



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE LOS AZUCARES Y PROTEINAS NO COAGULABLES POR CALOR, EN LA LONGEVIDAD DE LA SEMILLA DE MAIZ (Zea mays).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA GABRIELA SANCHEZ SANTOYO

MEXICO, D. F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) SANCHEZ SANTOYO MARIA GABRIELA

con número de cuenta 3955219-3 con el Título: "ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE LOS AZUCARES Y PROTEINAS NO COAGULABLES POR CALOR EN LA LONGEVIDAD DE LA SEMILLA DE MAIZ (Zea mays)"

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DRA.	IRMA OPELIA	BERNAL JUGO	
Director de Tesis	AIDA MARISA	OSUNA FERNANDEZ	
M. en C.	HELIA REYNA	OSUNA FERNANDEZ	
M. en C.	GISELLE OLIVIA	ROSAS SOLARES	
Suplente	VICTOR MANUEL	VALDES LOPEZ	
M. en C.			
Suplente			

## AGRADECIMIENTOS

*Al Señor por concederme vida y medios para alcanzar todas mis metas.*

*A Carlos Alberto Castillo Pompeyo, compañero, amigo y amado esposo,  
por su apoyo incondicional para comenzar, continuar  
y terminar esta licenciatura.*

*A mis padres Bertha y Eligio, que pese a su voluntad, siempre apoyaron  
mis decisiones y estuvieron conmigo  
en los momentos difíciles.*

*A mis tutores Marisa, Reyna, Giselle y Victor por sus acertados  
comentarios y correcciones al presente trabajo.*

*A mi directora de tesis la Dra. Irma O. Bernal Lugo,  
por sus sabias enseñanzas, paciencia y consideración para conmigo.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	4
<b>ANTECEDENTES</b>	
Morfología de la semilla	5
Longevidad	7
Latencia	8
Germinación y viabilidad	10
Tolerancia a la desecación	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Germinación	22
Emergencia	22
Viabilidad y vigor	23
Determinación del contenido de humedad	24
Disección de embriones	25
Disección de ejes embrionarios	25
Tratamiento y almacenamiento de las semillas	25
Extracción de azúcares	26
Cuantificación de monosacáridos (glucosa y fructosa), sacarosa y rafinosa	26
Extracción de proteínas no coagulables por calor (PNCC)	28
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	29
Electroforesis en gel de gradiente de SDS-acrilamida	23
Densitometría de geles de electroforesis de proteína	30
Análisis estadístico	33

<b>RESULTADOS</b>	
Velocidad de hidratación	34
Germinación y tolerancia a la desecación	35
Longevidad	35
Contenido de azúcares solubles	43
Proteínas no coagulables por calor	45
<b>DISCUSIÓN</b>	
Aspectos fisiológicos de la tolerancia a la desecación y longevidad	47
Participación de los azúcares y PNCC en la longevidad de la semilla	48
Azúcares	48
Proteínas no coagulables por calor (PNCC)	49
<b>CONCLUSIONES</b>	52
<b>PERSPECTIVAS</b>	53
<b>REFERENCIAS</b>	55

## RESUMEN

Las semillas ortodoxas a diferencia de las recalcitrantes, se caracterizan por su tolerancia a la desecación y por su longevidad. Ambas características se adquieren durante el desarrollo de la semilla: la tolerancia a la desecación durante la fase de acumulación de reservas y la longevidad durante la fase de desecación. El consenso general en esta área del conocimiento es que los azúcares y las proteínas no-coagulables por calor participan en el mecanismo que confiere tolerancia a la desecación, sin embargo, se desconoce si estas mismas biomoléculas y por ende el mismo mecanismo participan en la longevidad de la semilla, entendiendo por longevidad como el tiempo de viabilidad.

El propósito del presente trabajo es elucidar esta incógnita y para ello se midieron los niveles de estos compuestos en semillas de maíz tolerantes a la desecación pero con diferencias en longevidad (alta y baja en este trabajo). Estas características de longevidad y tolerancia a la desecación se lograron, embebiendo semillas a diferentes tiempos, seguidos de un periodo de rápida desecación. Se encontró que la composición de azúcares de las semillas tolerantes a la desecación pero de diverso grado de longevidad, varía solo en el contenido de monosacáridos y rafinosa. Los primeros aumentan y la segunda disminuye en forma muy importante. El contenido de sacarosa fue similar en todos los casos. Así mismo, la abundancia de dos grupos de péptidos no-coagulables por calor (12.4-24 Kd y 44-66 Kd) fue un prerrequisito para aumentar la longevidad de la semilla pero no para sus propiedades de tolerancia a la desecación. Lo anterior sugiere que la rafinosa y algunos de los péptidos no-coagulables por calor participan al mantener la estabilidad de la semilla durante su almacenamiento, mientras que la tolerancia a la desecación parece depender solo de los niveles de sacarosa.

## INTRODUCCIÓN

Durante su desarrollo, las semillas entran a un periodo de desecación y quiescencia fisiológica que señala el término de la fase de maduración de las semillas (Still y col., 1994), su hidratación subsecuente, permitirá su germinación y por tanto, es posible que la desecación juegue el papel de interruptor entre los procesos de desarrollo con los asociados a la germinación (Long y col., 1981). Durante la desecación, el contenido de humedad de las semillas ortodoxas puede disminuir a menos del 5% y su longevidad (tiempo de viabilidad) aumenta proporcionalmente al decremento en el contenido de agua (Still y col., 1994). La adquisición de la tolerancia a la desecación es un proceso gradual, aproximadamente en la mitad de su desarrollo, las semillas pasan rápidamente de un estado de intolerancia al de tolerancia a la desecación y se pierde pocas horas después de iniciada la germinación (Dasgupta y col., 1982), por lo general, se considera la emergencia de la radícula de la cubierta seminal, como el estadio de la germinación en que se pierde la tolerancia a la desecación (Koster y Leopold, 1988). Se ha propuesto que la tolerancia a la desecación es una estrategia de sobrevivencia de las semillas, ya que permite a estas mantenerse viables, aún en condiciones ambientales desfavorables, así como un mecanismo de dispersión y preservación de las semillas durante largos periodos de almacenamiento (Leopold, 1986).

Entre los mecanismos propuestos que confieren a las semillas la habilidad para sobrevivir en desecación extrema, se menciona la acumulación de ciertos azúcares como los principales responsables en el desarrollo de la tolerancia a la desecación (Koster y Leopold, 1988). Se ha propuesto que los grupos hidroxilos de los azúcares reemplazan la polaridad del agua removida, alrededor de las membranas y previenen su daño estructural (Crowe y Crowe, 1982). Los azúcares favorecen la vitrificación (condición donde los líquidos se vuelven altamente viscosos) y así evitar:

el daño causado por cristalización mientras el agua es retirada (Williams y Leopold, 1989). Además de los azúcares, un conjunto especial de proteínas no coagulables por calor y altamente hidrofílicas, también participan en la protección de los componentes intracelulares durante la desecación. El mecanismo de cómo estas proteínas realizan su función protectora no se conoce, sin embargo se ha sugerido que podrían actuar como inhibidores de enzimas, removedores de radicales libres, quelantes iónicos, como medios de solvatación en lugar de agua e inhibidores de cristalización (Dure, 1993, Close et al, 1993b).

Puesto que la longevidad y la tolerancia a la desecación son dos propiedades que posee la semilla ortodoxa y ambas se adquieren durante el desarrollo de la semilla, es razonable hipotetizar que ambas características son consecuencia de un mismo mecanismo. Con el objeto de probar esta hipótesis, en este trabajo se determinó si la semilla perdía o no simultáneamente su longevidad y su tolerancia a la desecación y si esto estaba asociado a cambios en los niveles de las moléculas propuestas como responsables del mecanismo que les confiere tolerancia a la desecación: azúcares y proteínas altamente hidrofílicas.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Si la tolerancia a la desecación y la longevidad de las semillas ortodoxas son dos manifestaciones de un mismo mecanismo, entonces, la disminución en longevidad deberá estar asociada a cambios en los niveles y/o composición de azúcares y proteínas no coagulables por calor (PNCC), similares a los que se presentarían al perder la tolerancia a la desecación.

Para probar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

1. - Generar lotes de semillas tolerantes a la desecación pero de diferente grado de longevidad.
- 2.- Determinar la composición de azúcares y PNCC en los lotes de semillas.
- 3.- Comparar la composición de azúcares y PNCC de las semillas tolerantes a la desecación con diferente grado de longevidad.

## ANTECEDENTES

### MORFOLOGÍA DE LA SEMILLA

La semilla, es el óvulo fecundado, transformado y maduro de las angiospermas, por tanto, es la estructura de reproducción sexual que permitirá la variabilidad genética y la conservación de la especie (Ruiz Oronoz y col., 1983). Partes esenciales son la cubierta de la semilla, desarrollada de los tegumentos del óvulo, y el embrión que ordinariamente se desarrolla de la oosfera fecundada. A menudo el embrión está embebido en el endospermo o está acompañado por él. El endospermo, es un tejido de almacenamiento que se deriva del núcleo de triple fusión del óvulo. El embrión, es una planta en miniatura, que consiste de un eje corto con una o dos hojas pegadas, los cotiledones. La parte de eje arriba del cotiledón(es) es el epicótilo o plúmula, que se convierte en la yema terminal de la plántula. La parte del eje, inmediatamente abajo del cotiledón(es) es el hipocótilo, una región de transición entre el tallo y la raíz. El hipocótilo se prolonga en la base hacia la radícula que se convierte en la raíz primaria de la plántula. El embrión de las semillas de las gramíneas, incluyendo a los granos de cereales, es poco usual en el sentido de que el epicótilo está completamente cubierto por una vaina denominada el coleoptilo, y la radícula también está cubierta por una vaina denominada coleoriza (fig. 1). Las reservas almacenadas en la semilla incluye proteínas, carbohidratos y grasas, y las proporciones varían de acuerdo con la especie. El endospermo del maíz tiene una parte dura y córnea, con una buena cantidad de proteínas, y una parte más suave y amilácea, con una alta proporción de almidón. Junto a la cubierta de la semilla y el pericarpio, se forma de esta dos regiones una capa de aleurona del endospermo, que es de una célula de grosor y está principalmente constituida por proteínas (Cronquist, 1984).

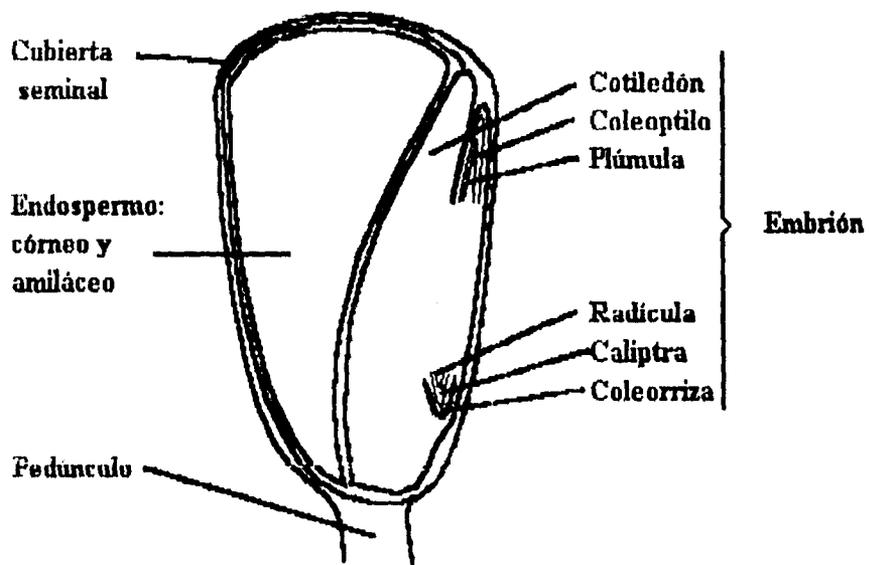


Fig. 1.- Componentes estructurales de la semilla de maíz (Bidwell, 1979)

## **LONGEVIDAD**

La longevidad o tiempo de viabilidad de la semilla es un tema controvertido, después de más de 100 años de investigación en almacenamiento de semillas y longevidad, se sabe que la mayoría de las clases de semillas pueden prolongar su periodo de vida a bajas temperaturas y bajo contenido de humedad. Cuatro factores importantes afectan la longevidad de la semilla: el contenido de humedad de la semilla, la temperatura, la atmósfera (oxígeno) y el potencial genético. Aunque se sabe con certeza que el estado fisiológico, juega un papel importante en la respuesta de la semilla al almacenamiento, la interacción entre temperaturas de almacenamiento y contenido de humedad de la semilla están bien establecidas. Es claro, que para las semillas ortodoxas, contenidos de humedad esencialmente entre un 4 a 7% asegura la retención de un alto porcentaje de germinación por uno o más años a temperatura ambiente. Utilizando temperaturas de almacén debajo del punto de congelación puede prolongarse la vida de la semilla durante 20 años ó más. Aunque el oxígeno ha sido considerado como un factor importante en la longevidad de las semillas, los datos experimentales son confusos por el hecho de que en contenedores sellados, la atmósfera cambia durante el almacenamiento como resultado de la respiración de las semillas y de la microflora asociada a ellas, ocasionando la disminución en la concentración de oxígeno y en consecuencia incrementándose el bióxido de carbono, las presiones parciales bajas de oxígeno favorecen la conservación de la viabilidad y resultados igualmente favorables han sido obtenidos reemplazando el aire en contenedores de almacenamiento con nitrógeno, bióxido de carbono o argón. Para algunas semillas, el almacenamiento en vacío es igual de efectivo. Los factores genéticos con respecto al almacenamiento pueden explicarse de dos maneras. La primera es la diferencia

genética obvia entre cultivos, especies u otros grupos taxonómicos y el segundo punto de vista concierne al daño ocasionado al DNA en la semilla, se sabe que semillas más viejas producen mayor variación genética que las semillas jóvenes y esto ha sido correlacionado con un incremento visible en el daño cromosómico durante el almacenamiento. Mas aún el daño cromosomal es promovido por las mismas condiciones de almacenamiento que favorecen la pérdida de viabilidad, llamense alta humedad, temperatura y oxígeno. Algunas teorías propuestas de las acciones deletereas que ocurren en las semillas para que éstas pierdan su habilidad para germinar, son la disminución en la disponibilidad de reservas, ya que se dañan los mecanismos para su movilización, la alteración de su composición química, lo que ocasiona que las reservas alimenticias ya no sean útiles como fuente de energía, la alteración de la integridad de las membranas, la alteración enzimática y el daño genético debido primordialmente a una pérdida de los mecanismos naturales de reparación celular (Mc Donald y Nelson, 1986; Bradbeer, 1988).

## **LATENCIA**

Para que la germinación ocurra, las semillas por lo general requieren de humedad, una temperatura adecuada y en la mayoría de los casos de una atmósfera aeróbica. Si uno o más de estos requerimientos no se satisfacen, la germinación no ocurrirá, y en esta condición puede decirse que las semillas están en un estado de latencia impuesta. La latencia se define cuando la semilla de una especie dada falla para germinar, bajo condiciones de humedad, temperatura y oxígeno que normalmente son favorables para los estadios posteriores de la germinación y crecimiento de dicha especie (Bradbeer, 1988). La latencia o dormancia puede deberse a varios

factores que actúan solos o en combinación. Los más comunes son:

- 1) Cubierta de la semilla impermeable al agua, al oxígeno o a ambos.
- 2) Cubierta de la semilla resistente mecánicamente a la expansión del embrión.
- 3) Embrión rudimentario o Inmaduro.
- 4) Necesidad para cambios fisiológicos posteriores (maduración posterior) en un embrión completamente desarrollado.
- 5) La presencia de sustancias química que Inhiben la germinación (Cronquist, 1984).
- 6) Requerimientos de luz .

Existen varios mecanismos utilizados para romper la latencia impuesta de las semillas, entre ellos se encuentran la congelación, es decir, la exposición de éstas a bajas temperaturas (entre uno y cero grados centígrados), el almacenamiento en seco y a altas temperaturas y la escarificación o abrasión, los cuales se utilizan con la finalidad de romper la cubierta dura de algunas semillas; la lixiviación de inhibidores de germinación, que son liberados durante la Imbibición de algunas semillas; la exposición a productos químicos (fitorreguladores) y la aplicación de luz que dependiendo del tipo de semilla puede tener efectos de inducción, inhibición o ninguno de los dos (Bradbeer, 1988).

## **GERMINACIÓN Y VIABILIDAD**

Se presume que el proceso de germinación comienza con una secuencia de eventos a nivel molecular y celular, que precede al crecimiento visible del embrión. Usualmente se toma a la protrusión de la radícula a través de la cubierta seminal como el dato cuantitativo de la germinación, aunque existen ciertas circunstancias donde otro criterios han sido utilizados, tales como la curvatura geotrópica de la radícula en un embrión aislado. Otro criterio es que la germinación se ha completado cuando todas las reservas alimenticias de la semilla han sido consumidas y la plántula es capaz de una existencia independiente (Bradbeer, 1968).

El agua es primordial por lo que la semilla debe absorber una buena cantidad antes de que se inicie la germinación; el primer estadio de la germinación llamado imbibición es por lo tanto de rápida toma de agua, no hay crecimiento sino hasta que se alcanza un cierto nivel crítico de agua. Después de la imbibición la absorción de agua decrece, la germinación prosigue y empiezan los procesos irreversibles que llevan al crecimiento y desarrollo de la plántula (Bidwell, 1979).

Para que una semilla germine y origine una nueva planta, son necesarias diversas condiciones que se pueden agrupar en dos clases: condiciones intrínsecas y condiciones extrínsecas. Las primeras, son las que se refieren a la semilla misma, siendo tres las principales:

- 1) Que la semilla esté normalmente constituida, tanto el embrión como las sustancias de reserva.
- 2) Que la semilla esté madura, en cuyo caso el embrión ha alcanzado su completo desarrollo.

- 3) El embrión debe estar vivo en el momento en que se siembra la semilla, o sea, conservar su facultad germinativa que le permita desarrollarse normalmente y formar una nueva planta.

Las condiciones extrínsecas o externas son las que deben poseer el medio ambiente en el cual va a germinar la semilla:

- 1) El agua, es indispensable durante la germinación.
- 2) El aire, que lleva el oxígeno, es indispensable durante toda la vida del embrión.
- 3) Una temperatura apropiada, como se sabe, es un factor indispensable para toda manifestación vital (Ruiz Oronoz, 1983).

Durante la germinación de la semilla del maíz (*Zea mays*), la radícula crece hacia abajo a través de la hendidura de la cubierta seminal, para producir la raíz primaria; mientras que el vástago, encerrado en su vaina protectora, el coleoptilo, crece hacia arriba. Cuando el coleoptilo alcanza la superficie del suelo, cesa de crecer y las hojas de la plúmula de reciente formación atraviesan su ápice y continúan creciendo. El sistema radical se desarrolla con la formación ocasional de ramas o raíces secundarias a partir de la raíz primaria.

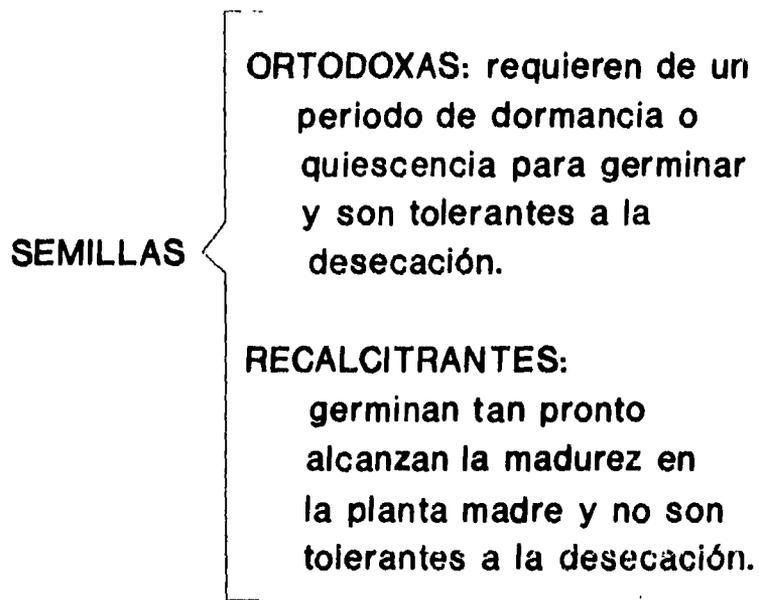
La edad de las semillas es un factor de importancia en la germinación. Contrariamente a la creencia popular, pocas son las que pueden sobrevivir durante muy largo tiempo. Hay constancia auténtica de que algunas sobrevivieron un almacenaje de más de cien años, pero la mayoría duran cuando mucho unos pocos años (10 años en promedio) (Bidwell, 1979; McDonald y Nelson, 1986).

Una semilla viable es aquella que es capaz de germinar bajo condiciones

adecuadas. La definición incluye a las semillas latentes, en cuyo caso la latencia debe romperse antes que la viabilidad pueda ser medida por la germinación. Una semilla no viable, es entonces, aquella que falla para germinar aún en condiciones óptimas, incluyendo los tratamientos para remover la latencia. La definición práctica de viabilidad depende del contexto en que se use; por ejemplo, para el ecologista, la viabilidad implica la habilidad de la semilla para germinar y la habilidad de la plántula para establecerse en el ambiente en el que la semilla se encuentra. Sin embargo, cuando las semillas son utilizadas para producir un cultivo, por ejemplo, entonces la viabilidad es una medida de la adecuación del lote de semillas para producir una cosecha satisfactoria. (Bradbeer, 1988).

#### **TOLERANCIA A LA DESECACIÓN**

Dependiendo de sus requerimientos para germinar, las semillas han sido clasificadas en recalcitrantes y ortodoxas. Las primeras pueden germinar tan pronto alcanzan la madurez en la planta madre y no son tolerantes a la desecación; las segundas, al alcanzar la madurez en la planta madre, requieren de un periodo de descanso denominado quiescencia y son tolerantes a la desecación (fig. 2) (Leopold, 1990). En el caso de las semillas ortodoxas, la semilla es una estructura de reposo, los procesos metabólicos están suspendidos o tienen lugar muy lentamente; las semillas están en una condición de vida interrumpida, debido principalmente a la carencia de agua y oxígeno (Bidwell, 1979). Las semillas en general, tienen un contenido de agua relativamente bajo, y los procesos fisiológicos necesarios para la germinación ocurren sólo cuando la proporción de agua ha aumentado (Cronquist, 1984).



**Figura 2.- Clasificación de las semillas, según sus requerimientos para germinar, de acuerdo a Leopold, 1990.**

En el reino vegetal, la tolerancia a la desecación ocurre en un amplio rango de taxa y estructuras. Las semillas ortodoxas de angiospermas, son las estructuras más tolerantes a la desecación, lo que las provee de ventajas importantes, por ejemplo el evadir medios ambientes estresantes: la desecación, es una adaptación común a periodos de sequía, permite la sobrevivencia en temperaturas extremas, una prolongada sobrevivencia de las semillas y provee de una capacidad de dispersión facilitada, principalmente por la acción del viento (Leopold, 1990).

Mientras el agua se pierde de la célula, se inician los procesos regulatorios que ajustan el metabolismo celular a las nuevas condiciones celulares, por lo que la adquisición de la tolerancia a la desecación es un proceso gradual. Aproximadamente en la mitad de su desarrollo, las semillas pasan rápidamente de un estado de intolerancia al de tolerancia a la desecación y se pierde pocas horas después de iniciada la germinación (Dasgupta y col., 1982), por lo general, se considera la emergencia de la radícula de la cubierta seminal, como el estadio de la germinación en que se pierde la tolerancia a la desecación (Koster y Leopold, 1988).

Las adaptaciones estructurales a la desecación, deben proporcionar algunos atributos a las paredes celulares, membranas celulares, desensamblaje de polisomas y hebras de actina y finalmente la adquisición de un plegamiento reversible y la condensación de las macromoléculas del citoplasma (Leopold, 1990).

Entre los mecanismos propuestos que confieren a las semillas la habilidad para sobrevivir en desecación extrema, se menciona, la acumulación de ciertos azúcares como los principales responsables en el desarrollo de la tolerancia a la desecación (Koster y Leopold, 1988); las proteínas también deben participar en la protección de los componentes intracelulares durante la desecación, sus mecanismos de acción deben ser análogos a los propuestos para prevención o reparación de agregados de

proteínas desnaturalizadas por algunas proteínas de estrés térmico (heat shock) y éstas deben participar también, aunque menos directamente, en las propiedades del agua de unión de la semilla (Blackman y col., 1991).

Una respuesta metabólica común de las plantas al agobio hídrico es la elevación en los niveles de ácido abscísico (ABA). Además de su participación en respuestas a estrés, el ABA está involucrado en conservar la embriogénesis. La síntesis de muchas proteínas de almacenamiento es regulada por ABA en embriones aislados y los genes inducidos por estrés hídrico también son expresados durante la embriogénesis tardía, cuando los embriones pierden agua de manera natural (Robertson y Chandler, 1992).

En 1965, Webb trabajando con células bacterianas, notó que el desarrollo del endurecimiento (formación de la endospora) estaba asociado con la acumulación de inositol, sugiriendo que la acumulación de polioles tales como el inositol podría proveer los componentes hidrofílicos (hidroxilos) que deben reemplazar el agua celular mientras continúa la desecación. Él llamo a ésta la hipótesis del reemplazamiento del agua (citado en Leopold, 1990).

El estado de vitrificación, es un estado altamente viscoso, metaestable y amorfo, que debe proporcionar varios beneficios a los tejidos desecados, incluyendo limitaciones en la pérdida adicional de agua y la supresión de reacciones químicas que pueden amenazar la sobrevivencia de organismos desecados (Burke, 1986). Sin vitrificación, las sales citoplasmáticas y proteínas pueden cristalizarse durante la pérdida de agua con efectos catastróficos en la sobrevivencia (Leopold, 1990).

Los azúcares solubles, tales como la sacarosa, rafinosa y estaquiosa, son los principales agentes de vitrificación en las plantas (Wendell y Leopold, 1993).

Muchos organismos en el estado de tolerancia a la desecación, contienen grandes

cantidades de azúcares. En las semillas ortodoxas, se ha asociado su tolerancia a la desecación con la acumulación de grandes cantidades de sacarosa, normalmente acompañada con oligosacáridos largos tales como la rafinosa y estaquiosa (Leopold, 1990). La sacarosa, es un protector de membranas muy efectivo en los sistemas de modelos, sus grupos hidroxilos pueden reemplazar el agua por unión de hidrógenos a las cabezas de los grupos fosfolípidos de la membrana. Sin embargo, la sacarosa por si sola puede cristalizar, lo que es favorecido por un secado lento, en estas condiciones los hidroxilos no están disponibles. Alternativamente la sacarosa puede formar un vidrio amorfo durante el secado. En este estado, los hidroxilos de los azúcares pueden estar libres para unirse a las membranas. La formación del estado vitreado puede estar favorecida por la presencia de oligosacáridos que rompen las matrices de cristales normales. Entre varios azúcares y compuestos orgánicos probados, la rafinosa y la estaquiosa fueron los más efectivos en inhibir el crecimiento de los cristales de sacarosa.

Durante la germinación, hay pérdida de tolerancia a la desecación, lo cual está unido al consumo de las reservas de los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa). De ahí, que se sospeche, que los azúcares, en materiales vegetales tolerantes a la desecación, son esenciales para sobrevivir en el estado desecado.

El alto contenido de azúcares en las semillas (hasta de un veinte por ciento) sugiere la posibilidad de formación del estado vitreado, si éste puede formarse durante la desecación, proporcionará varios efectos benéficos incluyendo una limitación en la pérdida de agua, una limitación de la cristalización de sales o proteínas y una protección contra cambios en el pH del agua (Leopold, 1990).

En general se piensa que un número de genes inducidos por la deficiencia de agua protegen las estructuras celulares de los efectos de la pérdida de agua. Estas

predicciones se derivan de la secuencia de aminoácidos deducidos y de sus características de expresión. Estos genes, frecuentemente denominados como *lea* (late embryogenesis abundant gene) fueron primero identificados como genes que se expresan durante las fases de maduración y de desecación en el desarrollo de las semillas. Cuando menos seis grupos de los genes *lea* han sido identificados, basados en la secuencia de aminoácidos entre varias especies. La mayoría de los productos de los genes *lea* son predominantemente hidrofílicos, basándose en su composición de aminoácidos, carecen de cisteínas y triptofanos y se han propuesto que están localizados en el citoplasma y en núcleo. Las secuencias de aminoácidos individuales y la predicción de la estructura proteica han sido utilizadas para proponer funciones específicas para cada grupo de proteínas LEA. Estas funciones incluyen: secuestro de iones, protección de otras proteínas o membranas y renaturalización de las proteínas no plegadas (Bray, 1993).

Las dehidrinas (dehydration proteins), también conocidas como la familia LEA D-11, se caracterizan por una secuencia consenso de quince aminoácidos **EKKGIMDKIKEKLPG** que esta presente cerca del extremo carboxilo terminal y en copias adicionales río arriba del término, en muchos casos, se encuentra una pequeña modificación del consenso con 14 aminoácidos **KKGIKEKEKLPG** (Close y col., 1993a). Cuando menos treinta genes diferentes han sido identificados como miembros de este grupo, su posible función incluye la de chaperoninas o alguna que preserve la estructura proteica (Dure, 1993).

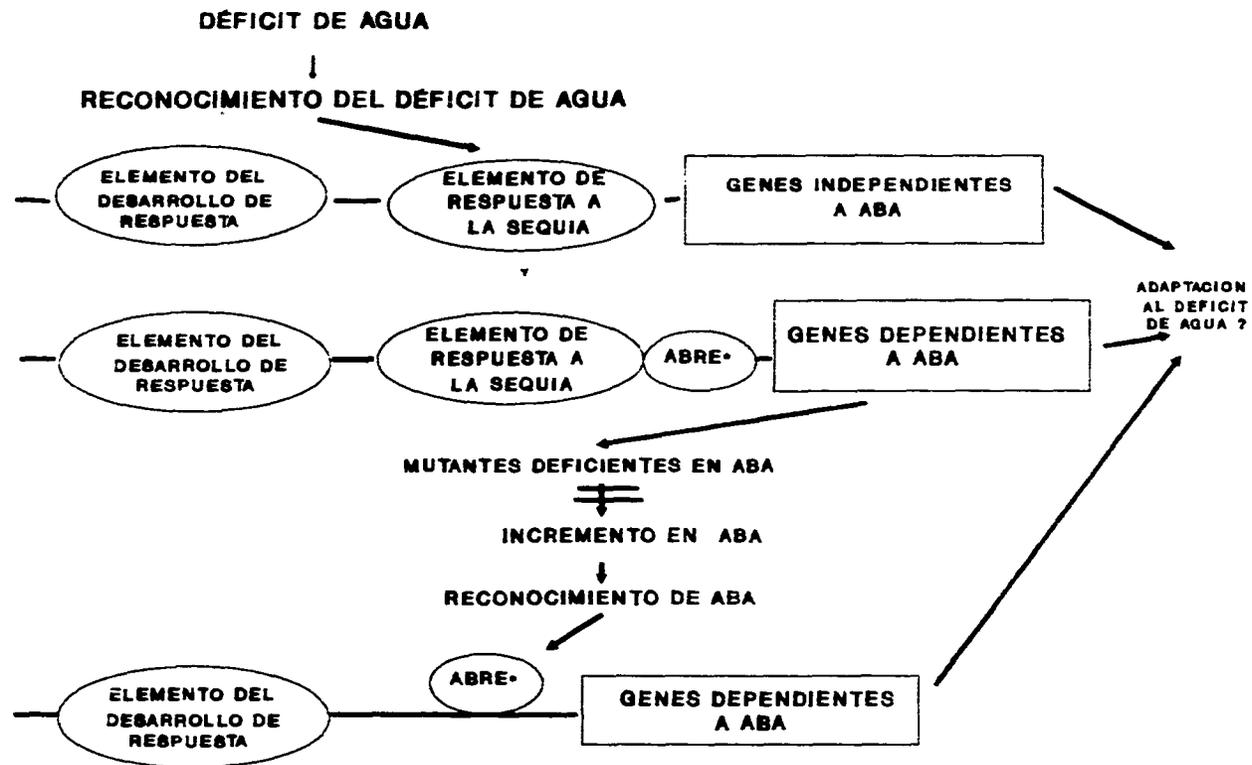
El tamaño de las dehidrinas va de 15 a 150 kDa, las cuales generalmente son codificadas por familias multigénicas, cuyos miembros individuales están presentes como alelos múltiples en el genoma total de cada especie de planta (Close y col., 1993a).

Frecuentemente, se ha pensado que la pérdida de turgor o cambio en el volumen celular como resultado a diversos ambientes estresantes, permite la detección de la pérdida de agua a nivel celular. Uno o ambos cambios, deben activar canales estrechamente relacionados, alterar la conformación o la yuxtaposición de proteínas críticas, o causar alteraciones en la célula de la continuidad pared-membrana plasmática (Ding y Pickard, 1993), de esta forma, disparando una o varias vías de transducción de señales se induce la expresión génica.

El ABA es un fitorregulador, que también se acumula en respuesta al fenómeno físico de pérdida de agua causada por diferentes tipos de estrés, y la elevación del ABA endógeno, se sabe que induce ciertos genes inducidos también durante el déficit de agua (fig. 3). De ahí que se hayan clasificado a los genes inducidos por deficiencia de agua en ABA dependientes y ABA independientes. Varios genes inducidos por sequía no son expresados en mutantes deficientes de ABA en comparación con la muestra silvestre. Estos genes, se han denominado ABA dependientes.

Se sabe que el ABA, interactúa con las células guarda de la epidermis de la hoja para inhibir la apertura estomática, en las células embrionarias inhibe los procesos de germinación (Hetherington y Quatrano, 1991).

Durante el desarrollo de la semilla, tanto en monocotiledóneas, como en dicotiledóneas, un juego de productos génicos se acumulan en los embriones que incluyen una variedad de proteínas tales como lectinas (Raikel y Wilkins, 1987), inhibidores de enzimas (Mundy y col., 1986), proteínas membranales de cuerpos lipídicos (Hatzopoulos y col., 1990) y un número de proteínas funcionales no caracterizadas que aparecen durante la adquisición del embrión de la habilidad de tolerar a la desecación (Dure y col., 1989). Si estos embriones son aislados en



ABRE•: ELEMENTO DE RESPUESTA A ABA.

**Figura 3.- Genes dependientes e independientes de ABA (Bray, 1993).**

**etapas tempranas del desarrollo y expuestos a ABA exógeno en cultivo, la mayoría de las mismas proteínas se acumulan precozmente (Quatrano, 1987; Skriver y Mundy, 1990). En ausencia de ABA, estos productos no se acumulan, el embrión no madura, no adquiere tolerancia a la desecación y germina precozmente en plántulas (Quatrano y Marcotte, 1993).**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### GERMINACIÓN

Para obtener la curva de germinación de las semillas de maíz, se colocaron lotes de 15 a 20 semillas en la parte media de una toalla de papel humedecido en agua corriente. Se enrolló la toalla y se sumergió el extremo proximal a la radícula en 200 ml de agua corriente, contenida en un vaso de precipitado de 1000 ml y el otro extremo se cubrió con otro vaso de precipitado del mismo volumen, se sellaron los extremos de los vasos con cinta adhesiva, para formar una cámara de humedad y la cámara se colocó en una incubadora a 25°C.

Para medir el porcentaje de germinación, se sacaron las toallas de las cámaras de humedad en los tiempos de análisis (6, 18, 30 y 42 h) y se desenrollaron y cuantificaron el número de semillas que presentaron protrusión de la radícula (tan pronto rompía la cubierta seminal), lo cual nos indicó que la semilla habían germinado, se volvieron a enrollar las semillas que aún no habían germinado y se colocaron de nuevo en la cámara de humedad, hasta la siguiente medición, con los resultados se obtuvieron la velocidad y porcentaje de germinación. Los resultados reportados son la media de tres experimentos independientes hechos por duplicado cada uno ( $3(n+n)$ ), donde  $n$  es igual al número de semillas.

### EMERGENCIA

Para conocer el vigor de las plántulas obtenidas durante la germinación, las semillas se sembraron en un soporte inerte (vermiculita) a una profundidad de 0.5 cm, la vermiculita fué previamente humedecida con agua corriente y exprimida con el fin de evitar el exceso de agua. El contenedor se colocó en una incubadora a

25°C y se midió diariamente la cantidad de coleoptilos que emergían hasta completar la totalidad de las semillas, o al transcurrir una semana desde que éstas habían sido sembradas. De esta forma, además se obtuvieron la velocidad y el porcentaje de emergencia de las semillas. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos independientes hechos por triplicado cada uno.

### VIABILIDAD Y VIGOR

En el presente trabajo se consideró la viabilidad como la capacidad de la semilla para germinar bajo condiciones adecuadas (25° C, 100% humedad relativa), por lo que los experimentos de germinación y emergencia se tomaron como una medida de la viabilidad de la semilla.

El vigor es la capacidad de la semilla para emerger (protrusión del coleoptilo) através de un soporte inerte (vermiculita) y establecer una plántula. Para su medición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de vigor} = \frac{a/1 + b/2 + c/3 + d/4}{S} \times 100$$

donde a, b, c y d representan respectivamente el número de semillas que germinan después de 1, 2, 3 y 4 días de imbibición a 25°C y S representa el número total de semillas en el lote (Bradbeer, 1968). Los resultados son la media de dos experimentos independientes hechos por duplicado (2[n+n]).

## **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD**

Para determinar el contenido de humedad de las semillas y embriones durante la germinación (0, 6, 18 y 30 h), después del tratamiento (6, 18 y 30 h) y del almacenamiento (6, 18 y 30 h), se utilizaron cajas de aluminio numeradas (tres por cada tiempo), se pesaron para sustraer su peso del obtenido al colocar dentro diez semillas o embriones de cada lote antes y después de introducirlas en un horno de vacío a 100°C durante 3 días, al retirarlas del horno, las cajas se colocaron en un desecador que contenía sílica gel para permitir que se estabilizara la temperatura y pesar las cajas evitando su hidratación con la humedad ambiental. El peso obtenido de las semillas antes de colocarlas en el horno fué el peso fresco (PF) de éstas y el peso obtenido al sacarlas del horno fué el peso seco (PS). Para determinar el contenido de humedad en base al peso seco, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PS}} \times 100$$

Los resultados mostrados son la media de tres experimentos independientes hechos por duplicado cada uno (3{n+n}).

### **DISECCIÓN DE EMBRIONES**

Se disectaron embriones para medir el contenido de humedad y para cuantificar los azúcares solubles, para ello se utilizó una navaja de afeitar para separar el embrión cada semilla del endospermo y se retiró la cubierta seminal adyacente a este.

### **DISECCIÓN DE EJES EMBRIONARIOS**

Para determinar el comportamiento de las PNCC, se disectó el embrión de la semilla y se separó cuidadosamente el eje embrionario del endospermo con la ayuda de una navaja de afeitar.

### **TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS SEMILLAS**

Para preparar el material para el análisis de azúcares solubles y PNCC, se tomaron a tiempos específicos de la imbibición de la semilla (6, 18, 30 y 42 h), muestras de cuando menos 280 semillas, por cada experimento (tres) hecho por duplicado (n+n) y se deshidrataron hasta su contenido de humedad inicial. Las semillas embebidas se colocaron dentro de bolsas de malla de plástico en un desecador F42010 Scienceware con válvula, conteniendo silica gel y conectándose a vacío, durante 3 días; posteriormente la mitad de las semillas fueron almacenadas durante 30 días en desecador con silica gel a 4°C.

## **EXTRACCIÓN DE AZUCARES**

Los embriones de cinco semillas se pesaron y se homogenizaron en un mortero con un poco de arena de mar estéril, se le adicionó la diferencia con etanol al 80% para mantener una relación de la mezcla de 1:5/p/p, se hirvió durante tres minutos y se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo con fondo de pirámide invertida. Se introdujo en un bloque de calentamiento a una temperatura de 80°C, para evaporar el etanol durante la noche, se resuspendió la pastilla en 0.5 ml de agua estéril y se analizaron los azúcares solubles de la muestra.

## **CUANTIFICACIÓN DE MONOSACÁRIDOS (GLUCOSA Y FRUCTOSA), SACAROSA Y RAFINOSA**

Para cuantificar el cambio en los azúcares durante la germinación, tratamiento y almacenamiento, se utilizaron los juegos de diagnóstico de Boehringer y se siguieron las indicaciones del proveedor (Boehringer, 1989).

*El principio para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa, consiste en que la concentración de D-glucosa es determinada antes y después de la hidrólisis enzimática de la sacarosa; la D-fructosa es cuantificada después de la determinación de D-glucosa. A pH 7.6, la enzima hexoquinasa cataliza la fosforilación de la D-glucosa por ATP (trifosfato de adenosina) con la formación simultánea de ADP (difosfato de adenosina). En presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa la glucosa-6-fosfato formada es oxidada específicamente por NADP (fosfato de nicotinamin-adenin dinucleótido) a gluconato-6-fosfato con la*

formación del NADP reducido (NADPH), el NADPH formado en esta reacción es estequiométrico con la cantidad de D-glucosa y se midió el cambio en un espectrofotómetro Beckman a 340 nm.

La hexoquinasa también cataliza la fosforilación de D-fructosa a fructosa-6-fosfato con la adición de ATP, la cual es convertida por la fosfoglucosa isomerasa a glucosa-6-fosfato que nuevamente reacciona con NADP durante la formación de gluconato-6-fosfato y NADPH. La cantidad de NADPH producido ahora es proporcional a la cantidad de D-fructosa.

A pH 4.6, la sacarosa es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -fructosidasa (invertasa) a D-glucosa y D-fructosa, la determinación de la D-glucosa obtenida después de la inversión, es llevada a cabo de acuerdo a lo antes ya mencionado, el contenido de sacarosa es calculado de la diferencia de la concentración de D-glucosa antes y después de la inversión enzimática.

La rafinosa es hidrolizada a pH 4.5 a D-galactosa y sacarosa en presencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa, la D-galactosa es oxidada por NAD (nicotinamin-adenin dinucleótido) a galacton-lactona en presencia de galactosa deshidrogenasa, la cantidad de NADH formado es estequiométrica con la cantidad de rafinosa y se leyó su producción a 340 nm. Los resultados son la media de tres experimentos independientes hechos por duplicado (3(n+n)).

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS PROTEINAS NO COAGULABLES POR CALOR (PNCC) (Modificado de Blackman, 1991).**

Se extrajeron manualmente los ejes embrionarios de 5 semillas, se pesaron y se homogenizaron en un mortero con un poco de arena de mar y 50  $\mu$ l del amortiguador de extracción, el homogenado se colocó en un tubo de microcentrífuga, utilizando el resto del buffer de extracción (450  $\mu$ l) para recuperar del mortero la mezcla adherida a este, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se calentó a 80°C durante 10 minutos, se centrifugó nuevamente y se separó de esta forma la proteína coagulada por el calor, se recuperó el sobrenadante y en este se determinó la cantidad de proteína, por el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Se tomaron 50  $\mu$ g de la proteína estable al calor y se corrió en un gel de SDS-poliacrilamida con gradiente de 10 al 18% (donde la relación de acrilamida-bisacrilamida es de 30:1) tiñéndose con azul de Coomasie.

**Buffer de extracción: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 500 mM, MgCl 5 mM y PMFS 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) .**

## **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY (Lowry et al 1951).**

Se adicionaron 0.5 ml de la solución A, a cada tubo preparado previamente de acuerdo a la tabla 1, se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se adicionó 0.5 ml de la solución de Fenol-folín. Los tubos se incubaron durante 30 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro a 750 nm. Las absorbancias se graficaron contra los mg de proteína. Para cuantificar proteína en el extracto, se utilizó una alícuota de éste (50 a 100  $\mu$ l tabla 1) y se trató en forma similar a las muestras de la curva patrón. El contenido de proteína del extracto proteico se calculó por interpolación en la curva patrón.

### **Solución A:**

**Mezclar partes iguales de:**

- Carbonato de sodio al 10%, tartrato de sodio-potasio 0.2% y sulfato de cobre al 0.1%
- SDS 10% (dodecil sulfato de sodio)
- Hidróxido de sodio 0.8 N
- Agua

### **Solución de Fenol-folín:**

**Mezclar en una relación de Folín Ciocalteau:agua 1:5.**

Tabla 1.- Elaboración de una curva patrón para la cuantificación de proteína total por el método de Lowry. BSA (albúmina sérica bovina) como estandar de proteína, DOC (deoxicolato de sodio).

No. tubo	Concentración BSA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Volumen muestra $\mu\text{l}$	Volumen agua $\mu\text{l}$	0.15% DOC $\mu\text{l}$
1	-	-	900	100
2	1	-	800	100
3	2	-	880	100
4	4	-	860	100
5	8	-	820	100
6	10	-	800	100
7	-	50	850	100
8	-	100	800	100

**ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DE SDS-ACRILAMIDA** (Tomado de Bollag y Edelstein, 1991).

Para determinar los cambios en las PNCC durante la germinación, tratamiento y almacenamiento se corrieron geles de electroforesis en gradiente como sigue:

Se preparó el equipo de electroforesis y el hacedor de gradientes, calibrándose la bomba peristáltica a una tasa de flujo de 3 ml/min. Se prepararon 10 ml de solución de acrilamida al 10% y otros 10 ml a una concentración de 18% partiendo de una solución que contenía una proporción 30:1 acrilamida:bisacrilamida, de acuerdo a la tabla 2, sin añadir el TEMED.

Tabla 2.- Elaboración del gel separador para electroforesis en gradiente.

REACTIVOS	Solución al 10%	Solución al 18%
Solución de acrilamida-bisacrilamida 30:1	5.00 ml	9.00 ml
Buffer 4X, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4 %	3.75 ml	3.75 ml
Agua bidestilada	6.20 ml	-
Sacarosa	-	2.25 g
Persulfato de amonio	75.0 $\mu$	75.0 $\mu$
TEMED	7.5 $\mu$	7.5 $\mu$

Se colocó el temed y se mezcló rápidamente en ambas soluciones las cuales se colocaron en el hacedor de gradientes teniendo cuidado que la solución al 18%

quede en el vaso proximal a la salida del flujo. Se abrió la llave de paso del hacedor de gradiente y se encendió la bomba peristáltica para permitir que fluyera el gradiente dentro de la cámara de electroforesis. Una vez polimerizado el gel se adicionó la solución para la formación del gel de apilamiento, cuya composición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 - Elaboración del gel de apilamiento para electroforesis de SDS-Acrilamida.

REACTIVO	CANTIDAD
Solución de acrilamida-bisacrilamida 30:1	1.0 ml
Buffer de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%	1.5 ml
Persulfato de amonio	45 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

Se adicionó el buffer de electroforesis constituido por Tris-HCl, glicina, SDS el cual se preparó de una solución concentrada 10 X (30 g de Tris, 144 g de glicina, 10 g de SDS y agua, con un pH aproximado de 8.3).

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y se mezclaron con buffer de muestra (Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2% y mercaptoetanol 14.4 mM), se hirvieron durante 5 minutos y se colocaron en los carriles del gel de apilamiento.

Al terminar la electroforesis, se desmontó el gel con cuidado y se tiñó por 12 horas, con una solución de azul de coomasle R-250, metanol y ácido acético

glacial: 1.0 g de azul de coomasie R-250, 450 ml de metanol, 450 ml de agua y 100 ml de ácido acético glacial.

El gel se destinó con una solución de metanol y ácido acético glacial: 100 ml metanol, 100 ml ácido acético glacial y 800 ml de agua.

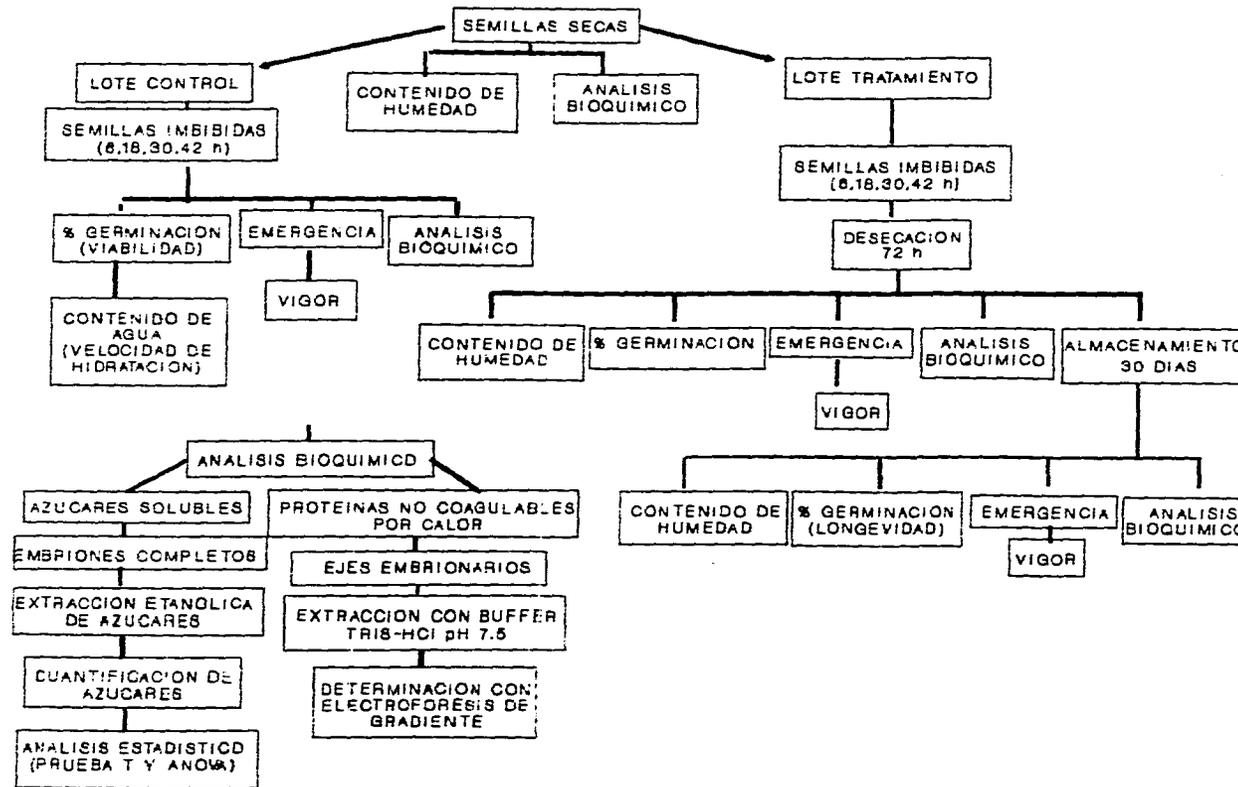
### **DENSITOMETRÍA DE GELES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNA**

Para medir los cambios sufridos en las PNCC durante la germinación, tratamiento y almacenamiento, los geles teñidos con azul de Coomasie se colocaron dentro de una bolsa de plástico transparente sellada y se barrió cada uno de los carriles del gel con un densitómetro Pharmacia GelScan XL para obtener cambios en la intensidad de cada una de las bandas de proteína por carril, los resultados fueron grabados en un disco de computadora y analizados con el programa del paquete de cómputo del mismo proveedor (Pharmacia).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En general se utilizaron los promedios y las desviaciones estándares en la mayoría de los experimentos cuantitativos, excepto para el análisis de los azúcares donde se utilizó el programa de computación MicroCal Origin, donde además de los parámetros estadísticos antes mencionados, se determinó la significancia de los resultados obtenidos, mediante la prueba T de Student así como su análisis de varianza .

## DIAGRAMA DE FLUJO DE METODOLOGIA EMPLEADA



## RESULTADOS

### VELOCIDAD DE HIDRATACIÓN

En la figura 4, se grafica las velocidades de hidratación de las semillas y los embriones de maíz obtenidas mediante la cuantificación del contenido de humedad. Durante las primeras 18 h de imbibición, la hidratación de las semillas mostró un comportamiento exponencial ( $r = 0.99$ ), en la cual se pueden observar dos diferentes velocidades: una rápida, comprendida entre las 0-6 h de imbibición y otra más lenta comprendida entre las 6-18 h. Después de este tiempo, se observa una fase estacionaria que se prolonga hasta las 30 h de imbibición, seguido de un segundo incremento en el contenido de humedad de la semilla que coincide con la protrusión de la radícula (desde las 30 a las 42 h). A cada tiempo de hidratación se determinó el contenido de humedad del embrión, el cual se aisló de la semilla hidratada en los tiempos especificados. El perfil de hidratación observado en este caso fué similar al de las primeras 18 h de imbibición mostrado por la semilla completa, diferenciándose en que los valores de hidratación alcanzados por el embrión después de las 6 h de imbibición fueron mayores que los registrados para la semilla completa.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la hidratación de la semilla en la germinación, se realiza en tres etapas. La fase I o de rápida hidratación, también denominada imbibición, y que en este trabajo está comprendida entre las 0-18 h (fig. 4), donde el incremento en el contenido de humedad de la semilla se debe principalmente a la fuerza mátrica de las macromoléculas de la semilla. Durante la fase II o fase estacionaria, 18-30 h en este trabajo, se realizan diversos eventos bioquímicos y genéticos que culminan en la elongación de la radícula o germinación. La fase III, caracterizada por un rápido aumento en el contenido de humedad de la

semilla, el cual se debe a la elongación celular del coleoptilo marcando el inicio del desarrollo de la plántula.

### **GERMINACIÓN Y TOLERANCIA A LA DESECACIÓN**

Para seleccionar el tiempo de germinación en el cual las semillas aún son tolerantes a la desecación, se evaluó la viabilidad y el vigor de las semillas hidratadas a diferentes tiempos (6, 18, 30 y 42 h), y deshidratadas rápidamente (tratamiento), a contenidos de humedad del 8-10%. El control utilizado en todos los experimentos fueron semillas del mismo lote inicial pero sin haber sido imbibidas.

Las semillas tratadas por 6 h y 18 h, mostraron características de viabilidad, emergencia de la plántula y vigor semejantes a las del control. En las semillas tratadas por 30 h ó 42 h (fig. 5), la viabilidad de las semillas no se modificó, sin embargo, la velocidad de germinación fué mayor en semillas tratadas por 30 h que en las tratadas por 42 h. La capacidad de emergencia del lote tratado, disminuyó desde las 30 h de tratamiento (fig. 6a), pero el vigor de las semillas que aún germinaron fué similar al presentado por las del lote control (fig. 7).

### **LONGEVIDAD**

Posteriormente se probó el efecto del tratamiento en la longevidad de la semilla. Las semillas fueron tratadas y almacenadas a 4°C. Después de 30 días de almacenamiento, las semillas fueron germinadas en toallas de papel para evaluar su viabilidad (fig. 8) ó en vermiculita, para determinar el vigor de la semilla como capacidad de emergencia (fig. 6b) o como vigor de germinación (fig. 7). La

viabilidad cuantificada como protrusión del lote de semillas, no se modificó durante el almacenamiento a ninguno de los tiempos de tratamiento estudiados (fig. 8), sin embargo, en semillas tratadas por 30 h y almacenadas, el porcentaje de emergencia de plántulas (fig. 6b) y el vigor de germinación de la semilla (fig. 7) disminuyó de forma notable.

Las semillas con altos contenidos de humedad (>12%) pierden vigor y viabilidad durante el almacenamiento (Bradbeer, 1988), por lo que se determinó el contenido de humedad de los embriones y de las semillas tratadas (fig. 9), encontrándose que durante el almacenamiento el contenido de humedad de los embriones aumentaba, pero el contenido de humedad en ningún caso rebasó el 10%, valor similar al que presentan las semillas control.

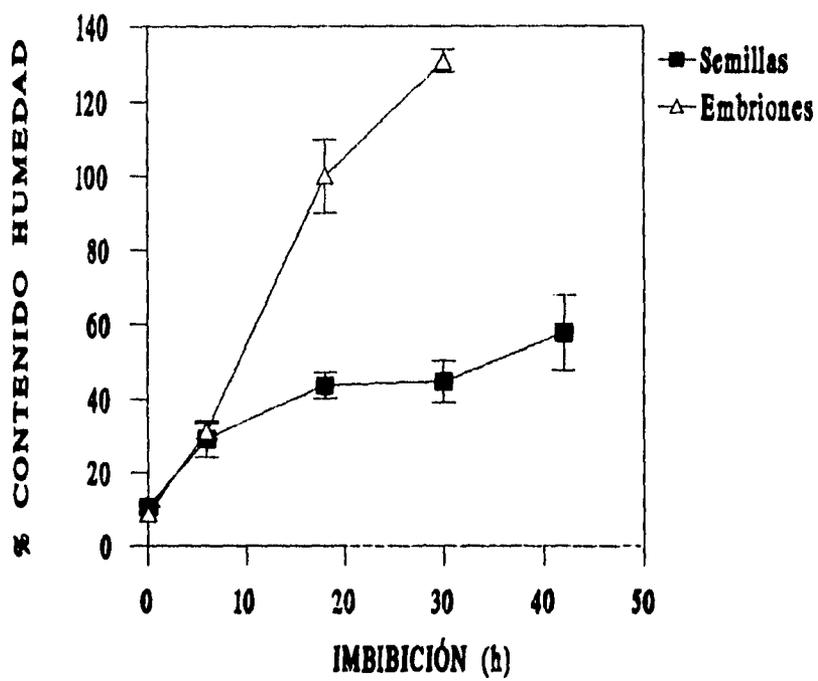


Fig. 4.- Velocidad de hidratación de semillas y embriones de maíz a 25°C.

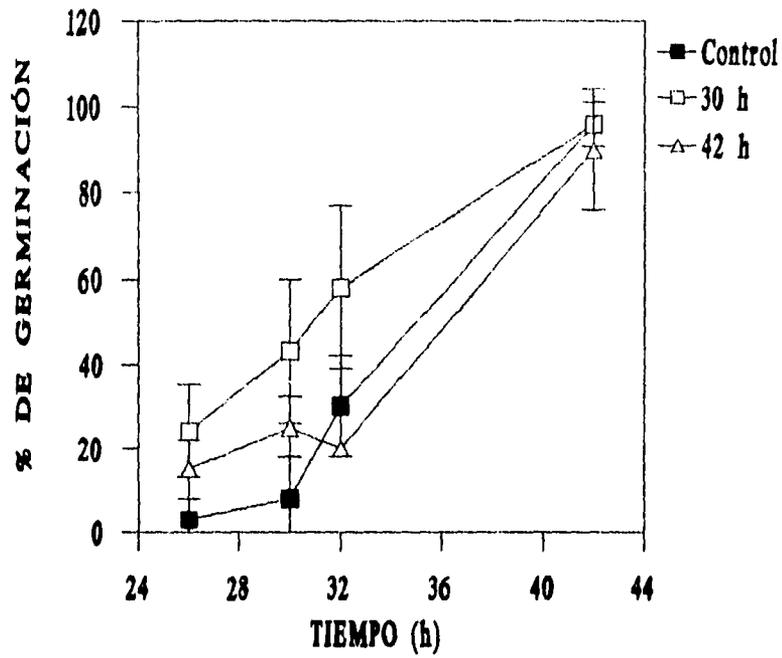


Fig. 5.- Perfil del curso temporal de la germinación de semillas de maíz a 25°C, después de incubarlas en agua por 30 y 42 h, tratadas en silica gel y vacío durante 72 h.

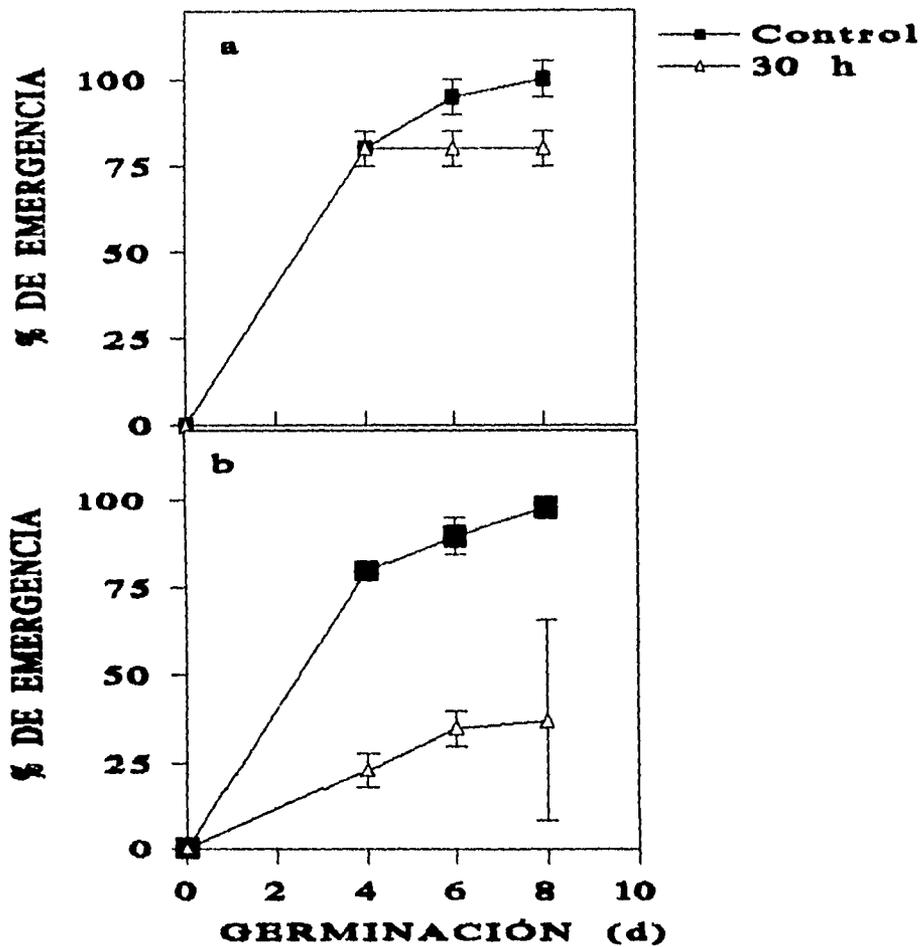
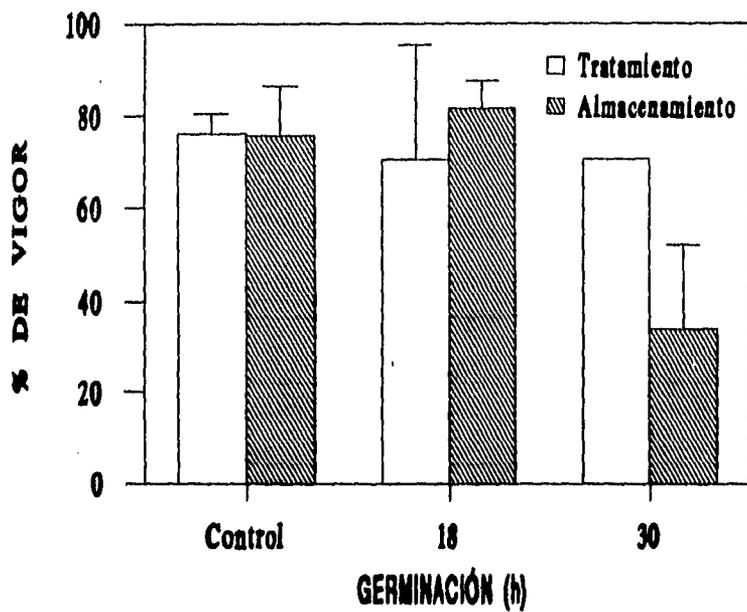
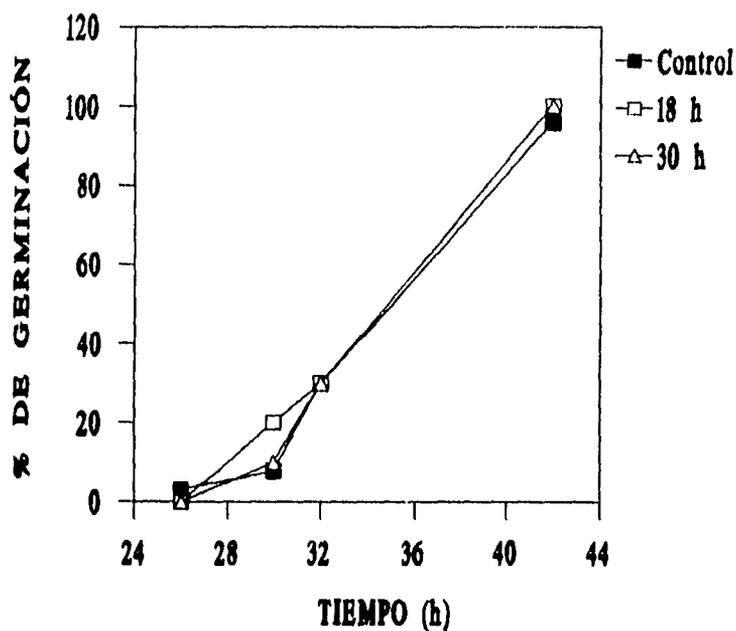


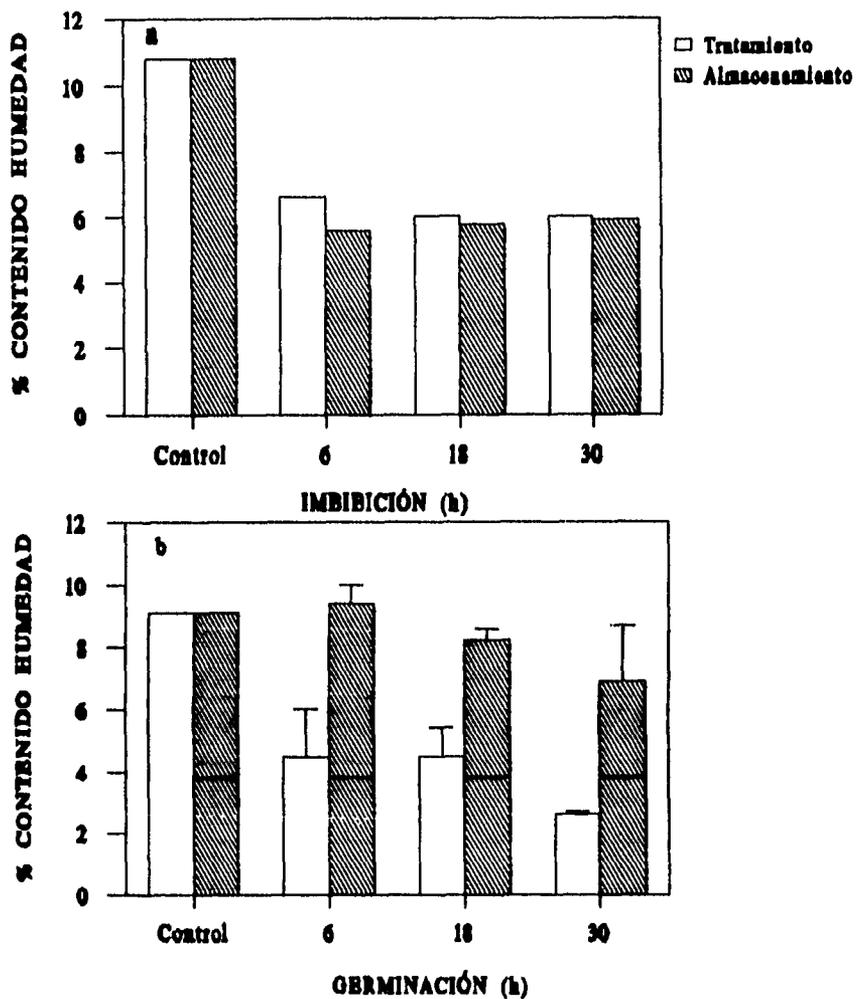
Fig. 6.- Perfil del curso temporal de emergencia de plántulas de maíz después de que las semillas fueron incubadas en agua durante 30 h y deshidratadas en sílica gel y vacío por 72 h (a) y almacenadas a 4°C en desecador durante 30 d (b).



**Fig. 7.- Cambios en el vigor de las plántulas obtenidas de semillas de maíz, después de ser incubadas en agua por 18 y 30 h, deshidratadas en sílica gel y vacío por 72 h (tratamiento) y almacenadas en desecador durante 30 d (almacenamiento).**



**Fig. 8.- Perfil del curso temporal de la germinación de semillas de maíz a 25°C, después de incubarlas en agua por 18 y 30 h, secadas en sílica gel y vacío durante 72 h y almacenadas cuando menos 30 días a 4 C en desecador.**



**Fig. 9.-** Contenido de humedad de lotes de semillas completas (a) y sus embriones (b), después del tratamiento de secado y del almacenamiento a 4°C en desecador, de semillas germinadas durante 0, 6, 18 y 30 h.

## **CONTENIDO DE AZÚCARES SOLUBLES**

Los azúcares presentes en el embrión de malz fueron: glucosa y fructosa (monosacáridos), sacarosa y rafinosa. De éstos, solo los dos últimos se encontraron en mayor proporción, siendo mayor el contenido de sacarosa que el de rafinosa. Durante la imbibición, sólo los niveles de rafinosa disminuyeron dramáticamente respecto a la semilla seca, mientras que los contenidos de monosacáridos y los de sacarosa permanecieron constantes durante las primeras 18 h de germinación para luego aumentar. El secado de las semillas embebidas, no incrementó en forma significativa los niveles de estos azúcares respecto a los mostrados por sus contrapartes germinadas. En general, el almacenamiento de semillas embebidas y secadas, no modificó los niveles de azúcares, con excepción de la sacarosa en semillas germinadas por 6 h donde, se observa un aumento en el contenido de este disacárido (tabla 4).

Tabla 4.- Contenido de azúcares durante la germinación, tratamiento y almacenamiento de semillas de maíz. Los valores representan la media de tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  desviación estándar.

<b>Tiempo</b>	<b>Germinación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Almacenamiento</b>
<b>MONOSACÁRIDOS</b>			
0 h	0.533 $\pm$ 0.147	-	-
6 h	0.737 $\pm$ 0.192	0.838 $\pm$ 0.298	0.547 $\pm$ 0.162
18 h	0.688 $\pm$ 0.152	0.752 $\pm$ 0.057	0.462 $\pm$ 0.098
30 h	0.825 $\pm$ 0.239	1.141	0.932 $\pm$ 0.268
<b>SACAROSA</b>			
0 h	89.71 $\pm$ 17.59	-	-
6 h	70.38 $\pm$ 17.86	97.64 $\pm$ 16.91	163.26 $\pm$ 17.07
18 h	94.69 $\pm$ 40.62	128.05	137.92 $\pm$ 36.14
30 h	127.28 $\pm$ 28.49	121.22 $\pm$ 41.43	140.31 $\pm$ 34.44
<b>RAFINOSA</b>			
0 h	6.72 $\pm$ 1.47	-	-
6 h	5.13 $\pm$ 1.70	8.89 $\pm$ 2.38	6.66 $\pm$ 0.88
18 h	2.35 $\pm$ 0.85	2.41 $\pm$ 1.74	3.81 $\pm$ 0.70
30 h	0.17 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.30	0.37 $\pm$ 0.19

Las unidades están dadas en mg por gramo de peso seco del embrión de la semilla de maíz.

## **PROTEÍNAS NO COAGULABLES POR CALOR**

Durante la imbibición de la semilla, el perfil de péptidos altamente hidrofílicos no varió, sin embargo, la abundancia relativa de estos mismos péptidos, se modificó, de forma tal, que su abundancia, respecto a la observada en la semilla, antes de iniciar la imbibición, dependió del tiempo de imbibición analizado. Dado que no hubo reproducibilidad en la determinación cuantitativa de cada uno de los péptidos (fig. 10), esta no se reporta. La desecación y el almacenamiento de semillas embebidas no modifica en forma importante los patrones cualitativos de las proteínas (fig. 10). Sin embargo se observa que a medida que procede la imbibición de la semilla dos grupos de péptidos disminuyen en forma considerable uno que comprende la región entre 10-24 Kd y el otro de 45 a 66 Kd. El secado induce la acumulación de estos péptidos, en semillas hidratadas por 18 h pero no en las embebidas por 30 h. El almacenamiento de las semillas previamente tratadas no modificó el patrón de péptidos con respecto al encontrado en la semilla tratada no almacenada.

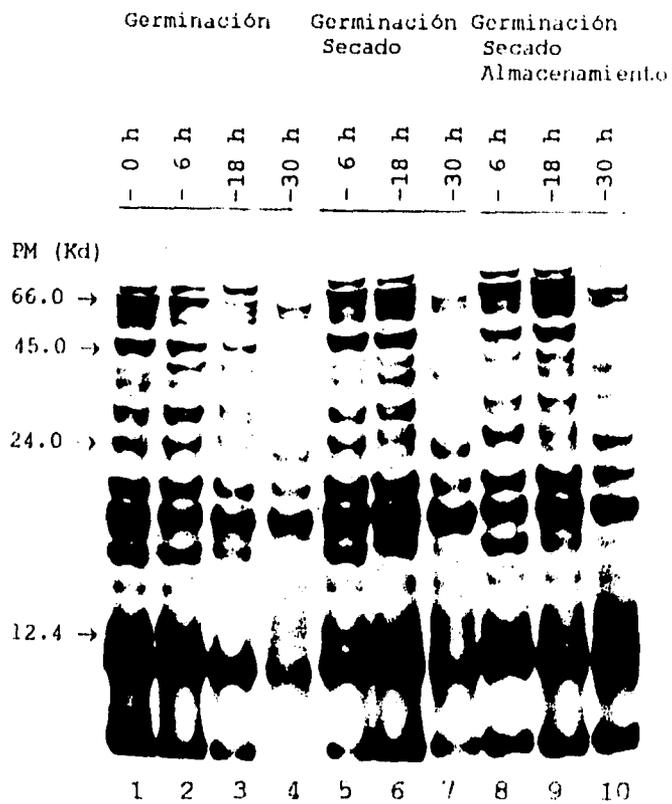


Fig. 10.- Perfil de proteínas no coagulables por calor.  
Se adicionó 50 µg de proteína en cada carril.

## **DISCUSIÓN**

Con la finalidad de demostrar si las biomoléculas que confieren tolerancia a la desecación de la semilla: carbohidratos solubles y proteínas altamente hidrofílicas (Blackman y col., 1992) también participan en el mecanismo de longevidad, se determinaron los niveles de éstos compuestos, en semillas de maíz con igual grado de tolerancia a la desecación pero de diferente longevidad.

La tolerancia a la desecación se definió como la capacidad de la semilla embebida (0-42 h) y desecada (72 h), para desarrollarse como plántula normal en un subsecuente periodo de imbibición. La longevidad se definió como el vigor que muestra la semilla embebida, desecada y almacenada, en un subsecuente periodo de imbibición.

### **ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA TOLERANCIA A LA DESECACIÓN Y LONGEVIDAD**

Los resultados de las figuras 6,7 y 8 y 9, en las que se muestra la sensibilidad a la desecación y la longevidad de los diversos lotes de semillas, indican que la tolerancia a la desecación se mantiene en semillas embebidas hasta por 30 h, mientras que la longevidad se disminuye desde este tiempo de imbibición. Esta disminución no fue debida a diferencias en el contenido de humedad de las semillas, puesto que éste fue similar para todos los tiempos de imbibición después del tratamiento de desecación (fig. 9). Mas aún, el contenido de humedad de la semilla embebida y desecada fue similar al de las semillas control (fig. 9). Lo anterior indica que la longevidad de la semilla se pierde antes que la tolerancia a la desecación. Dado que en las semillas utilizadas en este trabajo, la tolerancia a la desecación se mantuvo y lo que varió fue la longevidad, de aquí en adelante se hará referencia

sólo a semillas de alta y baja longevidad en el entendido de que ambos tipos de semillas presentan el mismo grado de tolerancia a la desecación.

## **PARTICIPACIÓN DE LOS AZUCARES Y PNCC EN LA LONGEVIDAD DE LA SEMILLA**

Para decidir si los azúcares y las proteínas no-coagulables por calor participan en mantener la longevidad de la semilla, lo que se hizo fué evaluar los contenidos de carbohidratos solubles (tabla 4) y el patrón de proteínas no-coagulables por calor (fig. 10).

### **AZUCARES**

Las semillas de menor longevidad presentaron niveles de sacarosa (14.32%) similares a los que presentaron las semillas con alto grado de longevidad (13.7% y 16.32%), sin embargo, los contenidos de rafinosa fueron entre 10 y 20 veces menores en semillas de bajo grado de longevidad (0.037%) que en semillas de alta longevidad (0.66% y 0.30%). Por su parte los niveles de monosacáridos fueron ligeramente mayores en semillas de baja longevidad que en semillas de alta longevidad (cuadro 4).

Los azúcares presentes en el embrión de la semilla con bajo contenido de humedad (<10% PS) son capaces de formar un estado vítreo (Williams y Leopold, 1989). Él cual es un líquido sólido de alta viscosidad que limita la difusión molecular y de esta manera evita las reacciones deletereas, como son: la pérdida de actividad

enzimática, la pérdida de la integridad membranal, la formación de radicales libres, etc. De acuerdo al consenso general en el área, estas reacciones son responsables del envejecimiento de las semillas (Priestley, 1988). Se ha demostrado que la estabilidad del estado vítreo depende de su composición química, es decir tipo y proporción de azúcares (Koster, 1991). A contenidos bajos de humedad (<15%) la rafinosa puede disminuir la tendencia de la sacarosa a cristalizar, por lo que su presencia resulta en una mayor estabilidad del estado vítreo. En el caso de las semillas embebidas por diversos tiempos, la proporción de los azúcares, especialmente la de rafinosa, varía y esto podría reflejarse en que durante el tratamiento de desecación, el estado vítreo formado en el embrión de la semilla, sea de diferente estabilidad y por tanto el grado de protección ofrecido por este mecanismo también sería diferente en cada caso. Por ejemplo a las 0 h de imbibición la proporción de rafinosa en el total de azúcares fué de 7%, a las 18 h de 2.42 % y a las 30 h de 0.13%. Lo anterior sugiere que el estado vítreo formado por sacarosa es suficiente para dotar a la semilla de tolerancia a la desecación, y que su estabilidad en el almacén, longevidad, depende de los contenidos de rafinosa. Resultados similares se han encontrado en granos de polen maduros (Hoekstra y col., 1991) los cuales acumulan solo sacarosa y presentan viabilidad de aproximadamente 30 días y en semillas de maíz de diferentes cultivares, donde la longevidad esta asociada a los contenidos de rafinosa (Bernal-Lugo y col., 1993).

#### **PROTEÍNAS NO COAGULABLES POR CALOR (PNCC)**

La participación de las proteínas no-coagulables por calor (altamente hidrofílicas) en la longevidad de la semilla no es tan claro como en el caso de la rafinosa,

primero porque no se ha establecido la forma como protegen a la semilla durante la desecación y segundo porque no se determinó si la recuperación de cada una de las proteínas era similar en cada caso. Sin embargo, algo que es muy notorio en la figura 10 es que los péptidos de peso molecular de 64.9 Kd, 45.3 Kd, 20.5 Kd y 14.4 Kd se encontraron en menor proporción en semillas de baja longevidad (fig. 10 carril 1, 8 y 9) y corresponden a los que durante el periodo de desecación de las semillas embebidas por 18 h disminuyen (fig. 10 carril 3) y se re-sintetizan y/o acumulan durante la deshidratación de las mismas (carril 6). Esto no se observa en semillas embebidas por 30 h, donde los péptidos si disminuyen durante la imbibición (fig. 10, carril 4), pero no aumentan cuantitativamente por efecto de la deshidratación de la semilla (fig. 10, carril 7). Estos resultados indican que la longevidad de la semilla esta asociada a la presencia de estos péptidos altamente hidrofílicos y que la capacidad para sintetizarlos y/o acumularlos depende de las características de longevidad de la semilla. Además sugieren que su síntesis y/o acumulación está regulada por cambios en el potencial osmótico de la semilla, pues durante la deshidratación de la semilla se observan niveles similares a los obtenidos en semilla fresca (fig. 10, carril 1).

En otros sistemas se ha demostrado que durante la desecación de plántulas, se acumulan proteínas altamente hidrofílicas (no-coagulables por calor), tales como las dehidrinas cuya función es la de proteger, a bajos contenidos de agua, las superficies celulares tales como la estructura de las macromoléculas y membranas y/o como inhibidores de enzimas, por ejemplo, fosfolipasas (Crowe, 1993). En el caso de semillas de maíz se ha demostrado la presencia de este tipo de proteínas cuyas características de solubilidad (no-coagulable por calor), los factores que inducen su degradación y su síntesis (germinación y desecación respectivamente), y

su peso molecular, coinciden con las propiedades de al menos uno de los péptidos asociados a longevidad (20.5 Kd) y es posible que este último sea también una dehidrina. Para demostrar de manera unequivoca que se trata de una dehidrina sería necesario demostrar su identidad inmunológica y/o a través de la determinación de su secuencia.

Si como antes se indicó las proteínas altamente hidrofílicas participan en la estabilización de superficies celulares cuando el contenido de agua es bajo, cabría esperar que semillas de baja longevidad presenten una menor integridad membranar que las de mayor longevidad. Esta expectativa se ve reforzada en el hecho de que en semillas de baja longevidad (30 h de imbibición, desecación y almacenamiento), los componentes celulares se escapan más que en las semillas de cualquiera de las otras condiciones (Bernal-Lugo, 1994; comunicación personal). Esto de nuevo sugiere que en semilla de baja longevidad, los azúcares y/o los péptidos altamente hidrofílicos del citoplasma no están realizando su función de estabilizar a los fosfolípidos de la membrana, quizá porque en el primer caso se estén cristalizando y en el segundo caso se modifiquen las características de solubilidad del péptido y/o se realice su proteólisis.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **CONCLUSIONES**

Del presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- 1.- La rafinosa juega un papel importante en la longevidad de las semillas ortodoxas.
- 2.- Aparentemente, solo algunas de las proteínas altamente hidrofílicas podrían estar asociadas a la longevidad de la semilla.
- 3.- En la tolerancia a la desecación, solamente la sacarosa parece estar participando.

## **PERSPECTIVAS**

El campo de estudio del presente trabajo es muy amplio, aún existen muchas incógnitas por resolver, algunas de ellas son:

- Los mecanismos por los cuales la poza de sacarosa se mantiene constante durante la germinación, ya sea por movilización de las reservas del endospermo (almidón), por la catálisis de la rafinosa o ambas.
- Determinar la limitante para la síntesis de novo de rafinosa durante el tratamiento (precursores o actividad enzimática). El efecto en el almacenamiento, de la administración exógena de rafinosa al embrión durante el tratamiento (microinyección).
- El análisis fino de los cambios en los niveles de las proteínas no coagulables por calor, durante las condiciones estudiadas, la utilización de anticuerpos contra proteínas de estrés en particular las sintetizadas por choque térmico a fin de identificar si alguna de las proteínas estables al calor pertenecen a este grupo, el empleo de mutantes en las proteínas estables al calor a fin de determinar cuál o cuáles de ellas están directamente involucradas en la longevidad de la semilla.

## REFERENCIAS

- Bidwell R.G.S. (1979) Fisiología Vegetal. AGT. México. 784 pp.
  
- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL y Leopold AC (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. Plant Physiol 96, 868-874.
  
- Blackman SA, Obendorf RL y Leopold AC (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. Plant Physiol
  
- Boehringer (1989) Methods of biochemical analysis and food analysis using test-combinations. Boehringer mannheim.
  
- Bradbeer J.W. (1988) Seed Dormancy and Germination. Blackie. Great Britain. 146 pp.
  
- Bray E.A. (1993) Molecular responses to water deficit. Plant Physiol 103: 1035-1040.
  
- Burke M.J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological system. Cornell University Press. Membranes Metabolism and Dry Organisms. USA.
  
- Close T.J., Fenton R.D. y Moonan F. (1993a) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. Plant Molecular Biology 23: 279-286.

- Close T J., et al (1993b) Dehydrin: The Protein. En *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*. ASPP pp 104-118.
- Crowe JH y Crowe LM (1982) Induction of anhydrobiosis: membrane changes during drying. *Cryobiology* 19: 317-328.
- Cronquist A.C., (1984) Introducción a la Botánica. Continental. México. 848 pp.
- Dasgupta J, Bewley JD y Yeung EC (1982) Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of Phaseolus vulgaris seeds. *Journal of Experimental Botany* 33(136): 1045-1057.
- Ding J.P. y Pickard B.G. (1993) Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J.* 3: 83-110.
- Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho TD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T y Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the *Lea* proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*. 12: 475-486.
- Dure L. (1993) The *Lea* proteins of higher plants. En: Control of Plant Gene Expression. Verma D.P.S., CRC Press, Boca Ratón. pp 325-335.
- Hatzopoulos P., Franz G., Choy L. y Surg R.Z. (1990) Interaction of nuclear factors with upstream sequences of a lipid body membrane protein gene from carrot. *Plant Cell* 2: 457.

- Hetherington A y Quatrano R.s. (1991) Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. New Phytol. 119:9.
  
- Hoekstra F.A., Crowe J.H. y Crowe L.M. (1991) Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of *Typha latifolia* L., as measured with Fourier transform infrared spectroscopy. Plant Physiol 97:1073-1079.
  
- Koster KL y Leopold AC (1988) Sugars and desiccation tolerance in seed. Plan Physiol 88: 829-832.
  
- Leopold AC (1986) Membranes, Metabolism, and Dry Organisms. Comstock. USA. 374 pp.
  
- Leopold A.C. (1990) Coping with Desiccation. En: Stress Responses in Plants: Adaptation and Accumulation Mechanisms. Wiley. USA. pp 37-56.
  
- Long S.R., Dale R.M.K. y Sussex I.M (1981) Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryonic axes in culture. Planta 153: 405-415.
  
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurements with the folin phenal reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
  
- McDonald M.B. y Nelson C.J (1986) Physiology of Seed Deterioration CSSA. USA 123 pp.

- Mundy J. et al (1986) Differential synthesis *in vitro* of barley aleurone and starch polyspermy proteins. Plant Physiol. 81: 630.
  
- Quatrano R.S. (1987) The role of hormones during seed development. En: Plant Growth and Development. P.J. Davies. Martinus Nijhoff Dordrecht. Netherlands. pp 494-514.
  
- Raikhel N.V. y Wilkins T.A. (1987) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding wheat germ agglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6745.
  
- Robertson M y Chandler PM (1992) Pea dehydrins: identification, characterisation and expression. Plant Molecular Biology 19: 1031-1044.
  
- Ruiz Oronoz M., Nieto D. y Larios I. (1983) Tratado Elemental de Botánica. Eclasa. México. 730 pp.
  
- Skriver K. y Mundy J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell 2:503.
  
- Still D.W., Kovach D.A. y Bradford K.J. (1994) Development of desiccation tolerance during embryogenesis in rice (*Oryza sativa*) and wild rice (*Zizania palustris*). Plant Physiol. 104:431-438.
  
- Williams R.J. y Leopold A.C. (1989) The glassy state in corn embryos. Plant Physiol. 89: 977-981.