humedad para lograr mantener su máxima viabilidad.

Lo anterior sugiere que la humedad de la semilla es un factor crítico que determina la longevidad tanto en semillas recalcitrantes como ortodoxas.

Importancia de la retención de agua en la desecación

Como se mencionó, las semillas ortodoxas tienen la capacidad de sobrevivir a la pérdida de la mayor parte de su agua celular. Esto resulta interesante si tomamos en cuenta que el agua participa en la mayoría de las reacciones celulares. Cuando se comporta como

sustrato su concentración puede afectar el equlibrio entre reactivos y productos. Actuando como solvente provee un medio fluido para que los sustratos difundan a los sitios activos de las enzimas, al mismo tiempo que permite que estas últimas puedan sufrir cambios conformacionales los cuales son necesarios para la actividad catalítica. Un tercer efecto del agua es el de estabilizar la estructura tanto de macromoléculas como serían las proteínas así como la de las membranas celulares.

Mediante el uso de isotermas de humedad y estudios calorimétricos (66, 67) se ha encontrado que en tejidos de semillas ortodoxas existen 3 diferentes tipos de agua, cada uno de los cuales presenta distinta fuerza de unión a las superficies intracelulares como serían proteínas y membranas y se presentan con diferente grado de hidratación de los tejidos (68). Las semillas recalcitrantes por su parte carecen del agua tipo I, es decir, del agua que está muy estrechamente unida a las superficies celulares (68).

De lo descrito en la literatura en relación a los niveles de hidratación en las semillas ortodoxas se sugiere (68) que la capacidad para sobrevivir a la desecación está estrechamente ligada a la capacidad de los componentes de los tejidos para llevar a cabo una fuerte unión de agua (tipo I). Esto se ve apoyado por el hecho de que las semillas recalcitrantes, las cuales carecen de este tipo de agua, son intolerantes a la desecación.

Desecación en el desarrollo de la semilla

El desarrollo embrionario de las plantas superiores puede dividirse en 3 etapas, inicialmente se presenta un período de diferenciación de los tejidos que se caracteriza por una actividad mitótica abundante en la que se conforma la estructura general del embrión a partir del cigoto. En seguida viene la etapa de

maduración en la cual se detiene la división celular y se presenta crecimiento celular y acumulación de reservas en los tejidos de almacenamiento. Finalmente se presenta una etapa de desecación (36).

Se ha sugerido que el proceso natural de secado- el cual no requiere para iniciarse del desarrollo completo de la semilla- se presenta debido a una serie de interaciones químicas al parecer de tipo hormonal entre los tejidos maternos y la semilla y dentro de esta última entre el embrión y el endospermo que le rodea, planteándose que este evento es muy importante para establecer la autonomía de la semilla y evitar la germinación precoz de la misma sobre la planta madre (36).

La adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas durante el desarrollo de las mismas es un fenómeno aún pobremente entendido(41). Sin embargo, de las pocas evidencias que se tienen se sabe que la semilla para lograr tolerar la desecación requiere de varios ajustes metabólicos y estructurales que permiten a las células sufrir una importante pérdida de agua con un mínimo de daño. De igual forma se sabe que la semilla tolerante a la desecación requiere desarrollar la capacidad para revertir tales daños (reparación) durante la siguiente etapa de rehidratación (36).

Una característica general que se ha observado del proceso de secado de estas semillas, así como en los animales tolerantes a la desecación es que este debe ocurrir en forma lenta. De este hecho pudiera inferirse que la tolerancia a la desecación en plantas y animales depende de la síntesis de algunas moléculas protectoras durante el proceso de secado (17, 18). Esto esta apoyado por el hecho de que si la desecación es impuesta abruptamente no se observa la tolerancia a la pérdida de agua (18).

Importancia de la acumulación de solutos antes de la desecación

Cualquier organismo tolerante a la desecación incluyendo a las semillas, requiere retener cierta cantidad de agua para mantener la estructura de sus macromoléculas y membranas celulares. Se ha visto que tales organismos acumulan algunas moléculas (18) que muy probablemente les permitan realizar dicha retención de agua o sustitución de la misma (13).

Algunos animales que resisten la desecación (15, 17, 18) acumulan grandes cantidades de trealosa, llegando a constituir en algunos organismos hasta el 20 % de su peso seco. La trealosa es un carbohidrato poco usual; es el único disacárido no reductor de la glucosa, cuyos monómeros se encuentran unidos por un enlace glucosídico α 1,1. Se ha encontrado que la sobrevivencia del organismo en el estado seco correlaciona con la presencia de esta molécula durante la deshidratación o de su degradación durante el proceso de rehidratación (18).

Algunas investigaciones realizadas con modelos membranales (15, 16, 43) mostraron que cuando se añade la trealosa en cantidades similares a las encontradas en organismos que resisten la desecación, protege a las membranas durante la pérdida de agua, conservando sus características morfológicas y fisiológicas.

Se ha demostrado que la trealosa interacciona con el grupo fosfato de las cabezas polares de los fosfolípidos mediante puentes de hidrógeno sustituyendo de esta manera al agua durante la deshidratación . Esto provoca que los lípidos secos en presencia de trealosa tengan propiedades similares a los lípidos hidratados y sean estables (15, 16, 17). Se ha encontrado trabajando *in vitro* que sin trealosa la remoción de agua altera en gran medida las propiedades físicas de los fosfolípidos de los sistemas membranales, conduciendo a eventos dañinos como serían las transiciones de fase, de una líquida cristalina a una fase de gel, la fusión membranal y la formación de una fase hexagonal II en

lugar de existir una bicapa cristalina cuando las membranas son abundantes en fosfatidilcolina (17, 18, 19).

Por lo anterior se ha sugerido que uno de los posibles papeles de la trealosa durante la desecación de organismos tolerantes a la misma sería la de estabilizar y proteger a las membranas biológicas, reemplazando al agua, las cuales constituyen las estructuras que sufren primordialmente daño durante la desecación. Por otro lado se ha encontrado que además de la trealosa otros carbohidratos son capaces de proteger las membranas durante su desecación. Glucosa tiene también capacidad protectora pero menor que la que presentan sacarosa, maltosa y trealosa (41). Crowe en 1987 encontró que trealosa y maltosa son significativamente más efectivos que sacarosa para estabilizar vesiculas unilaminares y membranas biológicas(17).

Sin embargo no se ha reportado la presencia de trealosa en semillas y polen de angiospermas en donde incluso puede ser tóxica para muchas de estas plantas (65). De tal manera que era necesario encontrar una explicación alternativa para la protección de estas estructuras reproductoras que pueden sobrevivir a la desecación sin perder viabilidad.

En el polen (34) se ha encontrado que la adquisición de la tolerancia a la desecación correlaciona con un aumento en la degradación de almidón y una acumulación de sacarosa sin ningún cambio en la composición de los fosfolípidos de la membrana por lo cual se concluye que en esta estructura de reproducción la sacarosa quizá juega un papel esencial en la adquisición de la tolerancia a severa pérdida de agua.

Por otra parte la sacarosa está presente en casi todas las semillas (1), localizándose junto con otros oligosacáridos en el embrión en donde durante la germinación actúa como un nutriente de rápida utilización.

De la misma forma se ha demostrado con modelos membranales *in vitro* que la sacarosa es también efectiva aunque en menor grado

que la trealosa, para proteger membranas durante su desecación (10 , 17) debido a esto la posibilidad de su participación en la tolerancia a la desecación de semillas y polen resulta muy atractiva. Sin embargo una complicación para esta propuesta resulta del hecho que la sacarosa a diferencia de la trealosa tiene gran tendencia a cristalizar en condiciones de bajo contenido de humedad.

Hace algunos años Smythe (63) encontró que la adición de oligosacáridos como rafinosa y miembros de la familia de la rafinosa reducen en forma considerable la formación de los cristales de sacarosa; además se sabe que la rafinosa es abundante en semillas que toleran la desecación.

Caffrey *et al* (10) encontraron en experimentos realizados *in vitro* con un modelo de membranas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) que una mezcla conteniendo una relación 1/1/0.3 de DMPC/sacarosa /rafinosa protege efectivamente contra la destrucción de membranas durante su desecación, por una interacción de la sacarosa con las membranas de una manera similar a la de la trealosa y en donde la rafinosa no permite la cristalización de la sacarosa. Este y algunos otros trabajos (38) sugieren que este puede ser el papel *in vivo* de la rafinosa.

Carbohidratos y la formación del estado vitrificado

El hecho de que las semillas sobrevivan a desecación extrema, sugiere que el mecanismo de tolerancia a la desecación tendría que otorgar protección no solo a las membranas sino también al citoplasma ya que la desecación extrema de éste, podría resultar en la cristalización de las sales y proteínas ahí contenidas lo cual tendría efectos dañinos en la sobrevivencia de la semilla.

Burke 1986 (9) fue el primero en sugerir que la adaptación a la desecación pudiera involucrar la vitrificación del citoplasma. Dado que las semillas poseen un alto contenido de azúcares, se

planteó que el citoplasma pudiera estar protegido durante la desecación por la adquisición de un estado de vitrificación.
Conforme una solución se va concentrando al secarla, los solutos pueden cristalizar o la solución puede adquirir un estado supersaturado acompañado de un aumento en la viscosidad. Cuando la viscosidad aumenta tanto que impide la difusión del agua, la solución adquiere las propiedades mecánicas de un plástico sólido. La solución en este estado se dice que se encuentra en estado vitrificado (9). Entonces la formación de un estado vitrificado no involucra cambio químico alguno sino unicamente cambio físico.
El estado vitrificado puede ser formado como se dijo anteriormente por un aumento en la concentración de las soluciones o bien por una disminución de la temperatura, por ello su existencia es dependiente de la temperatura. Es decir, una solución que existe en estado vitrificado a una temperatura dada, se fundirá a una mayor temperatura pasando a un estado de mayor liquidez con posibilidades de cristalización (9).
Los beneficios de que se forme un estado vitrificado en un organismo que pierde agua son muchos:
por un lado evita la pérdida del última agua remanente durante la desecación de la semilla, y por otro evita reacciones químicas que requieren difusión asegurando estabilidad durante la latencia. Además al ocupar espacio quizá esté evitando el colapso celular y que se acumulen sustancias dañinas (radicales libres). Por último probablemente permita la permanencia de enlaces de hidrógeno entre el vitrificado y las superficies hidrofílicas de la célula.
Estudios calorimétricos realizados en embriones secos de maíz (75) indicaron la presencia de 2 tipos de señales de vitrificación, una de las cuales es atribuída a los lípidos y otra a las fracciones no lipídicas.
Williams y Leopold (75) propusieron que los azúcares solubles -(sacarosa y rafinosa) del embrión- los cuales representan hasta el 20 % del peso seco del mismo (38) y que tienen una fuerte

tendencia a formar un estado vitrificado en bajos contenidos de humedad, quizá eran los responsables de la formación del estado vitrificado no lipídico. La presencia del estado vitrificado también demostrada por Bruni *et al* en semillas de soya (8).

Por otro lado Koster (39) mediante estudios calorimétricos demostró que *in vitro*, mezclas de azúcares similares a las encontradas en ejes tolerantes a la desecación (85 % de sacarosa y 15 % de rafinosa) (38) son capaces de formar estado vitrificado a temperatura ambiente (21°C), mientras que mezclas similares a las encontradas en ejes que no toleran desecación (75 % de glucosa y 25 % de sacarosa) (38) solo vitrifican en temperaturas abajo de cero. También encontró que sacarosa por sí sola forma estado vitrificado a temperatua ambiente (14°C), sin embargo tal habilidad se ve afectada fuertemente por su gran tendencia a cristalizar en bajos contenidos de humedad.

El hecho de que el estado vitrificado esté presente a temperatura ambiente en mezclas de azúcares (6 sacarosa/ 1 rafinosa) que son similares a las encontradas en maíz, es importante ya que esta es generalmente la temperatura a la cual se desecan las semillas. Además, el hecho de que la mezcla de azúcares parecida a la encontrada en los organismos tolerantes a la desecación nunca cristalizara (39), apoya la hipótesis de que los oligosacáridos pueden prevenir la cristalización de la sacarosa en los ejes secos promoviendo así la formación de la vitrificación.

Por todo lo anteriormente descrito quizá las propiedades de los azúcares que forman el estado vitrificado sean dominantes en el comportamiento del embrión durante la desecación y probablemente participen en la tolerancia a la desecación en semillas.

Apoyando tal participación está el hecho de que la trealosa es reconocida también como una molécula que puede formar estado vitrificado en bajos contenidos de humedad (54, 76). Otro aspecto importante de los azúcares que estaría relacionado con su supuesta participación en la protección del citoplasma sería que algunos de

ellos por sí solos o junto con ciertos iones divalentes, estabilizarían proteínas solubles cuando son desecadas (17, 24). A pesar que el papel del zinc y otros iones no es conocido, se ha encontrado que la estructura cuaternaria de algunas proteínas se estabiliza en presencia de zinc (17).

En cuanto al mecanismo de protección de proteínas en sistemas con bajo contenido de agua por trealosa, se ha sugerido fuertemente que hay una interacción directa entre el soluto y la proteína durante la deshidratación (20). Es decir, hay una extensiva formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de la trealosa y los residuos polares en la proteína que preservan el estado conformacional de esta última en forma similar a la que mostraba antes de su deshidratación. Esto fue evidenciado por estudios de espectroscopía de infrarrojo de mezclas de proteínas y trealosa (11, 20).

Proteinas y tolerancia a la desecación

En la mayoría de las plantas superiores la tolerancia a la deshidratación está restringida a las semillas. Sin embargo como ya fue mencionado, éstas no siempre son tolerantes a la desecación, adquiriendo esta capacidad después de su etapa de maduración.

Durante su desecación la semilla acumula ácido absícico (ABA), dicha acumulación pudiera ser debida a una síntesis de novo (32, 71). El ABA es una fitohormona caracterizada como un sesquiterpeno derivado del mevalonato, la cual fue descubierta en la década de 1950. Originalmente esta fitohormona fué unicamente asociada con la absición y latencia de los brotes, posteriormente ha sido implicada en muchos procesos fisiológicos de la planta adulta y en el control de muchos eventos durante la embriogénesis y formación de la semilla incluyendo morfogénesis embrionaria (62), síntesis de proteínas (algunas de las cuales son de almacenamiento, 28),

tolerancia a la desecación, además de mantener la latencia de la semilla (62, 71). Sin embargo, a pesar de lo anteriormente mencionado, en la actualidad aún es controversial si es ABA o es el estrés osmótico (potencial osmótico reducido) operando mediante la intervención de ABA el que controla la latencia de la semilla (29, 36, 45).

Estudios de desarrollo han mostrado que ABA induce la acumulación de RNA mensajeros específicos y proteínas durante la embriogénesis tardía de semillas de diversas especies (2, 42). En semillas de cereales, algunos de los RNA mensajeros de desarrollo tardío presentan una larga vida estando presentes en la madurez y en el período de desecación pero son rápidamente degradados en la germinación de la semilla (31).

Poco se conoce sobre las funciones de las proteínas inducibles por ABA o acerca de su localización intracelular. Algunas de ellas son polipéptidos de almacenamiento (28) mientras que otros son inhibidores enzimáticos (62) y al parecer están involucrados en la protección de la semilla durante la desecación y/o manteniendo la latencia.

Recientemente mucha atención se ha dado a los genes "lea" por sus siglas en inglés (late embryogenesis abundant) los cuales se expresan abundantemente en la fase tardía de la embriogénesis. Muchas de las proteínas lea, las cuales representan un grupo diverso de proteínas (que son codificadas muchas veces por pequeñas familias de multigenes) son fuertemente hidrofílicas (27).

Basado en su regulación y su peculiar secuencia de aminoácidos (alto contenido de aminoácidos neutros e hidroxilados) se ha sugerido que estas proteínas juegan un papel importante en la tolerancia a la desecación como osmoprotectores o como proteínas reparadoras del daño por desecación (26, 27).

Los niveles de estas proteínas y sus RNA mensajeros son más abundantes justo antes de la desecación terminal del embrión, pero pueden ser inducidos en embriones inmaduros cuando son incubados

en ABA (27, 44). Recientes trabajos muestran una correlación entre la expresión de ciertos genes leas y el desarrollo de la tolerancia a la desecación en embriones (27, 44).
Se ha encontrado que algunos de los genes que se sintetizan durante la embriogénesis tardía (lea) también están presentes en tejidos vegetativos de plantas sujetas a estrés hídrico (26).
Existen otros tipos de estrés a los que se puede enfrentar la planta y que son semejantes a la desecación que sufre la semilla, entre ellos se encontrarían el estrés de sequía, el salino, el de calor y el de frío. En todos ellos el efecto común es la pérdida de agua que en menor o mayor grado sufren los tejidos. Al parecer ante todos estos tipos de estrés las células vegetativas presentan mecanismos similares de respuesta.
Entre las semejanzas que se pueden apreciar se encontrarían la aparición de ciertos polipéptidos inducidos casi siempre por ABA. Tales polipéptidos reciben diferentes nombres dependiendo del tipo de estrés que estimula su aparición, tal es el caso de los péptidos "rab" que aparecen durante el estrés salino y la desecación de algunos tejidos vegetativos de ciertas plantas, pero también se presentan durante el desarrollo tardío de la semilla (62). Otros ejemplos serían las proteínas de heat shock (62) inducidas por altas temperaturas (62) y los péptidos "cor" inducidos por frío (73), no encontrándose en el caso de los dos últimos ejemplos la necesidad de elevados niveles de ABA para su inducción. Sin embargo se ha encontrado en cultivos celulares que ABA altera la poza de RNA mensajeros durante la inducción de su tolerancia a la congelación.
Además se ha visto que en estrés de frío se acumulan también azúcares y prolina (37, 50), los cuales tienen efectos crioprotectores para membranas y proteínas libres (12, 58, 59).
Por último se ha demostrado que modificaciones en la composición de lípidos de la membrana (35) contribuyen directamente a la tolerancia a la congelación en las células vegetativas. Ahora bien

para el caso de semillas se sugiere que un probable mecanismo para la adquisición de la tolerancia a la desecación cuando el secado se realiza a temperaturas altas, es un cambio de los fosfolípidos constituyentes de la membrana y una mayor saturación de sus ácidos grasos (22).

Hipótesis de reparación

Además del mecanismo de protección a la desecación que se ha venido exponiendo, existe una hipótesis alternativa llamada de reparación que se fundamenta en observaciones hechas sobre la resistencia a perder agua de plantas poilkilohídricas ó aquellas que resisten desecación de sus estructuras vegetativas como serían líquenes, briofitas y algas etc (47, 48).
Esta hipótesis se apoya principalmente en observaciones hechas en musgos resistentes a la desecación los cuales no sintetizan péptidos durante su desecación pero si lo hacen durante su rehidratación. Dichos péptidos se ha propuesto que podrían tener la función de la reparación del daño celular causado por la pérdida de agua. Sin embargo tal hipótesis aún no es bien aceptada (47, 48).

DETERIORO DE LA SEMILLA

Todo lo anteriormente mencionado muestra que la tolerancia a la desecación es un fenómeno muy extendido; pero hablando ya específicamente de las semillas ortodoxas, este fenómeno permite que se realice la desecación que aunque dañina en apariencia, es una experiencia necesaria para tales semillas. Cuando las semillas terminan su período de desecación fisiológica son cosechadas y cuando no requieren de ser utilizadas de inmediato, se almacenan.

Durante tal almacenamiento las semillas se van deteriorando o lo que es lo mismo van perdiendo calidad; es decir, cada vez presentan menores niveles de vigor y viabilidad hasta que finalmente mueren. La velocidad con la que las semillas van perdiendo calidad depende de 2 factores: las condiciones de almacenamiento que constituyen el factor más importante y las características genéticas de la propia semilla (49, 61).

Las condiciones de almacenamiento, especialmente la temperatura y la humedad relativa, determinan la velocidad de deterioro de las semillas(56, 70). Las semillas conservarán durante mayor tiempo su calidad cuando se almacenan en lugares con baja temperatura y baja humedad relativa (53, 70), que cuando son conservados en alta temperatura y alta humedad relativa.

En condiciones similares de almacenamiento, las semillas pertenecientes a diferentes especies o inclusive de diferentes variedades dentro de la misma especie, se deterioran a diferente velocidad. Es decir, la velocidad de deterioro es dependiente de la especie y de la variedad (52).

El deterioro de las semillas durante el almacenamiento es un fenómeno muy complejo que involucra cambios en muchos componentes de la semilla (4, 5). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se llevan a efecto dichas modificaciones son poco entendidos. Ahora, bien el hecho de que en las condiciones de almacenamiento el metabolismo está restringido (70) sugiere que la mayoría de las reacciones de deterioro son azarosas.

Una semilla deteriorada manifiesta un incremento en la salida de electrolitos y solutos durante su imbibición, comparada con una semilla control (49). Debido a ello se ha propuesto que el daño de membranas sería uno de los eventos más importantes para la pérdida de la calidad de la semilla (30, 33).

El mecanismo por el cual las membranas biológicas sufren daño durante el almacenamiento no es claro. Sin embargo se ha planteado por un lado que el daño puede ser ocasionado por cambios

bioquímicos y físicos de los fosfolípidos componentes de la membrana o por un decremento de los mismos (3, 53).

Vertucci (1992) (69) reportó recientemente usando estudios calorimétricos que en 14 especies almacenadas en condiciones adversas, entre ellas maíz, hay cambios en los componentes lípidicos de las semillas y tales cambios podrían ser asociados con pérdida en la viabilidad de la semilla durante el almacenamiento. También se ha visto que hay un decremento en los niveles de fosfolípidos en las semillas envejecidas; tal observación ha sido explicada como que los lípidos hubieran sido degradados por enzimas lipolíticas o a que hubieran sufrido peroxidación (69).

Previamente ya había sido sugerido que la peroxidación de lípidos podría ocurrir vía formación de radicales libres (30). Sin embargo a la fecha esta observación es aún controversial.

Este daño a membranas podría ser causado debido a una pérdida de protección directa de la membrana o desprotección del citoplasma, lo que provocaría un aumento en las reacciones azarosas que traería como consecuencia una mayor concentración de productos dañinos como radicales libres con el subsecuente daño a membranas.

Hay reportes de que los carbohidratos solubles generalmente declinan con el envejecimiento de la semilla (3, 5). Tal modificación podría dañar a la semilla de 2 maneras: por una parte provocaría una pérdida de los efectos protectores de tales moléculas hacia las estructuras celulares y por otra limitaría la disponibilidad de sustratos respiratorios para el embrión durante las primeras horas de la germinación.

HIPOTESIS

Los carbohidratos solubles presentes en el embrión de la semilla seca desempeñan dos funciones:
1) Como sustratos para el desarrollo del embrión durante la germinación y 2) como compuestos protectores de la integridad membranal y de las macromoléculas en el estado seco. Durante el almacenamiento las semillas se van deteriorando lo cual se manifiesta con una disminución en la viabilidad y vigor así como en una perdida de integridad membranal, lo anterior pudiera deberse a que durante el almacenamiento el contenido y tipo de carbohidratos del embrión se modificase.
Por lo anterior los niveles y tipo de carbohidratos solubles, presentes en el embrión podría dar un índice de la calidad y sensibilidad al deterioro de la semilla en el almacén.

OBJETIVOS

Para probar la hipótesis anterior, se planteó realizar lo siguiente :

1. Cuantificar en 5 diferentes cultivares de maíz su calidad inicial y el efecto de distintos períodos de almacenamiento, en condiciones adversas, sobre dicha calidad.

2. Cuantificar el contenido de carbohidratos solubles en el embrión de diversos lotes de maíz, antes y durante el almacenamiento.

3. Determinar si hay alguna relación entre los niveles y tipo de carbohidratos solubles en el embrión y la calidad de la semilla.

MATERIAL Y METODOLOGIA

MATERIAL BIOLOGICO

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 5 cultivares de maíz. A_6= CPS-HT-1 (HT-1), un híbrido trilineal proporcionado por el Dr. A. Carballo del Colegio de Posgraduados y 4 accesiones del CIMMYT : Pepitilla 49 (P_{49}), Pepitilla 1346 (P_{1346}), Tepecintle 5963 (T_{5963}) y Tepencintle 100 (T_{100}). T_{5963} y T_{100} fueron caracterizados por CIMMYT como materiales con buenas características de almacenamiento mientras que P_{49} y P_{1346} con malas características (información proporcionada por el Dr. Taba director del banco de germoplasma de maíz de CIMMYT). Al inicio de este trabajo A_6 no se había caracterizado en cuanto a su comportamiento en almacén.

Desde su recepción las semillas se almacenaron a 4°C en frascos cerrados y se tomaron como lote control.

Lotes de semillas control fueron deteriorados por almacenamiento a 30°C y 75 % de humedad relativa durante 1, 2, 3, 4 y 5 meses (Baskin, 1977) (4, 61). A cada lote deteriorado se le determinó el contenido de humedad (70) y se almacenó a 4°C.

CARACTERIZACION FISIOLOGICA DE LA CALIDAD DE LA SEMILLA

1. Desinfección y germinación de las semillas

Previo a la desinfección y para evitar daño por imbibición (57) las semillas se incubaron por 12 horas en una atmósfera de 100 % de Humedad Relativa a 25°C.

Para desinfectar las semillas, estas se incubaron con $HClO_3$ (Cloralex) al 3.5 % durante 2.5 minutos y se enjuagaron con abundante agua desionizada estéril. 15 semillas desinfectadas se colocaron en cajas de Petri estériles de 10 cm de diámetro conteniendo 2 circulos de papel Whatman 1. A cada caja se le adicionaron 10 ml de H_2O estéril. Las cajas conteniendo las semillas y selladas con papel parafilm se colocaron en una estufa a 25± 1°C.

En algunas determinaciones (lotes deteriorados por 4 meses) las semillas no fueron desinfectadas y se germinaron en papel filtro colocado sobre vermiculita o se sembraron directamente en vermiculita, en ambos casos la vermiculita se hidrató por 24 horas antes del experimento.

2. Cuantificación de la viabilidad , velocidad de germinación y crecimiento de la plantula.

La viabilidad de cada lote de semillas fué determinada como el porcentaje de germinación a las 72 horas después de iniciada la imbibición. Se consideró que una semilla habia germinado cuando la radicula protruyó a través de la testa. La velocidad de germinación se reporta como el TG50, es decir el tiempo que tarda en germinar el 50 % de las semillas de un lote. Tal valor se obtuvo a partir de la linearización de la cinética de germinación. La cinética se obtuvo mediante la cuantificación del número de semillas que iban germinando cada 2 horas durante las primeras 26 horas de imbibición y posteriormente a las 36, 48, 60 y 72 horas. La curva obtenida se linearizó mediante la conversión de % de germinación en probits y el regraficamiento de los datos probit *vs* logaritmo del tiempo de germinación. En esta última gráfica por interpolación se determinó el logaritmo del tiempo de germinación correspondiente a un probit de 5 (valor de probabilidad de que ocurra un 50 % de germinación) y de dicho valor se le obtuvo el

antilogaritmo el cual corresponde al T650. En la figura 1 se muestra un ejemplo.
Las semillas embebidas por 60 horas en caja de Petri se pasaron a tacos (5,61).
Los tacos se elaboraron con hojas dobles de papel de estrasa de 32 X 21 cm, las cuales se enrollaron una vez que se colocaron las semillas germinadas en uno de sus extremos a 7 cm del borde. Los tacos se colocaron en vasos de precipitado de plástico de 1 litro de capacidad que contenían agua hasta una altura de 5 cm. El vaso se cubrió con otro vaso invertido de iguales dimensiones y se selló con parafilm para evitar la pérdida de agua por evaporación.
Se hizo una revisión de la apariencia de las semillas a las 90 horas de germinación para ver si estaban libres o no de hongos; las plántulas contaminadas se eliminaron.
A los 7 días de crecimiento se cuantificó el peso seco alcanzado por la canopia y la radícula. Para ello se colocó en frascos de cristal, por un lado la radícula, por otro la canopia. Estos frascos se colocaron en una estufa a 90°C hasta peso constante. El peso acumulado por la plántula durante el crecimiento se obtuvo por la diferencia entre el peso seco de la plántula a los 7 dias de crecimiento y el peso seco que presentaba el embrión antes de la germinación. El peso seco del embrión se determinó en estufa (61).

3. Cuantificación de la salida de electrolitos

Se pesaron 5 semillas (acondicionadas) de cada cultivar tanto del lote control como de diversos tiempos de almacenamiento.
Las semillas se colocaron en un tubo de ensayo con capacidad para 40 ml. que contenía 25 ml de H_2O desionizada a 30°C. Esta temperatura se mantuvo durante toda la determinación.

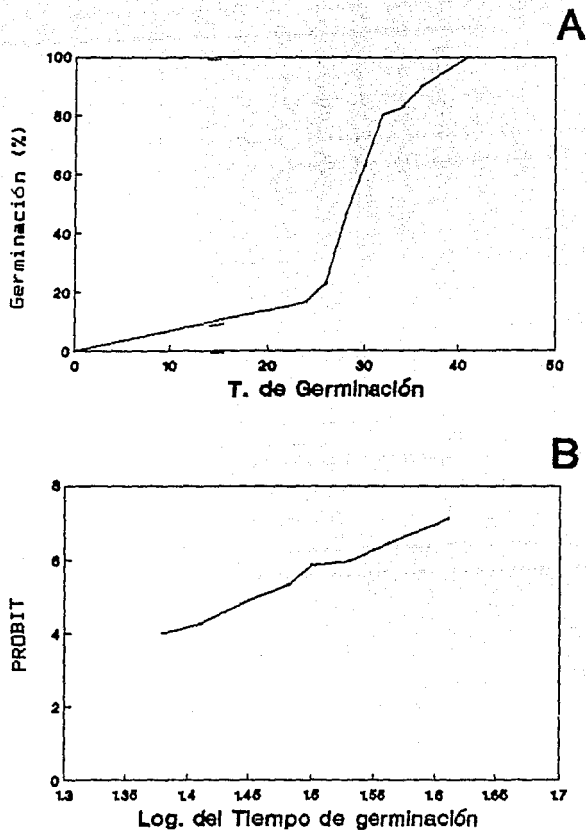


Fig. 1 Linealización de las cinéticas de germinación para la obtención del TG50 del lote control de Tepecintle 100.

A) Cinética de germinación

B) Gráficas linealizadas mediante el uso de probits y logaritmo del tiempo de germinación.

Para las determinaciones de conductividad se utilizó un conductímetro (Metrohm Herisau E 518) equipado con una celda de conductimetría (Metrohm) con una c= 0.017 cm^{-1}.

Se midió la conductividad del agua antes de agregar las semillas e inmediatamente después haber hecho esto. Posteriormente las determinaciones de la conductividad se hicieron cada 10 minutos hasta alcanzar las 2 horas, a partir de tal momento las siguientes cuantificaciones se hicieron a las 4, 6, 8 y 23 horas de remojo de las semillas. Después de este tiempo en el sobrenadante se cuantificaban los carbohidratos presentes por el método de fenol-H_2SO_4 (25).

La salida de electrolitos se expresó relacionando la conductividad y el peso seco de cada semilla (30, 61).

DETERMINACION DE LIPIDOS

90 embriones liofilizados y molidos en un mortero a polvo fino se deslipidizaron con eter etílico en un equipo soxhlet por 3 días a 60°C (46).

Al término de este tiempo la harina se pesó y se guardó a -70°C. La diferencia entre este peso y el que tenía la harina antes de ser deslipidizada se tomó como el contenido de lípidos de los embriones.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

1. Cuantificación de carbohidratos solubles en agua por el método de fenol-H2SO4. (25)

Se pesaron 20 mg de harina deslipidizada de 4 cultivares (no se realizó en T_{100}, debido a falta de material biológico) se les agregó 5 ml de H_2O y se pusieron a ebullición por 10 minutos. Se tomaron 25 μl de la muestra, se agregó agua hasta completar 1ml y

se le añadió 0.6 ml de fenol al 5% y 3.6 ml de H_2SO_4 concentrado. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se leyó en el espectrofotómetro a 485 nm.

2. Obtención de carbohidratos solubles en etanol al 75 % de harina deslipidizada de embriones

Cincuenta mg de harina deslipidizada y un poco de arena de mar (Merck), se colocaron en un mortero y se homogenizaron con un ml de etanol al 75 % conteniendo 500 μg de manitol como estándar interno . El homogenado se transfirió a un tubo corex. El mortero se lavó con 4ml de etanol al 75 % los cuales se adicionaron al tubo de ensayo del homogenado. El homogenado se centrifugó a 3000 rpm x 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga de mesa. El sobrenadante se secó a 75 °C. y el residuo se resuspendió en 1 ml de agua ultrapurificada (propia para inyectables).
Para eliminar fenoles y partículas cargadas, la muestra de azúcares se filtró a través de una columna empacada con 0.5 ml de polyvinylpirrolidona, 0.5 ml de Amberlita IRA y 1 ml de Dowex. El flujo de la columna fué 1 ml/ min (7).
Previo a la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 10 ml de agua ultrapura. En un vial se colectaron los 5 primeros mililitros eluidos de la columna y se liofilizaron. Experimentos preliminares mostraron que toda la muestra salía de la columna en dicho volúmen. Una vez liofilizada, la muestra de azúcares se tapó hermeticamente y se guardó en un desecador hasta su utilización.

2.1 Determinación de los azúcares de la muestra por cromatografía de gases.

La cuantificación de azúcares solubles se realizó por Cromatografía de gases. Se utilizó una columna capilar de

fenilmetilsilicón de 25 m de longitud y 25 mm de diámetro y 0.25 μm de película.

Las muestras de azúcares liofilizadas se derivatizaron añadiéndoles 500 μl de tri-sil Z (PIERCE) e incubándolas a 70°C por 30 minutos. Al término de los mismos la muestra se enfrió en hielo.

Un μl de la muestra derivatizada se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

La temperatura del detector y el inyector fué de 300°C. Para lograr una mejor resolución de los picos, la temperatura de la columna se programó en la siguiente secuencia : Temperatura inicial 100°C, tiempo inicial, 0 minutos. Velocidad de calentamiento 10°C / minuto. Temperatura final 280°C, tiempo a esta temperatura final, 5 minutos.

Se utilizó para la determinación un detector de ionización de flama.

Utilizando el factor de respuesta relativo (FRr) obtenido para cada uno de los azúcares y la presencia del manitol como estándar interno, se pudo establecer la cantidad real de cada tipo de azúcar presente en las diferentes muestras de cada lote de maíz. Para ello se utilizó la siguiente relación:

$$[A'] = \frac{\text{Area } A'}{FR_r} \times \frac{[\text{Manitol}]}{\text{Area del manitol}}$$

donde:

$[A']$ = es la concentración de alguno de los azúcares presente en la muestra de harina de embriones de maíz.

Area A' = Area del azúcar A que se obtiene a partir del cromatograma.

$[\text{manitol}]$ = Concentración del manitol (estándar interno) añadido a la muestra.

Area del Manitol = Area del manitol (estándar interno) obtenida a partir del cromatograma.

FRr = Es una relación que se obtiene de la respuesta del detector hacia un azúcar particular y la mostrada hacia el manitol. Este valor es característico para cada tipo de azúcar y se obtiene utilizando una mezcla de azúcares estándares en una concentración conocida. En este caso se utilizaron estándares de glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, rafinosa y manitol.

$$FRr = \frac{\text{Area } A}{[A]} \times \frac{[\text{Manitol}]}{\text{Area del Manitol}}$$

Donde :

Manitol y Area del manitol son similares a lo expresado en la parte superior.

[A] = Es la concentración conocida del azúcar A presente en la mezcla de azúcares estándares.

Area A = Area del azúcar A que se obtiene a partir del cromatograma

Posteriormente se calculó la cantidad de los diferentes azúcares presentes en 1 gramo de harina deslipidizada de embriones de maíz.

ANALISIS ESTADISTICO

Para el anáalisis estadístico de los resultados se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Prueba de Tukey) $\alpha = 0.05$, desarollado mediante el paquete estadístico SAS (60, 77).

RESULTADOS

Calidad de lotes control

La calidad inicial de la semilla (tiempo cero de almacenamiento TA= 0) se determinó a través de cuantificar diversos parámetros fisiológicos recomendados por la ISTA (International seed testing association) como son: viabilidad expresada como el porcentaje de semillas que germinaron en 72 horas; velocidad de germinación a través de la determinación del TG50 que indica el tiempo en horas requerido para que el 50 % de las semillas de una muestra germinen, por lo que el lote de semillas con un TG50 menor indica una semilla de mayor calidad; capacidad de crecimiento de la plántula medido como la acumulación de peso seco después de 7 días de germinación y la salida de metabolitos de la semilla durante su remojo.

Los 5 cultivares aquí estudiados mostraron una viabilidad (fig. 2, TA=0), una velocidad de germinación (TG50) (fig. 3, TA=0) y una capacidad de crecimiento (tabla I) similar que fué de 97%, 29 horas y 0.08g / plántula respectivamente.

Herter *et al* (33) y otros (61) han reportado que la salida de electrolitos es mayor en semilla dañada o deteriorada que en semilla de buena calidad. En este trabajo la cuantificación de la salida de iones y azúcares de los diferentes lotes de semillas se realizó en el agua en que estas habían sido remojadas por diferentes tiempos pero se reporta solo el dato registrado a las 23 horas; este tiempo de remojo es en el cual se ha reportado una mejor correlación entre la salida de electrolitos y la germinación, (33). Se encontró que la salida de iones y azúcares fué diferente en los distintos cultivares antes de ser

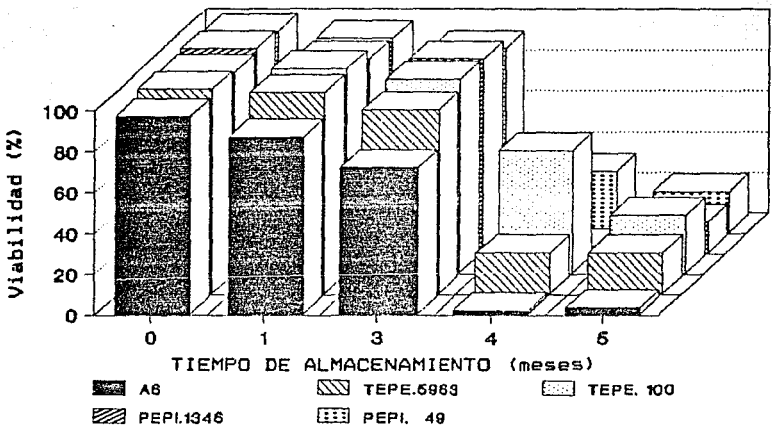


Fig. 2 Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de 5 cultivares de maíz. Las semillas se germinaron a 25°C por 72 horas.
El almacenamiento fué a 30°C y 75 % de humedad relativa

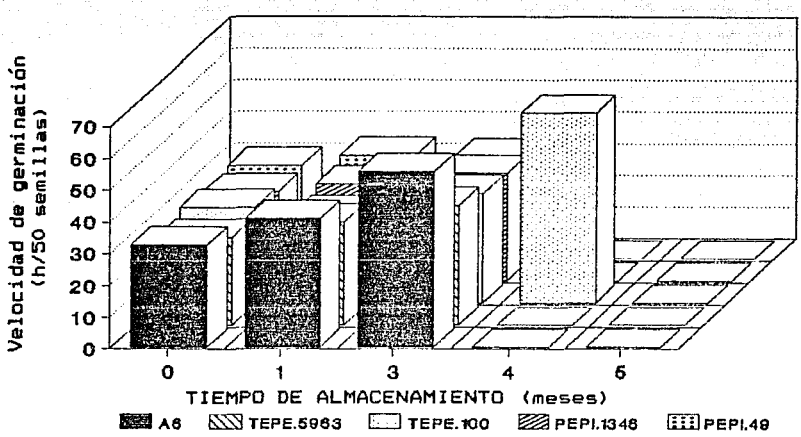


Fig. 3 Efecto del almacenamiento sobre la velocidad de germinación a 25°C de las semillas de 5 cultivares de maíz.
El almacenamiento fué a 30°C y 75 % de humedad relativa.

TABLA I ACUMULACION DE PESO SECO EN PLANTULAS DE MAIZ

CULTIVAR	ACUMULACION DE PESO SECO (g)
TEPECINTLE 5963	0.064 ± 0.009
TEPECINTLE 100	0.057 ± 0.012
A_6	0.078 ± 0.018
PEPITILLA 1346	0.049 ± 0.019
PEPITILLA 49	0.058 ± 0.010

La acumulación de peso seco está dada por cada plántula. Los resultados son estadísticamente similares (α= 0.05) El tiempo de crecimiento de las plántulas fué de 7 días a 25°C. Los datos reportados corresponden a tres repeticiones cada una por duplicado.

almacenados. En los materiales T_{100}, T_{5963} y A_6 se presentó una baja salida de ambos casi 3 veces menor que la mostrada por P_{1346} y P_{49} (Figs.4 y 5, TA=0).

Efecto del almacenamiento en la viabilidad y vigor de las semillas

El contenido de humedad de las semillas se incrementó durante su almacenamiento (Fig. 6). La magnitud y la cinética de este incremento fué cultivar dependiente. En P_{1346}, P_{49} y T_{100} este parámetro aumentó en forma paulatina de forma tal que a los 5 meses de almacenamiento el contenido de humedad fué 30 % mayor que en el control. En A_6 el contenido de humedad aumentó abruptamente durante el primer mes de almacenamiento y luego se mantuvo constante, mientras que en T_{5963} el contenido de humedad se incrementó tanto al mes como a los 5 meses de almacenamiento.
El almacenamiento disminuyó la viabilidad, la velocidad de germinación y con ello vigor de todos los cultivares. Sin embargo, la magnitud del deterioro y el tiempo de almacenamiento al cual se presentó fué diferente para cada material. La viabilidad y el vigor del cultivar A_6 disminuyeron respecto al control a partir del primer mes de almacenamiento (Figs.2 y 7) mientras que la velocidad de germinación (TG50) aumentó ligeramente (Fig. 3) durante el mismo lapso de tiempo.En el resto de los cultivares se requirieron 3 meses ó más de almacenamiento para observar un decremento significativo en la velocidad de germinación y el vigor de la semilla (figs. 3 y 7) y para que la viabilidad disminuyera en forma importante se requirieron cuando menos de 4 meses de almacenamiento (Fig. 2)
De acuerdo a los resultados anteriores los cultivares aquí empleados se clasificaron de acuerdo a la rapidez con la cual perdían sus características de viabilidad, velocidad de

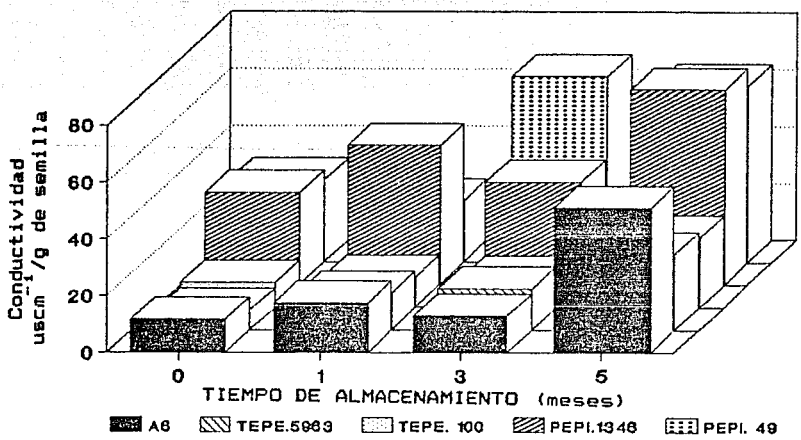


Fig. 4 Efecto del almacenamiento sobre la salida de iones en el agua de remojo[a] de las semillas de diferentes lotes de 5 cultivares de maíz.

a = el remojo se desarrolló por 23 horas a 30°C.

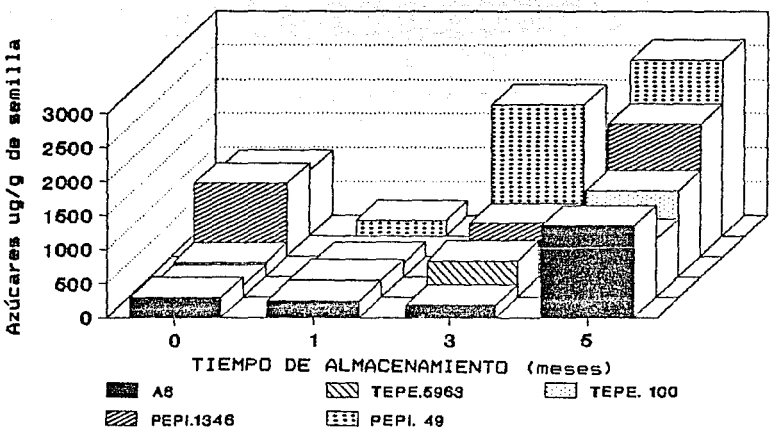


Fig. 5 Efecto del almacenamiento sobre la salida de azúcares en el agua de remojo[a] de las semillas de diferentes lotes de 5 cultivares de maíz.

a = el remojo se desarrolló por 23 horas a 30°C.

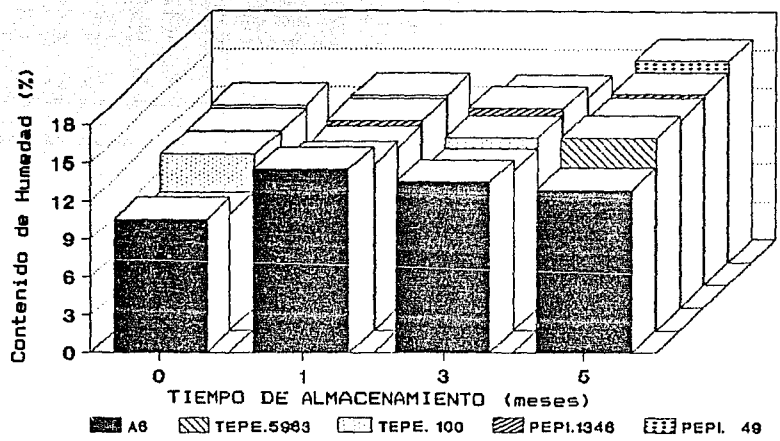


Fig. 6 El contenido de humedad se determinó a 5 cultivares de maíz, los cuales fueron sometidos a diferentes tiempos de almacenamiento en condiciones desfavorables de temperatura (30°C) y 75 % de humedad relativa

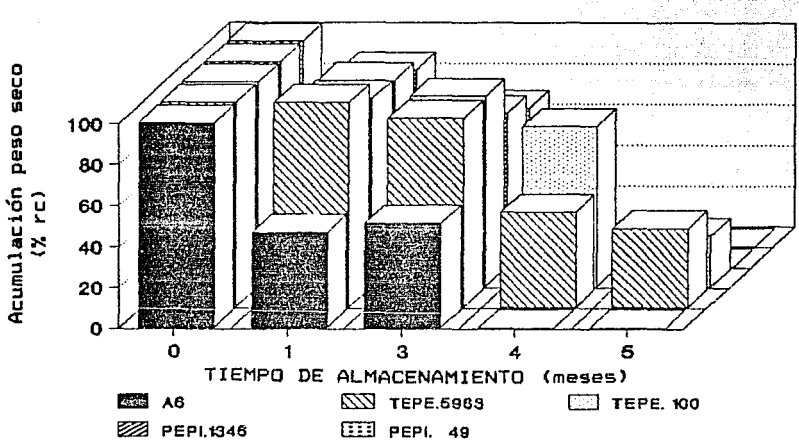


Fig. 7 Efecto del almacenamiento sobre la acumulación de peso seco a 7 días de germinación reportado como % respecto al control (% rc). La germinación y el crecimiento fueron a 25°C.
El almacenamiento se realizó a 30°C y 75 % de humedad relativa.

germinación y vigor y así se obtuvo que A_6 se deterioró más rápido en el almacén que los otros 4 cultivares y de estos P1346 y P49 lo hacen a su vez más rápido que T_{5903} y T_{100}.

En relación a la salida de electrolitos a los 5 meses de almacenamiento en todos los cultivares se detectó un aumento considerable en la salida de iones (fig. 4). Sin embargo tal aumento fué mayor en P_{1346}, P_{49} y A_6 donde de 30 $\mu s\ cm^{-1}/g$ de semilla en el lote control pasó a 70 μscm^{-1}. En comparación T_{100} y T_{5903} apenas llegaron a la salida de iones que se observaba en los pepitillas y en A_6 antes de ser almacenadas pasando de 7 a 25 $\mu cm^{-1}/g$ de semilla (fig. 4).

Lo mismo ocurrió en el caso de los azúcares, es decir la salida de carbohidratos se incrementó respecto al control solo hasta que la semilla había sido almacenada por un periodo de tiempo superior a 3 meses (fig. 5).

De los resultados anteriores se puede concluir que los 5 cultivares empleados en este trabajo mostraron un mismo índice de calidad de semilla antes de ser almacenados y que su sensibilidad al deterioro en el almacén fué diferente siendo el más sensible A_6 y T_{100} el más resistente.

El hecho de que los cultivares tuvieran graves problemas para germinar después de los 4 meses de almacenamiento y esto estuviera acompañado con una abundante salida de iones como se mostró a los 5 meses de almacenamiento -no cuantificado a los 4 meses por falta de material biológico- sugirió que probablemente parte del daño al vigor y la viabilidad de la semilla podría resultar de la velocidad con la que toman agua las semillas durante su imbibición, probablemente debido a daño membranal. En base a lo anterior se decidió que los lotes que ya mostraban grandes problemas con su calidad (4 y 5 meses de almacenamiento) fueran germinados sobre diferentes sustratos como: papel colocado sobre vermiculita y vermiculita sola para determinar si mejoraba la viabilidad y el vigor de los mismos. Los resultados mostraron que a los 4 meses de almacenamiento en la mayoría de los cultivares

había una recuperación en ambos parámetros y los cultivares que mejor respondieron a estos tratamientos fueron T_{100} y T_{5963} (fig.8). A los 5 meses sin embargo se encontró que la recuperación fué nula o muy ligera en todos los cultivares respecto al control (fig.9).

Contenido de lípidos

El contenido de lípidos del embrión fué de alrededor del 30 % del peso seco en todos los cultivares y este porcentaje se mantuvo sin variación durante todo el tiempo de almacenamiento (fig. 10).

Contenido de carbohidratos totales de embriones

La comparación de los azúcares solubles en agua caliente y en etanol muestra que al parecer es más efectiva la extracción con agua ya que se extraen alrededor de un 30 % más de azúcares con ella que con etanol. Esto es muy similar para todos los cultivares antes de ser almacenados (Tabla II).

Carbohidratos solubles en etanol

En embriones de semillas control el contenido de fructosa fué menor que el de glucosa. El contenido de la cetohexosa fué semejante (1.5 mg/g de harina deslipidizada) para T_{100}, T_{5963} y P_{49}, (α= 0.05) mientras que para A_6 y P_{1346} fué en promedio de 0.7 mg/g de harina deslipidizada (hd) (Tabla III). En relación a la aldohexosa solo P_{1346} mostró niveles más altos (4.5 mg/g de hd) que el resto de los cultivares (2.6 mg/g de hd) (Tabla IV).
Durante el deterioro los niveles de estos azúcares aumentaron, sin embargo la magnitud y el tiempo de almacenamiento al cual se

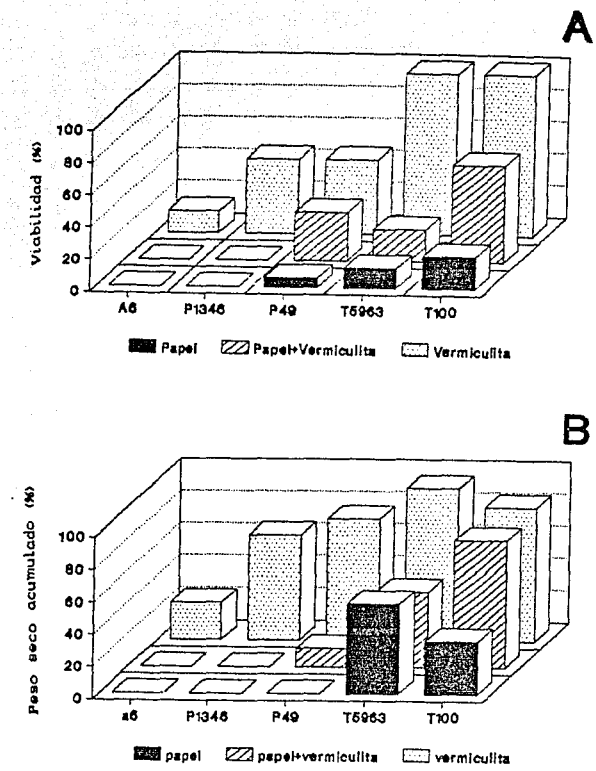
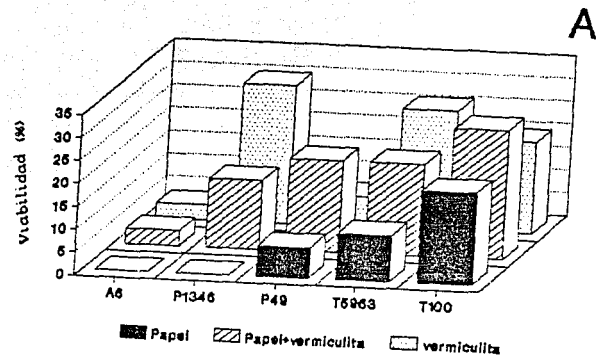


Fig. 8 Comparación de la viabilidad y el vigor de un lote de semillas de 4 meses de almacenamiento cuando son crecidas en diferentes soportes.
Las semillas fueron crecidas sobre 3 distintos soportes: vermiculita, papel colocado sobre vermiculita y papel (tacos) durante 72 horas a 25°C.
A) La viabilidad se reportó como el % de semillas germinadas.
B) El vigor fué cuantificado como la acumulación de peso seco en la plántula y reportado como el % respecto al control.



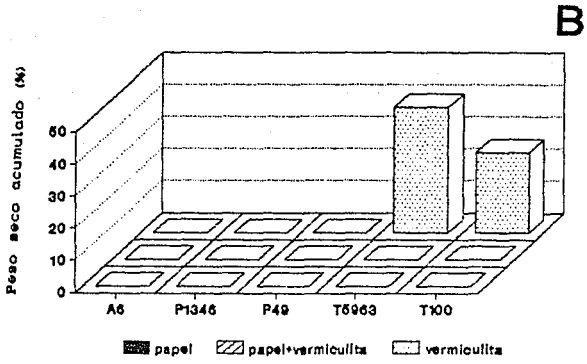


Fig. 9 Comparación de la viabilidad y el vigor de un lote de semillas de 5 meses de almacenamiento cuando son crecidas en diferentes soportes.
Las semillas fueron crecidas sobre 3 distintos soportes: vermiculita, papel colocado sobre vermiculita y papel (tacos) durante 72 horas a 25°C.
A) La viabilidad se reportó como el % de semillas germinadas.
B) El vigor fué cuantificado como la acumulación de peso seco en la plántula y reportado como el % respecto al control.

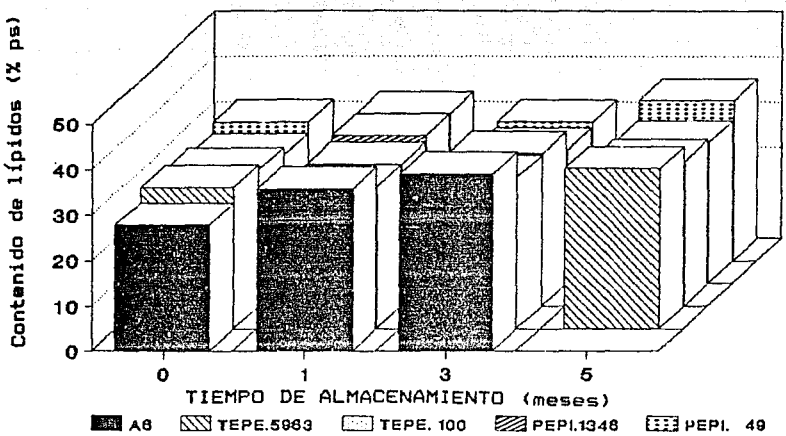


Fig. 10 Efecto del almacenamiento sobre el contenido de lípidos en embriones de maíz. La cantidad se reporta como el porcentaje respecto al peso seco (% ps). El almacenamiento de las semillas de los 5 cultivares de maíz estudiados se llevó a cabo a 30°C y 75 % de humedad relativa.

TABLA II COMPARACION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN ETANOL Y EN AGUA CALIENTE DE EMBRIONES DE MAIZ CONTROL

MATERIAL	mg de azúcares / g de harina deslipidizada	
	Soluble en agua	Soluble en etanol
TEPECINTLE 100	300	206
TEPECINTLE 5963	315	213
PEPITILLA 1346	290	176
PEPITILLA 49	375	232
A6	280	206

Los carbohidratos solubles en agua fueron cuantificados por el método de fenol-H_2SO_4.

Los carbohidratos solubles en etanol se cuantificaron por cromatografía de gases.

TABLA III EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE FRUCTOSA DE EMBRIONES DE MAIZ

MATERIAL	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)				
	0	1	3	4	5
	mg/g de harina deslipidizada [a]				
A6	0.91±0.5	1.09±0.2	3.98±0.2 [d]	8.61±0.1 [d]	
PEPITILLA 49	1.53±0.1	1.89±0.1	1.59±0.1	9.14±0.1 [d]	15.07±0.1 [d]
PEPITILLA 1346	0.55±0.0	1.55±02 [d]	1.88±0.1 [d]	9.44±0.0 [d]	7.56±0.1 [d]
TEPECINTLE 5963	1.65±0.1	2.09±0.3 [d]	2.86±0.2 [d]	1.63±0.3	2.77±0.1 [d]
TEPECINTLE 100	1.64±0.1	1.72±0.1	1.27±0.2	0.81±0.2	5.25±0.0 [d]

LOS DATOS REPRESENTAN MEDIA ± ERROR ESTANDAR (n = 4)
a = almacenamiento en 75% de humedad relativa y 30° C
d = valor significativamente diferente respecto al control (α= 0.05).

TABLA IV EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE GLUCOSA DE EMBRIONES DE MAIZ

MATERIAL	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)				
	0	1	3	4	5
	mg/g de harina deslipidizada[a]				
A6	2.55-0.2	2.70-0.3	8.98-0.5[d]	12.43-0.1[d]	
PEPITILLA 49	3.19±0.3	3.35±0.2	3.29±0.2	14.14±2.3[d]	9.65±0.1[d]
PEPITILLA 1346	4.52±0.1	3.24±06	4.16±0.5	12.04±0.3[d]	5.74±0.1
TEPECINTLE 5963	2.22±0.2	1.55±0.2	3.35±1.0	2.66±0.8	2.31±0.1
TEPECINTLE 100	2.58±0.3	2.79±0.4	1.78±0.1	2.09±0.6	6.52±0.2[d]

LOS DATOS REPRESENTAN MEDIA ± ERROR ESTANDAR (n = 4)
a = almacenamiento en 75% de humedad relativa y 30° C
d = valor significativamente diferente respecto al control (α= 0.05).

observó este aumento fué cultivar dependiente. En el primer mes de almacenamiento, los niveles de fructosa aumentaron significativamente (α= 0.05) en P_{1346} y T_{5963} mientras que en A_6 este incremento se presentó hasta los 3 meses y en P_{49} a los 4 meses. Finalmente en T_{100} esta tendencia se mostró hasta los 5 meses de almacenamiento (Tabla III).

Durante el almacenamiento de la semilla los niveles de glucosa también se incrementaron notablemente. Este aumento se presentó a los 3 meses de almacenamiento en A_6; a los 4 meses para P_{49} y P_{1346} y a los 5 meses para T_{100}. En cuanto a T_{5963}, los niveles permanecieron constantes a lo largo de todo el período estudiado (Tabla IV).

Respecto a los niveles de sacarosa (Tabla V) se encontró que inicialmente todos los cultivares presentaron niveles similares (α= 0.05) de este disacárido y fueron entre 150 y 200 mg/g hd. Durante el almacenamiento de las semillas por 3 meses ocurrió que los niveles de sacarosa se modificaron de diferente manera en los distintos cultivares. En 4 de los 5 cultivares los niveles de este azúcar se mantuvieron similares a los encontrados en semilla control, por su parte en P_{1346} se observó que en el almacenamiento aumentó muy significativamente (α= 0.05) el nivel de la sacarosa respecto a su contenido inicial. En forma similar a P_{1346} la línea T_{100} acumula también sacarosa pero hasta los 4 meses de almacenamiento (Tabla V). A_6 y P_{49} presentaron un decremento significativo en su contenido de sacarosa comparado con el de la semilla control, el primero a los 4 meses de almacenamiento y el segundo a los 5; algo similar ocurre en P_{1346} y T_{100} en los cuales se disminuyen sus altos contenidos de sacarosa a los que habían llegado de tal manera que a los 5 meses de almacenamiento vuelven a presentar niveles similares de este disacárido a los que existían en las semillas antes de ser almacenadas. Por su parte T_{5963} todo el tiempo mantuvo sus niveles de sacarosa parecidos al del control (Tabla V).

Al observar la tabla VI se puede ver que los niveles iniciales de rafinosa en los 5 materiales analizados son muy variables, el que

TABLA V EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE SACAROSA DE EMBRIONES DE MAIZ

MATERIAL	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)				
	0	1	3	4	5
	mg/g de harina deslipidizada[a]				
A6	187.7±29	205.2±23	164.7±15	126.6±28[d]	
PEPITILLA 49	186.9±13	187.4±19	197.8±21	179.1±46	135.5±0.1[d]
PEPITILLA 1346	146.5± 3	181.4±32	201.8±13[d]	163.2± 7	153.2± 0
TEPECINTLE 5963	177.9±12	156.6±13	148.3± 7	180.7±20	166.5± 2
TEPECINTLE 100	152.0±10	170.9±32	150.9±8.5	201.9±23[d]	157.2± 1

LOS DATOS REPRESENTAN MEDIA ± ERROR ESTANDAR (n = 4)
a = almacenamiento en 75% de humedad relativa y 30° C
d = valor significativamente diferente respecto al control (α= 0.05)

TABLA VI EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE RAFINOSA DE EMBRIONES DE MAIZ

MATERIAL	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)				
	0	1	3	4	5
	mg/g de harina deslipidizada[a]				
A6	15.05±2.5	12.7±1.8	12.29±1.4	12.8±3.8	
PEPITILLA 49	40.45±2.1	32.7±5.1	41.22±5.6	21.05±7.3[d]	20.73±0.5[d]
PEPITILLA 1346	24.60±0.1	31.62±7.1	33.40±6.7	21.11±2.4	27.78±0.9
TEPECINTLE 5963	31.34±2.3	32.57±1.6	31.70±2.1	33.10±8.3	25.48±1.0
TEPECINTLE 100	39.63±7.9	43.08±5.8	39.60±4.3	45.90±5.5	34.71±0.7

LOS DATOS REPRESENTAN MEDIA ± ERROR ESTANDAR (n = 4)
a = almacenamiento en 75% de humedad relativa y 30° C
d = valor significativamente diferente respecto al control (α= 0.05).

presenta un menor contenido es A_6 (15 mg/g hd) y en los que existe mayor abundancia de este trisacárido son P_{49} y T_{100} (40 mg /ghd). Entre estos 3 cultivares se encuentran T_{5963} y P_{1346} con 30 y 24 mg/ ghd de rafinosa respectivamente. Esta variabilidad en el contenido de rafinosa no permite hacer grupos significativamente diferentes.

Durante los 3 primeros meses de almacenamiento, el contenido de rafinosa de los 5 cultivares no se modificó. A tiempos de almacenamiento mayores P_{49} mostró una disminución significativa de su nivel de rafinosa (α0.05), en el resto de los cultivares el almacenamiento no tuvo efecto en los contenidos de rafinosa.

La variabilidad de la rafinosa se traduce en diferentes relaciones sacarosa/ rafinosa para los diferentes cultivares (Tabla VII). Sin embargo una real diferencia solo se observa entre A_6 y el resto de los cultivares ya que el primero presenta una relación de 12.47 mientras que en las accesiones las relaciones se encuentran entre 4 y 6 siendo la menor la del cultivar T_{100} (3.83). Durante el almacenamiento se observa una tendencia a aumentar la relación sacarosa/rafinosa en 3 de los cultivares manteniéndose constante en P_{1346} y tendiendo a disminuir en A_6 (Tabla VII).

TABLA VII EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA RELACION SACAROSA/RAFINOSA DE EMBRIONES DE MAIZ

MATERIAL	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)				
	0	1	3	4	5
	Relación sacarosa/rafinosa				
A6	12.47	16.16	13.40	9.89	
PEPITILLA 49	4.62	5.73	4.79	8.51	6.53
PEPITILLA 1346	5.95	5.73	6.04	7.73	5.51
TEPECINTLE 5963	5.67	4.8	4.68	5.46	6.53
TEPECINTLE 100	3.83	3.96	3.81	4.39	4.52

DISCUSION

En el presente trabajo se utilizaron materiales homogéneos en cuanto a su calidad inicial, para asegurarse que se parte del mismo punto de deterioro en todos los cultivares al inicio del trabajo, ya que como se ha reportado (56) la semilla empieza a deteriorarse desde el momento en que madura sobre la planta madre. Debido a lo anterior se determinó en forma exhaustiva la calidad de los lotes de semilla midiéndose además de la viabilidad, otras características fisiológicas como son la velocidad de germinación, el crecimiento de la plántula y la salida de solutos durante su remojo (57, 61, 77).

Esto está de acuerdo con la tendencia actual de dar mayor importancia a la cuantificación del vigor de un lote de semillas como un parámetro complementario a la viabilidad ya que aportaría mayor información acerca de la calidad real de la semilla (33, 57, 64).

Los resultados fisiológicos (Figs. 2, 3, y Tabla I) mostraron que en general los cultivares analizados en este trabajo presentaban la misma calidad fisiológica antes de ser almacenados pero al mismo tiempo tenían muy diferentes niveles de salida de iones y azúcares (figs.4 y 5). Lo anterior podría deberse a la forma en la que fue tratada la semilla despúes de ser cosechada ya que en maíz se ha reportado que la conductividad puede tener relación con la integridad del pericarpio (33).

El hecho de que las semillas de similar calidad (medida bajo diferentes criterios) tengan valores tan diferentes de salida de electrolitos podría indicarnos que en los valores de conductividad intervienen otros factores además del daño membranal o bien que las semillas pueden ser viables aún con cierto daño membranal. Resultados similares a los aquí expuestos han sido reportados

previamente en la literatura por Herter y Burris en 1989 (33). Respecto a su composición química los lípidos constituyeron el 30% del peso seco del embrión en todos los cultivares tanto en lotes control como deteriorados (Figura 9). Lo anterior está de acuerdo a lo que ha sido reportado en la literatura para maíz (72).

Los azúcares solubles detectados en el embrión de maíz fueron rafinosa, sacarosa, fructosa y glucosa, si bien los niveles eran diferentes en cada cultivar. Al inicio del almacenamiento el azúcar predominante fue la sacarosa (Tabla V) y en todos los cultivares el contenido de este disacárido fué similar. Los niveles de los monosacáridos fructosa y glucosa (Tabla III y IV) fueron muy bajos mientras que para rafinosa todos los cultivares mostraron diferente contenido de este trisacárido (Tabla VI).

Tal variación en la rafinosa se refleja en diferentes relaciones sacarosa/rafinosa que van desde 3.8 para T_{100} a 12.47 para A_6 los otros 3 cultivares presentaron valores intermedios (Tabla VII).

De acuerdo a la literatura (39) una relación de 6 a 1 de sacarosa/rafinosa forma estado vitreado *in vitro*, el cual se mantiene a temperatura ambiente (21°C) y en contenidos de agua de menos de 0.13 g de H_2O/g de peso seco (39). El estado vitreado se ha detectado en semillas (8, 75) como el maíz con un 10 % de contenido de humedad y se ha sugerido que protegería al citoplasma de daño durante la desecación (17, 24). En el mismo sentido una efectiva protección a las membranas se establece en relaciones 3.3 a 1 de estos mismos carbohidratos (10).

Debido a su composición inicial de azúcares, A_6 es el cultivar que más se aleja de las relaciones ideales (sacarosa/rafinosa) que se han sugerido para protección de membranas y moléculas celulares y debido a ello se podría esperar que quizá en este material sea donde mayor daño celular se ha producido por la desecación, lo cual podría reflejarse en su calidad inicial o en su comportamiento al ser almacenado, a diferencia de las 4 accesiones donde ocurriría lo contrario, ya que sus relaciones sacarosa/rafinosa estan más cerca de las ideales.

Estas diferencias en las composiciones de carbohidratos solubles del embrión no se reflejan en la calidad inicial de los cultivares, la cual es similar en todos ellos. Esto tampoco se refleja en la salida de iones y azúcares, la cual es alta en P_{1346} y P_{49} y baja en el resto de los cultivares.

A pesar de que en un principio los cultivares mostraban una calidad similar, cuando estos fueron almacenados en condiciones desfavorables sufrieron deterioro a diferente velocidad siendo A_6 el más susceptible a deteriorarse. Posteriormente P_{49} y P_{1346} y finalmente las más resistentes a sufrir daño durante el almacenamiento fueron T_{100} y T_{5903} (Figs.2, 3 y 7).

Este último resultado concuerda con el contenido inicial de carbohidratos encontrado, ya que A_6 que es el cultivar que más rápidamente se deteriora en el almacén, pués a los 3 meses ya muestra signos evidentes de pérdida de vigor y viabilidad y es el que originalmente presenta los niveles más bajos de rafinosa (Tabla VI) y una relación sacarosa/rafinosa más alta (12.47). Los otros cultivares con mayores niveles de rafinosa y con relaciones sacarosa/rafinosa más cercanas a las mencionadas como ideales para proteger estructuras celulares tardan más tiempo que A_6 para perder calidad (deteriorarse) en el almacén, (aproximadamente 30 días más, figs. 2, 3 y 7).

Quizá la pérdida de calidad no solamente esté relacionada con el contenido inicial de carbohidratos, sino también con la forma como se van modificando éstos en el almacén.

En la literatura se ha reportado (5) que durante el almacenamiento de la semilla de maíz se presenta una disminución en el contenido de carbohidratos solubles del embrión, principalmente en rafinosa y monosacáridos; los niveles de la sacarosa también decrecen pero en menor proporción. Estos cambios al parecer están asociados con la disminución del vigor de la semilla. Basavarajappa *etal* (60) trabajando con otro cultivar de maíz, encontraron de igual manera una declinación de carbohidratos totales y azúcares reductores de la semilla completa al ser expuesta a deterioro acelerado,

encontrando también que la disminución de los azúcares reductores se llevaba a cabo en forma lenta.

En este trabajo, el almacenamiento de los distintos cultivares también resultó en una modificación de los niveles de los carbohidratos solubles del embrión (tablas III- VI). Los niveles de la sacarosa y la rafinosa disminuyeron significativamente solo en los cultivares A_6 y P_{49} pero hasta después de que la semilla se había deteriorado profundamente. Este resultado contrasta con lo previamente reportado donde se encontró que el deterioro estaba asociado a una disminución en los niveles de rafinosa (5).

La principal modificación del perfil de carbohidratos inducida por el almacenamiento es la aparición de altos niveles de monosacáridos en todos los cultivares excepto en T_{5963} (Tablas III, IV). Sin embargo, en este último cultivar aunque no ocurre un aumento dramático de monosacáridos, sí se presenta un aumento significativo en los niveles de fructosa y de hecho durante todo el tiempo de almacenamiento los niveles de este azúcar en este cultivar son muy variables aumentando o disminuyendo en forma significativa. Este resultado también es contrario a lo reportado en la literatura (5).

El incremento dramático en monosacáridos que se observó en los 4 cultivares A_6, T_{100}, P_{1346} y P_{49} ocurrió al mismo tiempo en que se presentó un fuerte decremento en la calidad de la semilla, para el caso de T_{5963} en que la caída de la calidad no conllevó un aumento significativo de estos carbohidratos, esto podría deberse a que no se acumularon, es decir, tal vez al mismo tiempo que se produjeron se utilizaron.

La acumulación de monosacáridos podría causar profundos daños al embrión en 2 aspectos :

1) Por un lado se conoce que estos carbohidratos pueden intervenir en las reacciones dañinas de Amadori y Maillard, las cuales causan en primer lugar la glicación no enzimática de los grupos amino de diferentes moléculas, lo cual daría como resultado: proteínas glicadas y derivados fructosílicos. Los compuestos anteriores

pueden interaccionar entre sí para producir compuestos color café (reacción de acafezamiento).

Estas reacciones, aunque han sido estudiadas primordialmente en alimentos pueden desarrollarse en semillas almacenadas en condiciones adversas (74) debido a que son de naturaleza no enzimática, se desarrollan favorablemente en bajos contenidos de humedad y en altas temperaturas.

La glicación en el caso de las proteínas da como resultado la declinación de la actividad de algunas enzimas, lo cual sería dañino para la germinación de la semilla. En la literatura se reportan diversas enzimas que pierden actividad durante el almacenamiento de la semilla (3) si bien tal pérdida de actividad no ha sido asociada con este tipo de reacción.

2) Por otro lado la presencia de carbohidratos que originalmente no se encontraban en tal cantidad, quizá provoquen cambios en la estructura que presentaba el citoplasma de la semilla antes de ser almacenada, lo cual permitiría que reacciones que en un principio no se desarrollaban pudieran llevarse a cabo y producir productos tal vez dañinos para la célula que al acumularse dañen a las estructuras celulares del embrión.

Los monosacáridos que aparecen, tal vez sean el resultado de la degradación del almidón que se encuentra presente en alrededor de un 8 % del peso seco del embrión o bien por la degradación de la sacarosa . Esto último sería aplicable solo a P_{1346} y T_{100} donde la acumulación de monosacáridos es concomitante a una disminución en los niveles de sacarosa. Para los otros cultivares la disminución en oligosacáridos es posterior a la acumulación de monosacáridos.

De todo lo anteriormente expuesto al parecer existe relación entre los cambios en los niveles de carbohidratos solubles del embrión y el deterioro de los diferentes cultivares aquí estudiados durante su almacenamiento. Sin embargo, los cambios en los diferentes cultivares no son semejantes, es decir, en algunos se acumulan más monosacáridos que en otros o se modifican más los niveles de

sacarosa y rafinosa. Esto es congruente con lo reportado en la literatura, ya que en un trabajo en el que se utilizó un cultivar de maíz desarollado en clima frío la respuesta al almacenamiento del mismo fue muy diferente a la aquí obtenida donde fueron utilizados materiales de clima templado. En dicho trabajo (5) disminuyeron los monosacáridos, la rafinosa y ligeramente la sacarosa además de reportarse la presencia de galactosa, la cual nunca fue encontrada en nuestro trabajo.

De esto puede sugerirse que los cultivares especialmente si son de diferente clima, siguen diferentes patrones de modificación de sus carbohidratos durante su almacenamiento.

Considerando los resultados es evidente que la pérdida de la calidad de la semilla no es gradual sino que ocurre en forma abrupta después de un cierto período de almacenamiento. Las 4 accesiones (T_{100}, T_{5963}, P_{1346} y P_{49}) durante los primeros 3 meses de almacenamiento conservaron integra su viabilidad y mostraron una mínima pérdida de vigor no significativa (α= 0.05). Sin embargo al llegar al cuarto mes casi todos los cultivares redujeron su viabilidad al 30 %, excepto T_{100} donde cayó solo al 60 %. En cuanto al vigor, este parámetro mostró una disminución aún más dramática ya que solo en un cultivar (T_{100}) se observó más de un 50% de semillas germinadas y solo fue posible cuantificar en forma confiable la acumulación de peso seco en T_{100} y en T_{5963}, ya que en los otros 2 cultivares el valor de este parámetro fue muy pequeño, dado el número de especímenes.

Lo anterior sugiere que en los cultivares aquí estudiados se requiere de un cierto umbral de daño celular, para que se manifiesten cambios en la calidad de la semilla (51, 57).

Durante su almacenamiento una semilla va acumulando daño, el cual es producto por una parte de reacciones aisladas que se pueden llevar a cabo en bajos contenidos de humedad y por otro lado a que los mecanismos metabólicos de reparación no se realizan (70). Ya durante los primeros momentos de la rehidratación los mecanismos de reparación son capaces de una restauración rápida del daño celular para que la semilla pueda germinar normalmente.

Sin embargo, si durante el almacenamiento se acumula un mayor nivel de daño del que es capaz de reparar la semilla durante la germinación temprana, entonces la semilla tendrá problemas para germinar, lo cual se registra como una pérdida de calidad (deterioro). Esta acumulación de altos niveles de daño celular tal vez sea el umbral de daño al que la semilla tiene que llegar para que empiece a manifestarse como pérdida de calidad. De ahí se sugiere que A6 originalmente tenía mayor nivel de daño comparado con las 4 accesiones, de tal manera que en menor tiempo de almacenamiento A6 llegaría a ese umbral de daño al que posteriormente llegarían los otros cultivares.

La posibilidad de que se lleven a cabo reacciones deletéreas en la semilla durante su almacenamiento, se ve favorecida quizá por el cambio de carbohidratos que tal vez modifiquen la estructura del citoplasma (cristalización de la sacarosa) y se incrementa por el aumento en el contenido de humedad que los cultivares experimentan en la cámara de deterioro. Por ejemplo se tiene que A6 y T5963 incrementan muy rápidamente su contenido de humedad, mientras que en los otros 3 cultivares este aumento se dá; pero en una forma más lenta. Esto concuerda con la velocidad de pérdida de calidad, ya que A6 con una alta relación inicial de sacarosa/rafinosa toma rápidamente agua y en la misma forma se deteriora,mientras que T5963 aunque también tome agua con rapidez tiene una relación sacarosa/rafinosa baja y por ello tal vez resiste durante mayor tiempo el almacenamiento sin perder calidad. A los 5 meses de almacenamiento todos los cultivares ya presentaban alrededor de un 30 % más de contenido de humedad comparado con el control y solo T5963 tomó una mayor cantidad también en relación al control (Fig. 6).

Este incremento en el contenido de humedad provocaría un aumento de la actividad de reacciones sencillas de hidrólisis o de síntesis, pero en las cuales no se requiere de la movilización de moléculas, ya que ésta no es posible en tan bajos contenidos de agua.

Algunas de las estructuras que se han encontrado que son claves en la viabilidad de la semilla son las membranas. La cantidad de salida de electrolitos durante la imbibición se ha relacionado con la calidad de las semillas de legumbres y algunas gramíneas. Altos niveles de conductividad y de salida de azúcares en el agua de remojo de las semillas se ha postulado que es el resultado de daño membranal (57, 71). Algunos resultados han mostrado que el daño a las membranas se da primordialmente por peroxidación aunque no siempre diferentes condiciones de almacenamiento conducen a peroxidación de los lípidos membranales.

La figura 4 muestra que 2 de las accesiones (Pepitilla 49 y Pepitilla 1346), antes de ser almacenadas tenían una salida de azúcares 3 veces mayor que el resto de los cultivares a pesar de que en todos ellos el contenido de carbohidratos era similar (Tabla II). La misma situación se presentó para el caso de la salida de iones (fig. 5).

Esto podría explicarse para el caso de los azúcares, como que en los 2 pepitillas existe una mayor facilidad para la salida de estas moléculas debido quizá a un cierto grado de daño membranal, el cual sería mayor comparado con el resto de los cultivares, pero aún no lo suficientemente grande como para influir sobre la calidad de la semilla, por ello originalmente todos los cultivares tenían la misma calidad.

La misma explicación se aplicaría al caso de la salida diferencial de iones en los distintos cultivares, que aunque no fueron cuantificados en forma total en la semilla, se deduce que tienen niveles similares -al menos en las accesiones- debido a que éstas fueron cultivadas en el mismo terreno.

Durante el almacenamiento primordialmente a tiempos largos, 5 meses, se pudo apreciar una mayor salida de iones y azúcares (figs.4 y 5) en semilla con niveles de calidad muy disminuídos comparados con sus controles. Lo anterior es congruente con lo reportado en la literatura.

Esta mayor salida de iones y de azúcares muy probablemente sea debida a daño membranal provocado quizá por desprotección de estas

estructuras, debido a los cambios que se presentan en los carbohidratos durante el almacenamiento. Tan abundante salida de carbohidratos provocaría, por un lado que se perdiera energía útil y necesaria para el embrión durante los primeros momentos de la germinación y por otro lado provocaría que el medio que la rodea sea propicio para el crecimiento de hongos, los cuales pueden alterar la viablidad y el vigor de la semilla.

El probable daño membranal es apoyado por el hecho de que la semillas ya muy deterioradas (4 meses de almacenamiento) cuando son germinadas sin esterilizarse y crecidas sobre soportes que retienen el agua (vermiculita), lo cual permite que el agua no penetre violentamente a la semilla, mejoran en gran medida el vigor e incluso la viabilidad que mostraban cuando eran germinadas en otro tipo de soporte (papel) (fig.8). Sin embargo, a los 5 meses los lotes de semillas muestran muy ligera o nula mejoría en su viabilidad y vigor, tal vez por que llegaron a una acumulación de daño tal que ya no es posible revertirlo rápidamente aún con una hidratación lenta (fig.9).

De lo anterior, se puede decir que en largos períodos de almacenamiento efectivamente se observa daño membranal de cierta magnitud, que posiblemente sea una de las razones por la que se observa una disminución de la calidad de la semilla, aunque no la única, ya que el deterioro es un fenómeno muy complejo en el cual intervienen una gran cantidad de factores.

CONCLUSIONES

1) El contenido de carbohidratos no está relacionado con la calidad inicial de la semilla, pero aparentemente sí con su comportamiento en el almacén.

2) La acumulación de monosacaridos ocurre al mismo tiempo en que se produce un fuerte decremente en calidad de la semilla.

3) En la mayoría de los cultivares la acumulación de monosacaridos no es el resultado de la degradación de sacarosa o rafinosa, solo en P_{1346} y T_{100} la acumulación de fructosa y glucosa son concomitantes con una degración de sacarosa.

4) En los cultivares aquí estudiados una de las estructuras que sufren daño durante el almacenamiento son las membranas.

BIBLIOGRAFIA

1. **Amuti KS, Pollard CJ** (1977) Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. Phytochemistry **16:** 529-532

2. **Bartels D, Singh M, Salamini F** (1988) Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. Planta **175:** 485-492

3. **Basavarajappa BS, Shetty HS, Prakash HS** (1991) Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize. Seed Sci. & Technol. **19:** 279-286

4. **Baskin CC** (1977) Vigor test methods-accelerated aging. Assoc. Off. Seed Anal. Newsletter **51:** 42-52

5. **Bernal-Lugo I, Leopold AC** (1992) Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant Physiol. **98:** 1207-1210

6. **Bewley JD** (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. **30:** 195-238

7. **Boersig MR, Negm FB** (1985) Prevention of sucrose inversion during preparation of HPLC samples. Hort Science **20:** 1054-1056

8. **Bruni F, Leopold AC** (1991) Glass transitions in soybean seed. Plant Physiol. **96:** 660-663

9. **Burke MJ** (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological. In AC Leopold (ed)."Membranes, metabolism and dry organisms". Ithaca : Cornell University Press, pp 358-364.

10. **Caffrey M, Fonseca V, Leopold AC** (1988) Lipid-sugar interactions. Plant Physiol. **86:** 754-758

11. **Carpenter JF, Crowe JH** (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. Biochemistry **28:** 3916-3922

12. **Carpenter JF, Crowe JH** (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. Cryobiology **25** : 244-255

13. **Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF** (1982) Cellular responses to extreme water loss: The water replacement hypothesis. Criobiology **19:** 306-316

14. **Cronquist A.** (1982) Introducción a la Botanica. CECSA 2ª ed. México, pp 506-511.

15. **Crowe JH, Crowe LM, Chapman D** (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Science **223**: 701-703

16. **Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ** (1988) Interactions of sugars with membranes. Biochimica et Biophysica Acta **947**: 367-384

17. **Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Wistrom CA** (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayer and proteins by sugars. Biochem J. **242**: 1-10

18. **Crowe JH, Crowe LM** (1982) Induction of anhydrobiosis: membrane changes during drying. Criobiology **19**: 317-328

19. **Crowe JH, Crowe LM, Hoekstra FA, Wistrom CA** (1989): Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: The problem of imbibition damage in dry organisms. In Stanwood PC, McDonald MB (ed): Seed Moisture. Crop Science Society of America No.14, pp 1-14.

20. **Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ** (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? a comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Cryobiology **27**: 219-231

21. **Chen Y, Burris JS** (1990) Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. Crop Science **30**: 971-975

22. **Chen Y, Burris JS** (1991) Desiccation tolerance in maturing maize seed: membrane phospholipid composition and thermal properties. Crop Science **31**: 766-770

23. **Chin HF, Krishnapillary B, Stanwood PC,** (1989): Seed moisture: recalcitrant *vs* orthodox seeds. In Stanwood PC, McDonald MB (ed) : Seed Moisture. Crop Science Society of America No.14, pp 15-22.

24. **Darbyshire B** (1974) The function of the carbohydrate units of three fungal enzymes in their resistance to dehydration. Plant Physiol. **54**: 717-721

25. **Dubois M, Gilles K, Hamilton P, Roberts A, Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **28**: 350-356

26. **Dure L III, Crouch M, Haranda J, Ho THD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR** (1989) Common aminoacid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. **12**: 475-486

27. Espelund M, Saeboe-Larssen S, Hughes DW, Galau GA, Larsen F, Jakobsen KS (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. The Plant Journal 2: 241-252

28. Finkelstein RR, Tenbarge KM, Shumway JE, Crouch ML (1985) Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. Plant Physiol. 78: 630-636

29. Finkelstein RR, Crouch ML (1986) Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. Plant Physiol. 81: 907-912

30. Gidrol X, Serghini H, Noubhani A, Mocquot B, Mazliak P (1989) Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidación and membrane damage. Physiol. Plantarum 76: 591-597

31. Goday A, Sanchez-Martinez D, Gomez J, Puigdomenech P, Pages M (1988) Gene expression in developing *Zea mays* embryos: regulation by abscisic acid of highly phosphorylated 23 to 25 KD group of proteins. Plant Physiol. 88: 564-569

32. Guerrero F, Mullet JE (1986) Increased abscisic acid biosynthesis during plant dehydration requires transcription. Plant Physiol. 80: 588-591

33. Herter V, Burris JS (1989) Evaluating drying injury on corn seed with a conductivity test. Seed Sci. & Technol. 17: 625-638

34. Hoekstra FA, Van Roekel T (1988) Desiccation tolerance of *Papaver dubium* L. pollen during its development in the anther. Plant Physiol. 88: 626-632

35. Kendall EJ, Mckersie BD (1989) Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. Physiol. Plantarum 76: 86-94

36. Kermode AR, Oishi MY, Bewley JD (1989): Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: A comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos . In Stanwood PC, McDonald MB (ed): Seed Moisture. Crop Science Society of America No. 14 pp 23-50.

37. King AI, Joyce DC, Reid MS (1988) Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. Plant Physiol. 86: 764-768

38. Koster KL, Leopold AC (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol. 88: 829-832

39. **Koster KL** (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol. **96:** 302-304

40. **Leopold AC** (1986): Introduction. In Leopold AC (ed): "Membranes, metabolism and dry organisms" Ithaca : Cornell University Press, pp 17-22.

41. **Leopold AC** (1990): Coping with desiccation. In Wiley-Liss (ed): Stress responses in plants : Adaptation and acclimation mechanisms, pp 37-56.

42. **Meurs C, Basra AS, Karssen CM, Van Loon LC** (1992) Role of abscisic acid in the induction of desication tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. **98:** 1484-1493

43. **Mouradian R, Womersley C, Crowe LM, Crowe JH** (1985) Degradation of functional integrity during long-term storage of a freeze-dried biological membrane. Criobiology **22:** 119-127

44. **Mundy J, Chua NH** (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of novel rice gene. EMBO J. **7:** 2279-2286

45. **Ni BR, Bradford KJ** (1992) Quantitative models characterizing seed germination responses to abscisic acid and osmoticum. Plant Physiol. **98:** 1057-1068

46. Official methods of Analysis of Association of Official agricultural Chemists (1965). pp 331-332.

47. **Oliver MJ, Bewley** (1984) Plant desiccation and protein synthesis: VI changes in protein synthesis elicited by desiccation of the moss *Tortula ruralis* are affected at the translational level. Plant Physiol. **74** : 923-927

48. **Oliver MJ** (1991) Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*. Plant Physiol. **97:** 1501-1511

49. **Parrish DJ, Leopold AC** (1978) On the metabolism of aging in soybean seeds. Plant Physiol. **6:** 365-368

50. **Perras M, Fathey S** (1984) Energy state of spring and winter wheat during cold hardening soluble sugars and adenine nucleotides. Physiol. Plantarum **60:** 129-132

51. **Petruzelli L, Taranto G** (1989) Wheat aging: the contribution of embryonic and non-embryonic lesions to loss of seed viability. Physiol. Plantarum **76:** 289-294

52. Ponquett RT, Smith MT, Ross G (1992) Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. Seed Sci. Res. 2: 51-54

53. Pukacka S (1991) Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of seeds *Acer platanoides*. Physiol. Plantarum 82: 306-310

54. Reid DS, Crowe JH, Crowe LM (1985) The low-temperature phase behavior of aqueous trehalose. Crybiology 22: 608-609

55. Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. Seed Sci. Technol. 1: 499-514

56. Roberts EH (1986): Quantifying seed deterioration. In Physiology of Seed Deterioration. CSSA spec.pub. no. 11 Madison WI, pp 101-123.

57. Roberts EH, Black M (1989) Seed quality. Seed Sci. & Technol. 17: 175-185

58. Rudolph AS, Crowe JH (1985) Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology 22: 367-377

59. Santarius KA, Giersch C (1983) Cryopreservation of spinach chloroplast membranes by low-molecular carbohydrates. Cryobiology 20: 90-99

60. SAS procedures guide for personal computers, version 6 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. pp 350-355

61. Seed Vigor Testing Handbook (1983) Association of official seed analysts, pp 50-55.

62. Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell 2: 503-512

63. Smythe BM (1967) Sucrose crystal growth. Aust. J. Chem. 20: 1087-1114

64. Tomer RSP, Maguire JD (1990) Seed Vigour studies in wheat. Seed Sci. & Technol. 18: 383-392

65. Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshivari (1981) Trehalose toxicity in *Cuscuta reflexa*. Plant Physiol. 68: 1369-1374

66. Vertucci CW, Leopold AC (1987) Water binding in legume seeds. Plant Physiol. 85: 224-231

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

67. **Vertucci CW, Leopold AC** (1984) Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. Plant Physiol. **75**: 114-117

68. **Vertucci CW, Leopold AC** (1987) The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues. Plant Physiol. **85**: 232-238

69. **Vertucci CW** (1992) A calorimetric study of the changes in lipids during seed storage under dry conditions. Plant Physiol. **99**: 310-316

70. **Vertucci CW, Ross EE** (1990) Theorical basis of protocols for seed storage. Plant Physiol. **94**: 1019-1023

71. **Walton DC** (1980) Biochemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. **31**: 453-489

72. **Watson SA** (1987): Structure and composition. In Corn Chemistry and Technology. Ramstad PE., SA Watson, eds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul,Minnesota, pp 53-82.

73. **Wei WG, Lin Ch, Everson E, Thomashow MF** (1990) Cold acclimation in Arabidopsis and Wheat. Plant Physiol. **94**: 1078-1083

74. **Wettlaufer SH, Leopold AC** (1991) Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. Plant Physiol. **97**: 165-169

75. **Williams RJ, Leopold AC** (1989) The glassy state in corn embryos. Plant Physiol. **89**: 977-981

76. **Williams RJ** (1985) Thermal analysis of trehalose:H_2O. Criobiology **22**: 632-633

77. **Wilson DO** (1992) A unified approach to interpretation of single seed conductivity data. Seed Sci & Technol. **20**: 155-163