

00562
OCT 1995
FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA PERED CELULAR Y
MICROESTRUCTURA RADICULAR DE EMBRIONES DE MAÍZ,
INDUCIDOS POR EL ENVEJECIMIENTO"

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)

Presenta
BIOL. ALICIA CASTILLO MARTÍNEZ

FALLA DE ORIGEN

México, D.F. Octubre de 1995.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química bajo la dirección de la Dra. Irma Bernal Lugo.

Para la obtención del grado de maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica) el trabajo se presentará ante el siguiente jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Antonio Peña Díaz
VOCAL:	Dra. Marina Gavilanes Rufz
SECRETARIO:	Dra. Gladys Cassab López
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Judith Marquez Guzmán
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Adriana Ortiz López

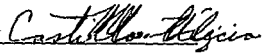
SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Facultad de Química UNAM.

ASESOR DEL TEMA:


Dra. Irma Bernal Lugo

SUSTENTANTE:


Biol. Alicia Castillo Martínez

DEDICATORIAS

Con todo cariño a mi hijo:

Sebastián

A la memoria de mi querido abuelo:

Miguel Martínez Villicaña

A mis papás, Josefina y Alvaro y mis hermanos, de manera muy especial a Idalia,
por su apoyo y compañía.

A Angel por su apoyo.

A mis amigos de tanto tiempo, Sobelda, Oscar, Patricia, Fernando y Elisa
por su amistad y los agradables momentos que compartimos.

A mis compañeros del laboratorio 104, Vanesa, Rebeca, Adriana, Enrique y Eddy
Por su cariño y ayuda.

A mis entusiastas Alumnos que tanto me han enseñado.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Irma Bernal Lugo por haberme guiado con gran atino durante toda mi estancia en el laboratorio y haberme apoyado siempre que lo necesite.

A la Dra. Marina Gavilanes por su valiosa colaboración tanto en el desarrollo del presente trabajo como en su revisión.

A la Dra. Judith Márquez por su apoyo en el uso del equipo de microscopía, la revisión de este trabajo y afectuoso trato que siempre tuvo para conmigo.

A la Dra. Clara Esquivel por su ayuda y paciencia en la elaboración de las muestras y toma de las fotografías.

Al Dr. Alejandro Zentella por la ayuda que me brindó en el procesamiento de las muestras en el cromatógrafo de gases.

Al Dr. Antonio Peña por su minuciosa y acertada corrección del manuscrito.

Al Dr. Aquiles Carballo por haberme proporcionado el material biológico.

A la M. en C. Sobeida Sánchez por sus atinadas observaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al M. en C. Santiago Capella por la facilitación del equipo de cromatografía.

Al M. en C. Fernando Díaz de León por su muy especial y constante disposición en la realización de este trabajo.

A la D. G. Isadora Temsel a quien agradezco muy especialmente la ayuda que me brindó en la ilustración de esta tesis.

Al Biol. Oscar R. García Rubio expreso mi más profundo agradecimiento por el tiempo y apoyo que me brindó en el desarrollo de mi tesis.

A CONACyT y DGAPA por el apoyo económico brindado.

RESUMEN

Cuando una semilla envejece, sufre cambios en varios aspectos que se reflejan en el vigor y la viabilidad. La mayoría de los trabajos que buscan la base fisiológica y bioquímica de la pérdida de la viabilidad y el vigor se han centrado en la biosíntesis de macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas, y en los componentes celulares (ribosomas, membrana plasmática, núcleo, mitocondria, etc.), pero no se ha realizado el estudio de los cambios de la pared celular y los efectos que éstos pudieran tener sobre la pérdida de la calidad de la semilla. El presente estudio tuvo como objetivo determinar si el envejecimiento inducía cambios en la pared celular y si se producía alguna modificación en la estructura del protoplasto. Para lograr esto se siguieron dos estrategias; una consistió en detectar por microscopía óptica la microestructura de la radícula y la otra en determinar la composición química de la pared celular.

La microscopía óptica mostró que las células envejecidas presentaron grandes espacios intracelulares, producidos por una plasmólisis severa del protoplasto, núcleo y nucleolo mucho más evidentes (en cuanto al tamaño y la densidad), así como la disminución de los espacios intercelulares y la ruptura de la capa de mucílago que recubre a la radícula.

Respecto a la solubilidad de las diferentes fracciones de la pared celular, el envejecimiento modificó ligeramente la facilidad de extracción de pectinas: 106 mg/mg de pared celular para el control y 93 para el envejecido, y de manera más importante la de las hemicelulosas: 672 mg/mg de la pared celular del lote control y 444 mg/mg para el lote envejecido; además, se encontró un efecto muy pronunciado en la composición de ambos tipos de polímeros. La abundancia de ácido galacturónico y de arabinosa fue mayor en las pectinas extraídas de la pared celular envejecida que en las del controles (galacturónico: 17.9 % control, 32.5 % envejecida; arabinosa: 8.3% control, 16.2 % envejecida) mientras que la de glucosa fue mayor en estas últimas (34 % en la control y 12.3 % en la envejecida).

Las hemicelulosas se extrajeron en dos fracciones sucesivas, GAX-1 y GAX-2+3. La primera fue extraída en mayor cantidad de la pared celular envejecidas, 169 mg/mg para el control y 265 mg/mg para la pared celular envejecida, mientras que la segunda fracción fue mayoritaria en la pared celular control (511 mg/mg en pared celular control, 323.6 mg/mg en pared celular envejecida). En el caso de la fracción GAX-1, el envejecimiento - al igual que en las pectinas - modificó su composición: los contenidos de ácido galacturónico y azúcares neutros aumentaron por efecto del envejecimiento; en el caso del ácido galacturónico de 210 a 420 mg/mg de pared celular y de los azúcares de 144 a 214 mg/mg de pared celular.

La composición de la fracción GAX-2+3 también se modificó por efecto del envejecimiento, pero con tendencias contrarias a las observadas en la fracción GAX-1, ya que tanto el contenido de ácido galacturónico como de azúcares neutros disminuyó, 35 y 37 % respectivamente (ácido galacturónico de 370 a 240 mg/mg de pared celular y azúcares neutros de 467 a 293 mg/mg de pared celular).

En relación con el contenido y tipo de monosacáridos en el total de hemicelulosas, el cambio más notorio fue el decremento de glucosa, la cual bajó de 228 mg/mg de pared celular a tan solo 27.3.

Los resultados anteriores muestran que el envejecimiento de los embriones del maíz, aislados de maíz en condiciones de temperatura y humedad relativa altas, induce cambios en la microestructura radicular del embrión dejando una célula poco turgente; diferencias a nivel de la composición de las pectinas y además indican que la composición de las hemicelulosas de la pared celular de los embriones envejecidos es similar a la de células en elongación. Sin embargo, dado que el envejecimiento se realiza en condiciones de disponibilidad de agua restringida (75 % de H. R.), de las fases de elongación que consisten en la captación de agua por el protoplasto y la relajación de la pared celular, solo esta última se podría realizar en forma parcial o total. Esto haría suponer que al inicio de la germinación la presión de turgencia de los embriones envejecidos fuera

menor que la de los controles, y dado que la velocidad de elongación está regulada por dicha presión, al disminuir ésta se esperaría una elongación deficiente. Lo anterior explica, al menos parcialmente, el hecho de que durante la germinación las semillas envejecidas presenten menor velocidad de elongación radicular.

ÍNDICE GENERAL

Introducción	1
Materiales y Métodos	22
Resultados y Discusión	31
Hallazgos Principales y Conclusiones	52
Referencias	53

INTRODUCCIÓN

La pared celular es el principal elemento estructural que le da forma a la planta y está compuesta por un complejo arreglo formado por varios carbohidratos de estructuras diversas, fenoles, proteínas, ligninas, cutina, suberina, etc. (Varner y Li, 1989; Showalter, 1993; Byron, 1994; Hayashi *et al.*, 1994).

La pared celular responde a estímulos tanto ambientales, dados por todo el entorno físico y químico de la planta, como internos, los cuales están relacionados con las necesidades fisiológicas de la planta. Esta estructura está involucrada en procesos tales como la elongación durante el crecimiento celular (Goto *et al.*, 1991; Rayle y Cleland, 1992; Neuman, 1993; Serpe y Mathews, 1994), las respuestas a factores ambientales, evitando la deshidratación y los ataques producidos por patógenos, (hongos, bacterias o insectos) (Cardemil y Riquelme, 1991; Ye y Varner, 1991); la maduración de los frutos (McCollum *et al.*, 1989; Harriman *et al.*, 1991; Kenneth, 1991; 1994 Martín-Cabrejas *et al.*, 1994; Melotto *et al.*, 1994), las respuesta al gravitropismo (Talbot y Pickard, 1994) y el envío de señales al interior de la célula (Campbell, 1991), entre otros. El análisis de la pared celular en cada uno de estos procesos muestra que su composición química y estructura varían, lo que indica que la pared celular de las plantas es un estructura dinámica. De lo anterior no extraña que la pared celular influya importantemente en la propiedades mecánicas y estructurales de las células; a continuación se describen la composición y estructura general de la pared celular.

Composición molecular de la pared celular.

La pared celular consta de dos fases, una formada por microfibrillas de celulosa, considerada como el esqueleto, y la segunda llamada matriz (McCann y Roberts, 1991), se localiza entre las fibrillas, proporcionando el empaquetamiento de la pared celular. Algunos componentes (por ejemplo: las sustancias pécticas o pectinas), son como un gel (Preston, 1979), de tal forma que las microfibrillas pueden desplazarse entre sí, como lo hacen durante la elongación axial, mientras

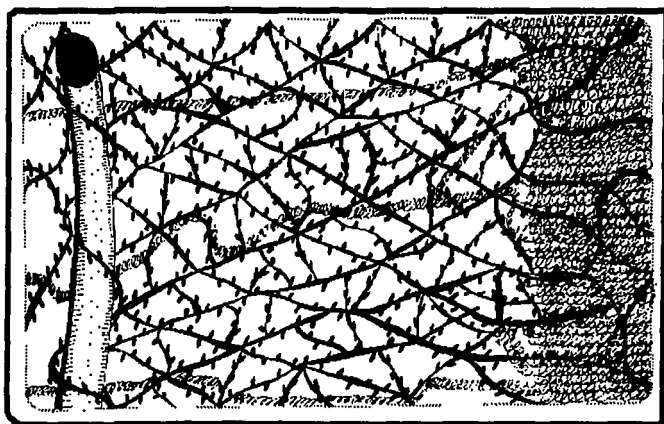
otros componentes rigidizan la matriz (por ejemplo: ligninas) y le dan más resistencia a la pared.

La fase microfibrilar está formada por estructuras extremadamente largas y delgadas llamadas microfibrillas, generalmente con un grueso regular de 10 nm en las plantas maduras y de 20 nm en algunas algas. Las microfibrillas están constituidas por moléculas de celulosa, alineadas en forma paralela al eje de la microfibrilla (Fig 1). Desde el punto de vista químico, la celulosa es un polímero no ramificado de β 1-4 glucano (Tabla 1), casi sin agua en su estructura, con un arreglo lineal y cristalino y/o paracristalino (Brett y Waldron, 1990; McCann y Roberts, 1991).

La matriz está integrada por polisacáridos no celulósicos, proteínas y fenoles. Estos componentes varían cuantitativa y cualitativamente durante el desarrollo de la célula vegetal. La Tabla 1 enlista algunas de las clases más importantes de polisacáridos no-celulósicos y sus propiedades estructurales. Los polisacáridos son nombrados de acuerdo al azúcar que forma la cadena principal, y su composición está designada por el último azúcar en el nombre. Por ejemplo el xiloglucano, es una cadena de glucano con unidades de xilosa unidas lateralmente; glucouronoarabinoxilano, es una cadena de xilano con unidades de glucouronil y arabinosilo como se observa en la Tabla 1.

Las diferentes sustancias pécticas y hemicelulosas difieren en los polisacáridos que las constituyen, su secuencia, unión glucosídica y ramificación (Tabla 1). La mayoría de las pectinas son ricas en ácidos urónicos (galacturónico y/o galacturónico), los cuales se unen a calcio y magnesio por los grupos carboxilo de cadenas adyacentes de poliglu(gal)urónico (Jarvis, 1988). Por ello suelen usarse los agentes quelantes como el oxalato de amonio y el EDTA para su extracción.

Las sustancias pécticas (pectinas) son solubles en agua y tienen una gran capacidad para formar geles (Brett y Hillman, 1985). Esta habilidad es determinante en la plasticidad de la pared celular, particularmente en la fase de la elongación celular.



celulosa

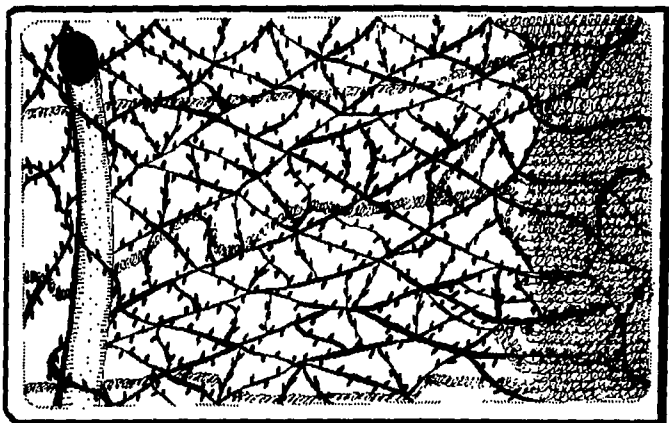


hemicelulosa



pectinas

Figura 1A. Representación de los principales polímeros de la pared celular de las dicotiledóneas.



celulosa



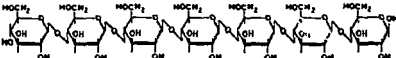
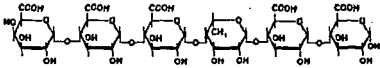
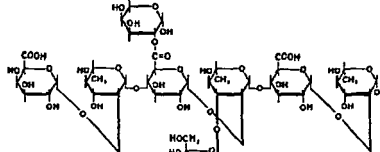
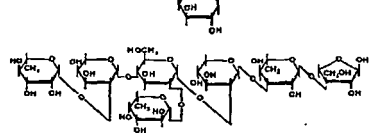
hemicelulosa



pectinas

Figura 1B. Representación de los principales polímeros de la pared celular de las monocotiledóneas.

Tabla 1. Estructura y propiedades químicas de los principales polímeros de la pared celular de plantas.

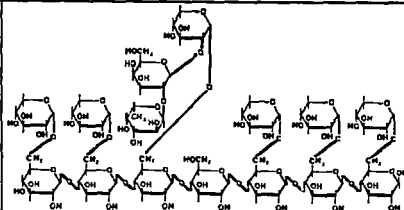
POLISACÁRIDO	SECUENCIAS TÍPICAS, RAMIFICACIONES Y TIPOS DE ENLACE	ESTRUCTURA QUÍMICA GENERAL
CELULOSA	Homopolímero no ramificado, constituido por glucosa. El enlace característico de su estructura es el β 1-4.	
<p data-bbox="135 367 238 388">PECTINAS:</p> <p data-bbox="135 409 302 429">Homogalacturonano</p> <p data-bbox="135 543 315 564">Ramnogalacturonano I</p> <p data-bbox="135 657 315 678">Ramnogalacturonano II</p>	<p data-bbox="350 409 730 518">Está compuesto por ácido galacturónico y escasos residuos de ramnosa: algunos de los residuos de ácido pueden estar esterificados con un grupo metilo. No está ramificado y sus principales enlaces son el α 1-4 y α 1-2.</p> <p data-bbox="350 543 730 626">La cadena principal es igual que la de los homogalacturonanos y cadenas laterales ricas en arabinosa y galactosa. Principales enlaces presentes en las ramificaciones β 1-4 y α 1-6.</p> <p data-bbox="350 657 730 808">Constituidos por dos heptasácaridos complejos y otros oligosacáridos menores unidos a las unidades de ácido galacturónico de la cadena principal. Además de la ramnosa presentan residuos de xilosa, apiosa y fucosa. Enlaces de la cadena principal α 1-2, α 1-4 y β 1-3, en las ramificaciones α 1-2.</p>	  

continuación tabla 1

HEMICELULOSAS:

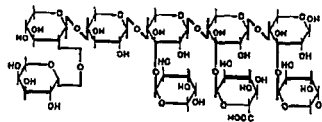
Xiloglucano

Su cadena principal es igual a la de la celulosa, y las ramificaciones suelen ser de xilosa aunque tambien pueden ser de xilosa-galactosa-fucosa entre otros. Las xilosas se unen a la cadena principal por enlaces α 1-6 y los otros residuos a la xilosa por enlaces α y β 1-2.



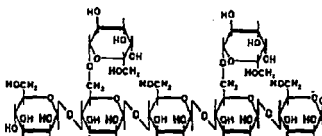
Glucuronoarabinoxilano

La cadena principal es de residuos de xilosa unidos por enlaces β 1-4, y las ramificaciones de arabinosa y ácido glucurónico, como monosacáridos o pequeños oligosacáridos. Algunos residuos de ácido glucurónico se encuentran metilados, algunas xilosas acetiladas, y las arabinosas pueden estar enlazadas a ferulatos. Los enlaces presentes en las ramificaciones son α 1-3 y α 1-2.



Galactomanano

Polímero formado por la unión lineal entre residuos de manosa utilizando enlaces β 1-4, substituido por unidades sencillas de galactosa por medio de enlaces β 1-6.



Las hemicelulosas son polímeros ricos en azúcares neutros, aunque también contienen ácido galacturónico, pero en mucho menor proporción que en las pectinas; se distinguen por ser insolubles en agua pero solubles en álcali. Como grupo, estos polímeros tienen conformación y funciones similares en la matriz; contribuyen a la plasticidad y porosidad de la pared celular. Esta última característica influye de manera muy importante en el intercambio de metabolitos y de agua entre células vecinas. Algunas clases de hemicelulosas forman una malla de puentes de hidrógeno en el exterior de las regiones no cristalinas de las microfibrillas de celulosa. Esta interacción es importante para el entrecruzamiento de las microfibrillas con la matriz.

Los monómeros de las fibras de los polisacáridos de la matriz no se empaquetan de manera regular debido a la presencia de las cadenas laterales de monosacáridos en la cadena principal, y los dobleces de la cadena lateral producidos por uniones glucosídicas de diferentes tipos. Sin embargo, en estas fibrillas se pueden distinguir cuando menos dos regiones, una laxa y muy hidratada, en la cual las cadenas individuales no forman una asociación cercana unas con otras y la otra conocida como zona de unión, en la que interactúan segmentos complementarios de dos moléculas vecinas. Estas últimas se encuentran localizadas en la sección no ramificada de la cadena principal (Fig 2). Tales interacciones están estabilizadas por puentes de hidrógeno intercatenarios; entre mayor sea el tamaño y el número de las zonas de unión, mayor será la rigidez del gel formado por las hemicelulosas.

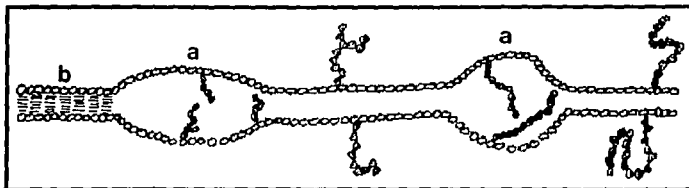


Figura 2. Representación de dos fibras de hemicelulosa, donde se esquematiza la región laxa (a) y la zona de unión (b).

Las proteínas que se localizan en la pared celular pueden ser de naturaleza estructural o catalítica (Cassab y Varner, 1988). Las proteínas estructurales son glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, de las cuales las más comunes son las extensinas (Tabla 2). Algunas especies contienen varios tipos, como en tomate, con cuatro, (Showalter, 1993). En algunas dicotiledóneas, las glucoproteínas pueden contribuir hasta en un 10 % del peso seco de la pared celular (Samson *et al.*, 1984; Condit *et al.*, 1990).

Tabla 2. Secuencias de los principales dominios en las proteínas estructurales de la pared celular.

Tipo de proteína	Secuencia repetida de aa ¹
Extensina de dicotiledóneas	S-HP ² -HP-HP-HP-S-HP-S-HP-HP-HP-HP-Y-Y-Y-K S-HP-HP-HP-K S-HP-HP-HP-HP-T-HP-V-Y-K S-HP-HP-HP-HP-V-Y-K-Y-K
Semejantes a extensinas en monocotiledóneas	T-P-K-T-HP-HP-T-Y-T-HP-S-HP-K-P-HP A-T-K-P-P
Ricas en glicina en dicotiledóneas	G-X
Ricas en glicina en monocotiledóneas	G-G-Y-G-G G-G
Ricas en prolina	P-P-H-E-K P-P-P-E-Y-Q

¹aa= aminoácido

²HP= hidroxiprolina

Las extensinas se encuentran en fuerte unión con la celulosa a través de enlaces no covalentes; se sintetizan como monómeros (Heckman *et al.*, 1988), y en la matriz se entrecruzan, probablemente por la formación de enlaces de isoditirosina (Fig. 3) para formar una malla rígida (Fry, 1986; Biggs y Fry, 1990).

Entre las enzimas presentes en la pared celular se encuentran las carboxicelulasas, poligalacturonasas, glucosidasas, trasglucosidasas, epimerasas, invertasa, peroxidadas (Goubet y Morgan, 1994; Nishitani y Taminaga, 1992; Getz *et al.*, 1991; Fry, 1992; O'Danoghve, 1994; Hohl *et al.*, 1991), y las novedosas expansinas, las cuales al parecer no hidrolizan enlaces covalentes, sino que su función es romper puentes de hidrógeno presentes entre los polímeros de la pared celular (Cleland *et al.*, 1987, Cosgrove, 1989; Li *et al.*, 1993, Cosgrove, 1995).

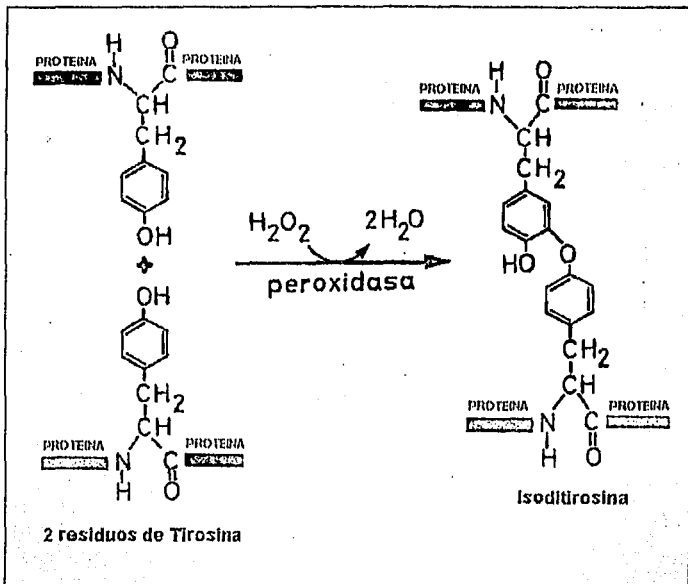


Figura 3. Formación del enlace de isoditrosina.

La composición y arreglo de cada uno de los componentes antes descritos varía dependiendo de la zona de la pared celular que se estudia, la especie y el estado de desarrollo en el que se encuentra la planta. Estas variaciones incluyen diferencias en la proporción de los componentes y en la estructura de cada polímero. Tal diversidad en composición y en estructura no ha permitido conseguir una visión completa de la pared celular, ni se ha podido establecer la función precisa de cada uno de los polímeros; sin embargo, el estudio de la química y estructura de la pared celular de mutantes (Reiter *et al.*, 1993), en conjunto con el uso de anticuerpos para cada uno de los polímeros (Knox *et al.*, 1990), permitirá en un futuro próximo conocer con precisión la estructura y función de cada uno de los componentes.

A pesar de lo anterior y con base en las evidencias experimentales de diversos sistemas modelo se han propuesto dos tipos de pared celular primaria: el tipo I que describe la pared celular de la mayoría de las dicotiledóneas y monocotiledóneas y el tipo II, que es la pared celular encontrada en zacates (Poáceas) y especies relacionadas.

Estructura de la pared celular primaria de las dicotiledóneas.

El primer dominio presente en la pared celular de las dicotiledóneas está constituido por microfibrillas de celulosa, las cuales se arreglan en forma paralela (Brett y Waldron, 1990). Se encuentran unidas entre sí por fibrillas de xiloglucanos (XG, Tabla 1), los cuales se unen fuertemente a la parte externa de las microfibrillas (Fry, 1988).

El complejo celulosa-XG está a su vez embebido en una matriz de polisacáridos pécticos (Tabla 1). Las peclinas en la pared celular interactúan entre sí de diversas maneras. Las cadenas helicoidales de poligalacturónico puede condensarse por interacción con calcio para formar zonas de unión entre varias cadenas y formar un gel (Brett y Hillman, 1985), o bien, las peclinas pueden entrecruzarse, por una

unión éster, con ácidos hidroxicinánicos, tales como el diferúlico, para formar una unión covalente entre polímeros (Fry, 1986; Biggs y Fry, 1990).

Además de los polímeros de los carbohidratos, en la pared celular de dicotiledóneas también encontramos proteínas, las cuales reciben el nombre genérico de extensinas, (Lampert, 1986) y que se encuentran glicosiladas, presentando una buena cantidad de hidroxiprolina en su estructura, con una secuencia repetida de (Hpro)⁴-Tyr-Lys-Tyr, la cual a su vez se puede entrecruzar con otra proteína por medio de la histidina formando enlaces de di-isotirosina (Fig. 3). Según algunos autores, como Stafstrom y Staehelin (1986), las extensinas pueden estar asociadas a residuos de azúcares como la arabinosa, ya sea como monosacárido o tri y tetrasacáridos, que se relacionan con la estructuración de la proteína, ya que cuando se remueven los azúcares de estas proteínas en solución, éstas pierden su estructura característica de bastón. Aunque esta proteína ha sido la más estudiada en la pared celular de las dicotiledóneas, se ha detectado la expresión de otro gene relacionado con una proteína de pared celular, formada principalmente por glicina (dos terceras partes de su estructura) y un motivo repetido de Gly-Gly-X donde X suele ser una glicina (Condit *et al.*, 1990). Se ha predicho que se arregla como una lámina y que se acomoda como una placa entre la pared celular y la membrana plasmática, con la particularidad de que la cara que da hacia la pared celular es rica en aminoácidos aromáticos, presumiblemente para actuar como puntos en donde se inicie la lignificación (Condit y Meagher, 1986). Estos dos grupos corresponden a las proteínas más abundantes dentro de la pared celular, lo cual no indica que sean las únicas, ya que otros autores como Mortenson y Dreyfuss (1989) remarcan el hecho de que las proteínas de la pared celular constituyen un grupo diverso y funcionan como elementos estructurales dentro y fuera de la célula.

Pared celular primaria de las Poáceas (una familia de las monocotiledóneas)

La familia de las *Poáceas* (la cual incluye al maíz, el trigo y a la avena entre otras especies), representa el 16 % del total de todas las monocotiledóneas (Cronquist, 1988). Esta ha sido la familia más estudiada, debido a su importancia económica. El resto de las monocotiledóneas, ha sido muy poco estudiado, con excepción de un reporte donde se determinó la estructura de la pared celular de la *Ananas comosus* (Smith y Harris, 1995), la cual corresponde a la familia de la Bromeláceas.

En el caso de las Poáceas, la pared celular se encuentra constituida principalmente por los mismos dominios que en las de dicotiledóneas, pero en lugar de xiloglucanos, los principales polímeros que interactúan con las microfibrillas de celulosa son los glucouronoarabinosilanos (Carpita y Gibeau, 1993; Tabla 1).

El primer dominio presente en la pared celular de las monocotiledóneas está constituido por las microfibrillas de celulosa, las cuales se arreglan en forma similar a las presentes en la pared celular de las dicotiledóneas, siendo ésta la única característica en común entre los dos tipos de paredes, ya que el dominio correspondiente a las hemicelulosas o los polímeros encargados de adherir las microfibrillas de celulosa está formado principalmente por glucouronoarabinosilanos, que son cadenas lineales de (1-4) β -D-xilosa con unidades sencillas de arabinosa unidas en la posición O-3; menos frecuentes son los residuos sencillos de ácido galacturónico unidos en la posición O-2 de la xilosa. En este tipo de pared celular también se localizan pequeñas cantidades de glucouronoarabinosilanos pero con unidades de α -L-arabinosilo unidas principalmente en la posición O-2 de la xilosa (Darvill *et al.*, 1980). El número de grupos laterales, tanto de arabinosa como de ácido galacturónico a lo largo de la cadena de xilosa varían grandemente, desde cadenas totalmente ramificadas, hasta aquellas que sólo tienen ramificado el 10 % de su estructura. El grado de ramificación afecta grandemente su habilidad para asociarse. Las cadenas lineales pueden formar puentes de hidrógeno entre ellas, lo cual les confiere

mayor cohesión, ya que las ramificaciones constituyen un impedimento estérico para la formación de los puentes de hidrógeno. Los grupos laterales no sólo evitan la formación de los puentes de hidrógeno, sino también determinan el grado de solubilidad de los polímeros .

En el caso particular del maíz, una gramínea que pertenece a las Poáceas, las hemicelulosas de su pared celular primaria, que representan el 43 % de la estructura de ésta en el caso de los coleóptilos, contiene principalmente (1-4) β -D xilanos, sustituidos principalmente por residuos de α -L-arabinofuranosa , α -glucosa y 4-O metil α -D-glucosa (Fisher y Stone, 1981; Darvill *et al.*, 1980). Otros constituyentes incluyen mezclas de glucanos no ramificados que contienen enlaces (1-3) y (1-4) β -D glucosídico, ácidos urónicos y xiloglucanos en menor proporción (Labavitch y Ray, 1978).

Las paredes celulares de estas monocotiledóneas son extremadamente pobres en pectinas y su estructura está compuesta principalmente por dos polímeros, uno de ácido poligalacturónico y otro de ramnogalacturonano; aquí cabe destacar que también los polímeros de glucoarabinoxilanos altamente sustituidos se encuentran muy relacionados con las pectinas. Los glucoarabinoxilanos de la pared celular se encuentran entrecruzados por hidroxycinamatos tanto no esterificados, como esterificados, lo que representa las zonas lignificadas presentes en la pectinas. Los compuestos aromáticos más comunes en la pared celular de monocotiledóneas son el ferulato y p-cúmarato, los cuales suelen unirse a la posición O-5 de los residuos de arabinosa de los glucoarabinoxilanos (Kato y Nervis, 1985) . La formación de moléculas de diferulato entre ferulatos vecinos puede entrecruzar una porción de la matriz de glucoarabinoxilanos (Markwalder y Neucom, 1976).

Uno de los modelos propuestos para explicar la estructura de la pared celular de las Poáceas propone una región de microfibrillas de celulosa unidas y entrelazadas por polímeros no ramificados de galactoarabinoxilanos, más una zona de galactoarabinoxilanos con diversos grados de sustitución que posiblemente hagan la función de las pectinas en la pared celular de las

dicotiledóneas y una última zona de polímeros de arabinosa y ácido galacturónico, las cuales determinan la porosidad y la carga de la pared celular (Carpita y Gibeau, 1993).

Este segundo tipo de pared celular también presenta proteínas estructurales, pero a diferencia de las extensinas, son ricas en treonina e hidroxiprolina, con dos motivos, uno de Thr-Pro-Lys-Pro-Thr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Thr-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Pro-Hyp (Kieliszewski *et al.*, 1990) y otro de Ala-Thr/Ser-Lys-Pro-Pro y solo uno de Ser-Hyp4, o ricas en histidina e hidroxiprolina con altas cantidades de alanina; comparten la característica de ser proteínas glucosiladas, pero se piensa que su arreglo corresponde a un asa sin una estructura secundaria determinada y no a una hélice tipo II de prolina, como la mayoría de las extensinas presentes en dicotiledóneas (Showalter, 1993). Estos son los tipos más comunes de proteínas pero existen otras variantes de estas estructuras generales y las variaciones suelen depender de la especie.

Pared Celular y elongación

La elongación de las células vegetales se realiza por la extensión de la pared celular preexistente en cada una de las células y el ensamble de nuevos polímeros a las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeau, 1988).

La extensión o alargamiento irreversible de la pared celular es el producto de: la absorción de agua por parte del protoplasto y la relajación de la pared celular (Cosgrove, 1986).

La toma de agua por parte de la célula se inicia cuando los elementos que mantienen semirrígida la estructura de la pared celular se rompen, lo que provoca que la presión ejercida por la pared celular disminuya y, ya que la presión de la pared celular y la presión de turgencia (o presión hidrostática) son fuerzas opuestas y equivalentes, la presión de turgencia también decrece; esta disminución en la presión de turgencia induce un cambio en el potencial de agua de la célula, el cual en promedio baja de 0.15 MPa a 0.04 MPa, lo que da lugar al

de la célula, el cual en promedio baja de 0.15 MPa a 0.04 MPa, lo que da lugar al flujo pasivo de agua y a su vez, incrementa el volumen de la célula distendiendo a la pared celular (Cosgrove, 1986).

La turgencia ejerce su fuerza contra la pared celular, lo que provoca cierto estrés sobre ella; se ha establecido que el crecimiento sólo se puede llevar a cabo si la célula está turgente, por lo que la presión de turgencia es un prerrequisito para que se lleve a cabo la elongación (Kutschera, 1991). Cosgrove también ha propuesto que la base bioquímica del relajamiento de la pared celular sea la sensibilidad a la turgencia, por lo que cambios pequeños en ésta turgencia pueden tener como consecuencia grandes cambios en la tasa de crecimiento.

Para poder estudiar en forma cuantitativa la elongación celular en los vegetales, se ha desarrollado la siguiente ecuación: $dv/dt = \phi (P - Y)$, donde v es el volumen celular, ϕ la extensibilidad de la pared celular (Cell wall yielding coefficient), P la presión de turgencia o presión hidrostática y Y la presión de turgencia crítica para el crecimiento (Cell wall yield threshold; Cosgrove, 1986).

Existen estudios en los que se ha comprobado que cuando el crecimiento se abate, el parámetro que se modifica es ϕ ; es decir, la extensibilidad de la pared celular, manteniéndose Y constante. A partir de estos datos podemos pensar que la extensibilidad es el parámetro limitante para que la elongación se dé en forma adecuada o no.

La extensibilidad de la pared celular se puede modificar por varios factores, entre ellos la acción de varios fitorreguladores, como el ácido giberélico (Fry, 1980), el etileno (Campbell y Labavitch, 1991) y las auxinas (Rayle, 1973), lo cual se comprueba después de exponer el tejido a estos compuestos, observando un crecimiento acelerado de la plántula.

Las auxinas han sido los fitorreguladores más estudiados en relación con el crecimiento de las plantas. Se piensa que las auxinas promueven la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de la pared celular, y ello provoca la relajación de la misma. Son varios los mecanismos propuestos para explicar los efectos inducidos por las auxinas, y entre ellos se propone la existencia de un

"factor de relajamiento", ya que el efecto primario de la auxina parece ser la membrana plasmática o algún otro lugar intracelular, mas no la pared celular como tal.

Se ha observado que cuando células susceptibles se exponen al efecto de la auxina, éstas excretan protones hacia la pared celular de una manera acelerada, lo que resulta en la disminución del pH apoplástico. Esta baja en el pH, estimula el proceso de relajación de la pared celular; el mecanismo no se conoce, pero se ha demostrado que la aplicación de soluciones ácidas desde el exterior sólo promueve el crecimiento por períodos cortos (1-4 horas), por lo que se piensa que las auxinas deben mediar eventos adicionales a la acidificación de la pared celular, ya que pueden promover la elongación por períodos prolongados.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar cómo este fitorregulador provoca la acidificación del medio, plantea que la auxina activa a la ATPasa de protones de membrana plasmática, ya sea incrementando la cantidad de enzima (vía la activación de sus genes), o bajando el pH del citoplasma, que normalmente se encuentra entre 7.2 y 7.4, llevándolo a 6.5, pH óptimo de la ATPasa, o fosforilando a la ATPasa, pero sobre esto último no existe evidencia experimental (Rayle y Cleland, 1992).

La acidificación a su vez, tiene varios efectos, para los cuales también se han propuesto distintas explicaciones; una de ellas propone que uno o más tipos de enlaces encargados de mantener la estructura de la pared celular se debilitan por la acción del ácido, ya sea en forma directa o indirecta, como lo indican los resultados de Hohl y colaboradores (1991), quienes comprobaron la liberación no enzimática de β -glucano a pH 2.5. En el caso de que los enlaces sean covalentes, el mecanismo más aceptado es aquel que propone que el cambio en el pH de la pared celular activa enzimas hidrolíticas como las glicosidasas, endo y exoglucanasas, transglicosidasas, etc. pero aún no se han comprobado los pHs óptimos de estas enzimas, ya que extraerlas y ensayarlas en solución o en la pared celular es difícil (Brett y Waldron, 1990). Esta última propuesta, además de no estar comprobada tiene evidencia en contra, pues se ha observado que

después de un tratamiento con auxinas, la tasa de autólisis por parte de la pared celular aumenta, alcanzando su máximo a las dos horas de iniciado el tratamiento, y declina casi totalmente después de ocho horas. Este efecto no pudo ser observado con un pretratamiento ácido, lo que hace suponer que el cambio de pH no tiene efecto o al menos no es el único modulador de la actividad de las hidrolasas de la pared celular, y que éstas se activan por efecto de la auxina. Una prueba de esto, es la baja en el contenido de β -glucano (Inovhe y Nevis, 1991).

La actividad de hidrólisis sobre ciertos polímeros determinados de la pared celular durante el crecimiento se ha comprobado tanto en las dicotiledóneas como en las gramíneas. En el caso de las dicotiledóneas, el polímero que se hidroliza en forma preferente es el xiloglucano (Cleland, 1981; Taiz, 1984), reestableciéndose la cantidad en la parte final del período de elongación, y en el caso de las gramíneas, se degrada al glucouronarabinoxilano, principalmente el de la fracción GAX I y los β -D-glucanos, cuyos contenidos también se restablecen al final de la elongación.

Hasta aquí podemos decir que la auxina promueve la acidificación de la pared celular, lo cual da como resultado una primera fase de elongación; si el fenómeno solo dependiera de esta baja en el pH, sólo duraría una hora, pero al parecer la elongación se puede continuar gracias a la activación de enzimas hidrolíticas que continúan la relajación de la pared celular.

Cosgrove (Cosgrove *et al.*, 1993; 1994) han extraído dos proteínas, que han mostrado la capacidad de inducir la elongación de preparaciones de pared celular de avena y pepino; estas proteínas tienen un pH óptimo entre 4.5 y 5.0 y un peso molecular de aproximadamente 29 Kda.

Se comprobó que el mecanismo por el cual estas proteínas logran la elongación de la pared celular no es la ruptura de enlaces glucosídicos, por lo que no son endoglucanasas, como lo haría la celulasa, sino que al parecer lo que hacen es romper los puentes de hidrógeno que estabilizan los diferentes polímeros de la pared celular. Al parecer su acción no cambia la estructura covalente de la pared celular, pues su efecto es reversible (McQueen-Mason y

Cosgrove, 1995). Tomando en cuenta los datos anteriores, se ha propuesto que la actividad de las expansinas, inducida por la acidificación, es el principal elemento que determina la relajación de la pared celular, por lo menos durante los primeros 5 minutos de la elongación (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

De corroborarse la acción de estas enzimas, se podría proponer que la auxina tiene efectos diversos, y que el primero de éstos es la acidificación de la pared celular. Ello activaría a las expansinas, las que a su vez romperían los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura de la pared celular y permitirían el deslizamiento de las fibras; un segundo efecto sería la activación de las hidrolasas para mantener la elongación.

La estructura de la pared celular antes del crecimiento y posterior a éste muestra la misma estructura y composición, por lo que si en la fase intermedia de este proceso se llevó a cabo la hidrólisis de ciertos polímeros, ello implica que durante el crecimiento, y sobre todo en la fase final de éste, se lleva a cabo la biosíntesis de nuevo material de la pared celular.

La biosíntesis de los diferentes polímeros de la pared celular se lleva a cabo en dos lugares diferentes: la celulosa y la calosa se sintetizan en la membrana plasmática y los glucanos y las pectinas en el aparato de Golgi (Gibeaut y Carpita, 1991).

El sustrato para la síntesis de la celulosa es la UDP-glucosa y aunque la composición y organización de la celulosa sintetizada no se conoce, se tienen datos que muestran que al parecer se trata de un complejo multimérico intramembranal, constituido por tres polímeros de 90, 67 y 40 Kda, el cual es activado por magnesio.

En relación con la calosa, ésta se sintetiza cuando la célula sufre algún daño; su precursor también es la UDP-glucosa; se piensa que su síntesis la lleva a cabo la misma celulosa sintetasa, pero cuando ésta se encuentra defectuosa o dañada. En el caso de la calosa no se requiere seguir una orientación tan rigurosa como para la síntesis de celulosa, y además de ser activada por magnesio también lo es por calcio. La calosa es un polímero de β 1-3 glucosa.

La síntesis de glucanos y pectinas se realiza en el aparato de Golgi a partir de UDP-glucosa, UDP-galacturónico, UDP-galactosa, UDP-galacturónico, UDP-xilosa, UDP-arabinosa, GDP-glucosa y GDP-manosa; estos dos últimos sustratos son exclusivos para la síntesis de glucomananos. Algunas de las enzimas involucradas en la síntesis son: la UDP-glucosa deshidrogenasa, la C4 epimerasa, la UDP-glucosa descarboxilasa, la UDP-xilosa C4 epimerasa; probablemente todas estas enzimas, a excepción de la UDP-glucosa deshidrogenasa, se encuentran unidas a la membrana del aparato de Golgi.

Otros sustratos menos abundantes son la GDP-ranosa para los ranoglucomananos y la GDP-fucosa utilizada para la fucosilación de glicoproteínas, pectinas y xiloglucanos (Gibeaut y Carpita, 1994).

Los polímeros recién sintetizados y secretados deben permanecer solubles hasta encontrar su lugar de ensamble; para lograrlo se llevan a cabo modificaciones químicas; por ejemplo, la esterificación de las unidades de ácido urónico con grupos metilo durante su síntesis (Kauss y Hassid, 1967), lo cual tiene como propósito prevenir asociaciones prematuras con el calcio, ya que la esterificación elimina la carga eléctrica y por lo tanto los sitios de unión para el calcio. Durante la incorporación de los polímeros de ácido urónico en la pared celular en crecimiento, se lleva a cabo la ruptura de los ésteres de metilo por la pectínmetilesterasa, y esto no sólo permite el entrecruzamiento de los carboxilos vecinos utilizando calcio, para formar el gel (Powell, 1982), sino que también genera una matriz negativamente cargada que puede inducir una disminución localizada del pH, fenómeno que como ya se dijo, se encuentra involucrado en el proceso de crecimiento (Rayle y Cleland, 1992).

Deben existir mecanismos para completar la polimerización de las fibras fuera del aparato de Golgi, ya que en la pared celular se encuentran xiloglucanos de más de 700 nm de longitud, mientras que en las vesículas secretoras como máximo alcanzan los 100 nm de largo (Gibeaut y Carpita, 1994).

Con la biosíntesis de la nueva pared celular es posible concluir el proceso de elongación en la célula vegetal.

Pared celular y deterioro .

Está bien establecido que durante el almacenamiento de las semillas, sobre todo en condiciones de temperatura y humedad relativa altas, éstas pierden calidad, lo que se refleja en una baja en la velocidad de germinación y en la viabilidad de las mismas (Roberts y Black, 1989; Vertucci y Roos, 1993). Se han observado varios cambios negativos en la estructura y metabolismo de la semilla como consecuencia del envejecimiento; entre los más representativos tenemos: pérdida de la integridad membranal (Heter y Burris, 1989), decremento en el contenido de fosfolípidos y ascorbato, y una posible peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática (Basavarajappa *et al.*, 1991; Ponquett *et al.*, 1992), daños a nivel de la cromatina, incluyendo las proteínas asociadas a ésta (Ganguli y Sen-Mandi, 1990); un incremento en la cantidad de monosacáridos solubles (Díaz de León, 1993), disminución de la actividad enzimática (Bernal-Lugo *et al.*, 1994), cambios en la solubilización de las proteínas e insolubilización de fenoles (González, 1994).

OBJETIVO

Con respecto a la pared celular, los estudios relacionados con el envejecimiento son aquellos que consideran el endurecimiento de las semillas, ya sea por testa impermeable o por dificultades de termosuavización de la semilla; ésto se ha relacionado con cambios en la solubilidad de los polímeros de la pared celular, principalmente la pectina (Robertson y Swinburne, 1981) pero no se ha encontrado una relación directa entre la composición de la pared celular y la disminución en la velocidad de germinación por el envejecimiento de la semilla.

La pared celular ejerce cierta presión sobre el protoplasto, y éste a su vez contrarresta con una presión de turgencia, y esta interacción es indispensable para poder llevar a cabo el crecimiento, por lo que, si durante el envejecimiento la estructura de la pared celular se modifica de tal manera que la presión que ejerce sobre el protoplasto cambia, ya sea que suba o que baje, tendría como consecuencia cambios en la presión de turgencia y modificaría de manera importante la tasa de crecimiento de la célula. Esto hasta la fecha no ha sido comprobado, y el objetivo particular de este trabajo fue establecer si durante el envejecimiento de la semilla las características estructurales y químicas de la pared celular cambiaban, y si estos cambios se podían relacionar con la baja en la velocidad de germinación del embrión.

Para poder estudiar ésto, se realizó el análisis de la composición de la pared celular de embriones de maíz controles y envejecidos, así como una evaluación de la estructura de las células radiculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Para la realización de este trabajo se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) cv. A6, cosecha 1990, donadas por el Dr. A. Carballo del Centro de Genética del Colegio de posgraduados .

Desde su cosecha el lote se dividió en dos partes; para evitar su deterioro, una de ellas se almacenó a 4°C en frascos de cristal cerrados herméticamente y constituyó el grupo control. La otra parte se almacenó en condiciones de envejecimiento acelerado: 30°C y una humedad relativa de 75 %. Noventa días después de iniciado el envejecimiento; las semillas se secaron sobre gel de sílice y se guardaron a 4°C en frascos de vidrio cerrados herméticamente. Estas constituyeron el grupo de semillas deterioradas.

Determinación de la velocidad de germinación y vigor.

Para evitar el daño por imbibición, las semillas (3 réplicas de 20 semillas cada una) se colocaron en cajas de Petri (10 cm de diámetro) conteniendo vermiculita y dos filtros de papel Whatman N° 1, humedecido con 29 ml de agua. Previo a esta imbibición, las semillas de ambos lotes fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito al 3.5 % durante 1 minuto y enjuagadas con agua desionizada estéril. Las semillas embebidas por 24 horas, en la forma antes descrita, se transfirieron a hojas de papel de estraza húmedo y se enrollaron. Los rollos fueron incubados en la obscuridad a 25°C en una cámara de germinación a 100 % de humedad relativa. Cada 24 horas se determinó el porcentaje de germinación acumulada.

A los seis días de iniciada la germinación, se cosecharon las plántulas. Las diferentes partes de la plántula (radícula y coleoptilo) se secaron por separado en un horno a 80°C durante 3 días, tiempo suficiente para alcanzar peso constante. Los datos se expresan como el promedio de dos determinaciones independientes, por duplicado cada una.

Las especificaciones para la preparación de los reactivos y métodos, que a partir de aquí serán utilizados, se anexan como protocolos al final de este capítulo.

Microscopía óptica

La fijación de los embriones de maíz se llevó a cabo por el método de Sabatini (1964) y previa a su inclusión en EPON se deshidrataron utilizando un gradiente de soluciones alcohólicas del 50 al 100 %. Posteriormente, los bloques formados se cortaron en un ultramicrotomo Sorvall MT2-B (Dupont); los cortes de aproximadamente 3 micras de grosor se colocaron en portaobjetos y se tificaron con azul de toluidina. La observación de las preparaciones se realizó en un microscopio fotónico, tanto en campo claro como en contraste de fases.

Aislamiento y purificación de la pared celular.

El aislamiento y purificación de la pared celular se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Shibuya y cols. (1985). Las paredes celulares se secaron por liofilización. El rendimiento de la pared celular fue de 70 mg / g de embrión tanto para el lote de semillas frescas, como el de semillas envejecidas .

Fraccionamiento de la pared celular.

Las paredes celulares fueron extraídas con una solución de CDTA-Carbonatos en atmósfera de nitrógeno, o con oxalato de amonio al 1 % pH 5.5 a 100°C. La fracción extraída con oxalato de amonio constituyó la fracción de pectinas y la extraída con CDTA-carbonatos una mezcla de pectinas y GAX1. Por diferencia entre estas dos fracciones se estimó la cantidad de GAX1. El residuo de la extracción con oxalato de amonio fue luego extraído con KOH 4 N a 25°C. El extracto constituyó la fracción de hemicelulosas.

En cada fracción se determinó el contenido de ácido urónico (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973), de azúcares totales (Dubois y cols, 1956) y proteínas (Lowry, 1973). Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes por duplicado cada una

La identificación y cuantificación de los azúcares neutros de cada una de las fracciones fue analizada de acuerdo a Díaz de León (1993); por cromatografía de gases, después de su hidrólisis en H_2SO_4 al 72 % (Fry, 1988). En este caso los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

PROTOCOLOS

Fijación e inclusión de las muestras para la microscopía óptica

La fijación de los embriones de maíz se llevó a cabo en una mezcla de glutaraldehído-paraformaldehído (3:6) en buffer de colidina 0.1 M pH 7.2 con sacarosa al 0.8 %. Después de la fijación, las muestras se enjuagaron en una solución amortiguadora de colidina (0.1 M, pH 7.2) con sacarosa al 0.8 % e inmediatamente se procedió a la deshidratación gradual de la muestra sumergiéndola por 15 min en solución alcohólica al: 50 %, 70 %, 80 %, 96 % y 100 %. Una vez deshidratada la muestra se incubó por 20 minutos en óxido de propileno. Este tratamiento se repitió tres veces con solución nueva en cada ocasión. Posteriormente la muestra se incubó por 18 a 20 horas en EPON al 50 %, pasado este tiempo la solución conteniendo las muestras se deja evaporar hasta 0.75 del volumen inicial, en este momento la muestra se transfiere a EPON al 100 % y se calienta a 60 ° C por 18 horas, con este tratamiento el EPON se polimeriza y se concluye la inclusión.

Aislamiento y purificación de la pared celular

Cinco gramos de harina de embrión, previamente deslipidizada¹, se hirvieron con 100 ml de metanol al 80 %. La pastilla obtenida por centrifugación a 12, 000 rpm por 10 min se extrajo por 12 horas con 100 ml de dodecil sulfato de sodio al 1 % conteniendo β mercaptoetanol al 1 %. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y la pastilla se lavó con abundante agua, recuperándose ésta por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min; en algunas ocasiones la preparación de las paredes celulares se sonicó por 5 minutos en 100 ml de dimetilsulfóxido al 90 % y se mantuvo en agitación por 12 horas. El tratamiento con dimetilsulfóxido se repitió dos veces. El dimetilsulfóxido se removió por centrifugación y la pastilla se lavó con agua hasta la eliminación del exceso del dimetilsulfóxido, generalmente se requerían de 6 a 8 lavados. Las paredes celulares se secaron por liofilización.

¹La deslipidización se llevó a cabo en un equipo soxhlet, se utilizó éter etílico para el acarreo de los lípidos. La muestra estuvo por tres días a reflujo a 30° C.

Solución de Metanol:

Se preparó una solución de metanol al 80 % (v/v) con agua bidestilada, colocando 80 ml de metanol y aforando a 100 ml.

Solución de dodecil sulfato de sodio:

Para preparar 100 ml de esta solución se tomó 1 g de dodecil sulfato de sodio y 1 ml de β mercaptoetanol y se aforó a 100 ml con agua bidestilada.

Solución de dimetilsulfóxido:

Se preparó una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 90 % (v/v) con agua bidestilada diluyendo 90 ml de DMSO hasta tener 100 ml.

Fraccionamiento de la pared celular

Se tomaron 20 mg de pared celular y se extrajeron dos veces; una vez por 4 horas y la segunda por 1 hora, con una solución de CDTA-Carbonatos en atmósfera de nitrógeno o con oxalato de amonio al 1 % a 100°C, la relación peso volumen fue de 5 mg/ml. En cada caso los extractos se combinaron y centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 10 min El residuo fue luego reextraído dos veces (18 y 4 horas), con KOH 4 N en atmósfera de nitrógeno a 25°C, manteniendo la misma relación peso volumen. Los extractos con potasa se combinaron después de haberlos centrifugado a 10,000 rpm por 10 min

Reactivos para la extracción de las diferentes fracciones de la pared celular.

Solución de CDTA - Carbonato de potasio :

A una solución de carbonato de potasio 4 N se le agregó CDTA hasta alcanzar una concentración de 0,3 M.

Solución amortiguadora de acetatos :

Para preparar 100 ml de esta solución amortiguadora de acetatos a una concentración de 50 mM, se tomaron 0.285 ml de ácido acético, 0.680 g de acetato de sodio y se aforó a 100 ml con agua bidestilada .

Solución de Oxalato de amonio :

Se preparó una solución de oxalato de amonio al 1.0 % pesando 1 g. de oxalato y disolviéndolos en 100 ml de agua bidestilada, ajustando el pH a 5.5 con HCl de ser necesario.

Solución de Hidróxido de potasio :

Preparar una solución de KOH 4 N en agua bidestilada, tomar 22.4 g de KOH y aforar a 100 ml.

Cuantificación de ácido galacturónico

A una alícuota (100 a 300 μ l) de cada una de las fracciones de la pared celular se le adicionó agua, para completar 0.4 ml. Posteriormente se le agregaron 2 ml de una solución de H₂SO₄-tetraborato de sodio (ver adelante); esta mezcla agua ácido se enfrió en hielo y posteriormente se colocó en un baño a 90°C por exactamente cinco minutos después de los cuales se enfriaron nuevamente. Para el desarrollo del color se le adicionó 0.1 ml de orto-hidroxidifenil. Se agitaron e incubaron por 20 minutos y se midió la absorbencia a 520 nm. Para cada muestra se preparó un blanco, el cual contenía la muestra y en lugar de agregarle 0.1 ml de la solución de orto-hidroxidifenilo se le adicionó 0.1 ml de hidróxido de sodio al 0.5 %, y se siguió el mismo tratamiento que para los tubos problema.

La curva patrón se preparó utilizando ácido galacturónico como referencia, en un rango de 10 a 70 μ g/ml. Dentro de estos límites la absorbencia fue lineal.

Reactivos para la cuantificación de ácido galacturónico.

Solución de orto-hidroxidifenilo :

Se mezclaron 0.15 g de orto-hidroxidifenil en 100 ml de una solución de hidróxido de sodio al 0.5 %.

Solución de ácido sulfúrico - tetraborato :

Se preparó una solución 0.0125 M de tetraborato de sodio (0.1416 g y aforar a 100 ml) en ácido sulfúrico concentrado, la cual se agita a 40°C por 2 horas o hasta que todo el tetraborato de sodio se haya disuelto.

Cuantificación de azúcares .

A una alícuota (10 - 100 μ l) de cada una de las fracciones de la pared se le agregó la cantidad de agua bidestilada necesaria para completar 1.0 ml, y luego se le adicionaron 0.6 ml de fenol al 80 % y 3.6 ml de H₂SO₄ concentrado, se agitó y se dejó enfriar.

La absorbencia de las muestras ya frías se determinó a 485 nm, contra un blanco de reactivos.

La curva patrón se hizo con glucosa como referencia y entre 5 y 50 μ g / ml. Dentro de este rango la absorbencia fue lineal.

Reactivos para la cuantificación de azúcares:

Solución de fenol:

Se preparó una solución de fenol al 80 % con agua bidestilada. Pesando 80 g de fenol y disolviendolos en 100 ml de agua bidestilada.

Ácido sulfúrico:

Con precaución se tomaron directamente y sin diluir la cantidad de ácido señalada en el protocolo asegurándose que su concentración fuera aproximadamente 12 N.

Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se colocaban 300 μ l de muestra (en un tubo de ensaye de 12 x 130 mm) a los cuales se les agregaron 100 μ l de desoxicolato de sodio al 0.15 % y 600 μ l de agua bidestilada. Esta mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó 0.1 ml de TCA al 50 %, se agitó y se mantuvo en baño de hielo por cinco minuto. La muestra se centrifugó a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1.0 ml de agua bidestilada y se le agregó 1.0 ml del reactivo A; se agitó e incubó por 10 min a temperatura ambiente, después de los cuales se le añadió 0.5 ml del reactivo B; se agitó nuevamente y esta vez se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Los tubos se leyeron a 750 nm contra un blanco de reactivos.

La curva patrón se realizó utilizando albúmina de bovino y dentro de un rango de 10 a 60 μ g / ml de proteína.

Reactivos para la cuantificación de proteínas

Solución de desoxicolato de sodio:

Se preparó una solución de desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15 % con agua bidestilada (pesando 0.15g y diluyendo en 100 ml de agua bidestilada)

Solución de ácido tricloroacético:

Se preparó una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 50 % con agua bidestilada pesando 50 g de TCA y diluyendo con 100 ml de agua bidestilada.

Solución de carbonato tartrato de cobre:

Para preparar este reactivo (CTC) a una solución de carbonato de sodio al 10 % (10 g/100 ml) se le añadió sulfato de cobre hasta una concentración del 0.1 % (0.1g/100 ml) y tartrato de potasio hasta una concentración del 0.2 % (0.2 g/100 ml).

Solución de dodecil sulfato de sodio:

Se preparó una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % en agua bidestilada, pesando 10 g de SDS y diluyendo en 100 ml.

Solución de hidróxido de sodio:

Se preparó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.8 N en agua bidestilada, tomando 3.2 g de NaOH y aforando a 100 ml con agua bidestilada.

Reactivo de Folin - Ciocalteu (reactivo B) :

Para preparar este reactivo se tomaba un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu mas cinco volúmenes de agua bidestilada.

Reactivo A :

Se mezclaban partes iguales de las soluciones de CTC, NaOH, SDS y agua bidestilada.

Identificación de los azúcares neutros por cromatografía de gases.

Las alícuotas de las diferentes fracciones de la pared celular una vez hidrolizadas con H₂SO₄ al 72 % por 18 horas, se liofilizaron y ya deshidratadas se derivatizaron añadiéndoles 500 µl de tri-silz e incubándolas a 70°C por 30 min

Un µl de la muestra derivatizada se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890. Las condiciones fueron: columna capilar de fenilmetilsilicón de 25 m de longitud, 25 milímetros de diámetro y 0.25 µm de película. La temperatura del detector y el inyector fue de 300°C y la temperatura de la columna fue de 100°C al iniciar la corrida, hasta 280°C al final de ésta, presentando una velocidad de incremento en la temperatura de 10°C por minuto, el tiempo a la temperatura final fue de 5 min

Se utilizó un detector de ionización de flama.

Los estándares utilizados fueron: arabinosa, galactosa, glucosa, fructuosa, manosa, ramnosa y xilosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el maíz, durante la germinación, se produce la elongación de la radícula, para lo cual se requiere de la expansión de las paredes celulares del embrión. Uno de los síntomas más evidentes de las semillas envejecidas es la disminución en su capacidad para germinar (Ross, 1980), lo que pudirá implicar que las propiedades bioquímicas y/o físicas de la pared celular de las células del embrión se han modificado durante el envejecimiento de la semilla. Por lo tanto los objetivos de este trabajo fueron: 1) establecer e identificar si durante el envejecimiento de la semilla se modificaban las propiedades de la pared celular de las células del embrión, 2) identificar el o los componentes responsables de esta modificación. Para el logro de los anteriores objetivos se comparó la estructura de las células de la radícula y la composición de la pared del embrión de semillas frescas y envejecidas. Estas últimas se obtuvieron por almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado, a partir de un lote de semillas frescas.

Envejecimiento de las semillas.

Las condiciones adversas de almacenamiento provocan alteraciones bioquímicas y fisiológicas que conducen al envejecimiento de la semilla, y ésto se manifiesta en la disminución de los porcentajes de germinación; es decir, en una reducción de la viabilidad de la semilla (Roos, 1980). Las semillas utilizadas en este estudio se almacenaron en dos condiciones: una que retarda el envejecimiento (óptimas), (4°C y 50 % de humedad relativa), y la otra que induce el envejecimiento, (30°C y 75 % de humedad relativa) (Castillo, 1990; Díaz de León, 1993). Las semillas almacenadas en condiciones óptimas, que de aquí en adelante llamaré frescas o control, presentaron una viabilidad de 100 % (Fig. 4), mientras que las almacenadas en condiciones adversas, que de aquí en adelante se denominarán

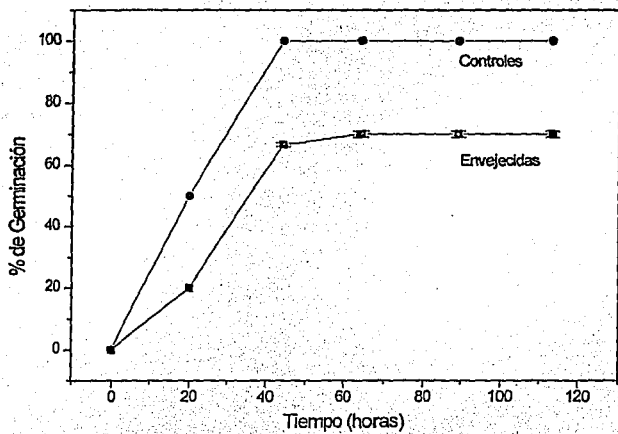


Figura 4. Efecto del envejecimiento sobre la viabilidad y la velocidad de germinación.

envejecidas, sólo presentaron un 75 %, siendo significativa esta diferencia. En la Fig. 4 también se observa que el tiempo en el cual se alcanza el máximo valor de germinación fue menor para el lote de semillas control (30 h), que para el lote envejecido (60 h). De hecho, a las 24 horas, la relación es de casi de 2:1. Estos resultados sugieren que la velocidad de expansión de las paredes del embrión de las semillas envejecidas podría ser menor que en semillas control, y pueden deberse, al menos en parte, a cambios en la estructura de la pared celular y/o a una disminución de la actividad metabólica. Esta segunda propuesta ha sido ampliamente estudiada en semillas envejecidas y está bien establecido que durante la germinación las semillas envejecidas presentan menor actividad metabólica que las frescas (González, 1994). Sin embargo, aún no se ha podido establecer si esta disminución del metabolismo es causa o efecto del envejecimiento, ya que para detectar actividad metabólica la semilla debe ser embebida. La propuesta de que la menor velocidad de germinación, característica de las semillas envejecidas pudiera deberse a que la pared celular se modificó durante el envejecimiento, puede explorarse en la pared celular aislada de la semilla seca, cuantificando con un Instron la fuerza requerida para que se elongue o bien observando la estructura de las zonas de elongación, ya que como se indicó en la introducción, la estructura celular depende de las propiedades de la pared celular.

En este sistema, el primer método no puede ser utilizado, debido a que el tamaño del embrión es muy pequeño para poder ser colocado en el Instron, por lo que se decidió averiguar si durante el envejecimiento se inducían cambios en la microestructura de las zonas de elongación.

El envejecimiento provoca cambios importantes en la microestructura de las células radiculares de los embriones de maíz.

Para el estudio anatómico comparativo de la radícula embrionaria de maíz se delimitaron, arbitrariamente, tres zonas que corresponden a: A, zona apical de la

radícula, C zona en la que se encuentra el meristemo radicular y la zona B, que es la transición entre A y C (Fig. 5). Solamente las células de la zona A presentaron durante el envejecimiento cambios observables al microscopio fotónico. Esta zona quedó subdividida en las regiones 1 y 2, la 1 corresponde al centro de la zona y la región 2 al límite de la radícula con el exterior.

De acuerdo con las observaciones hechas en los cortes de la región 1 de la zona A de los embriones control y deteriorados, se puede observar que el citoplasma de las células control presenta una apariencia más homogénea que el de las células deterioradas, ya que en estas últimas son evidentes una serie de inclusiones sumamente densas que se arreglan preferentemente en la periferia de la célula (Fig. 6 A y B); además las células envejecidas tienen un alto grado de plasmólisis que deja un espacio intracelular muy grande. En las células control no se observa el espacio intracelular y los espacios intercelulares son pequeños y de aspecto común en las células vegetales (Esau, 1982). Otra característica diferente observable a bajos aumentos es que los núcleos de las células deterioradas son mucho más densos, y por lo tanto evidentes, que los de las células control (Fig. 6 A y B). Al observar las células correspondientes a la región 2 de la zona A, se notaron básicamente las mismas diferencias, aunque el citoplasma de las células envejecidas parecía tener aún mayor cantidad de inclusiones, también distribuidas en la periferia de la célula. Se puede observar que los espacios intercelulares son más grandes entre las células de embriones control que entre las células de los embriones envejecidos (Fig. 6 C y D).

Cuando se llevaron a cabo las mismas observaciones pero ahora a aumentos mayores, además de los cambios descritos anteriormente para la región 1 de la zona A podemos agregar que los núcleos de las células envejecidas no sólo son más evidentes, sino también el nucleolo es fácilmente apreciable. El citoplasma presenta una gran cantidad de inclusiones, unas más densas que se distribuyen en la periferia adosadas a la membrana plasmática y otras menos densas dispuestas alrededor del núcleo disminuyendo hacia la región más externa del citoplasma. Por otro lado se nota que hay una cantidad importante de vacuolas

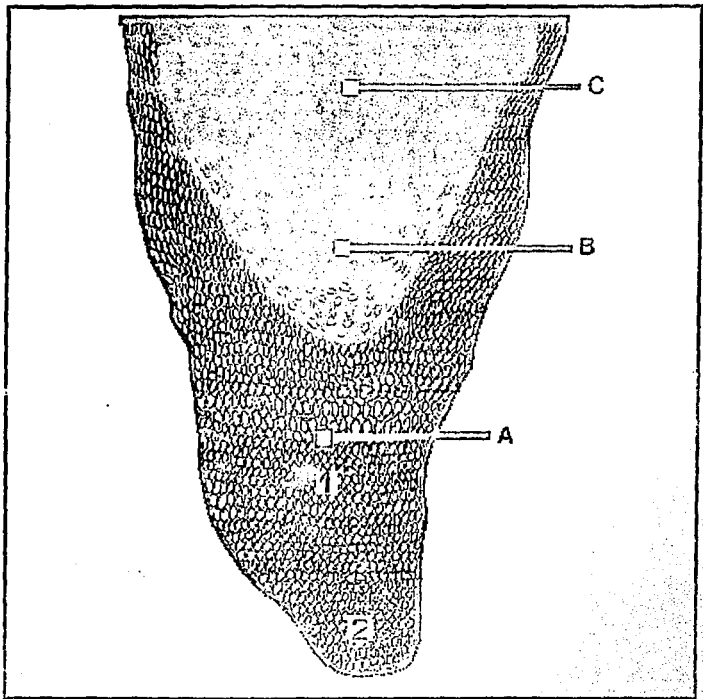


Figura 5. Zonas de la radícula para el estudio de la microscopía. A, zona apical, C, zona del meristemo radicular y B, zona de transición entre A y C.

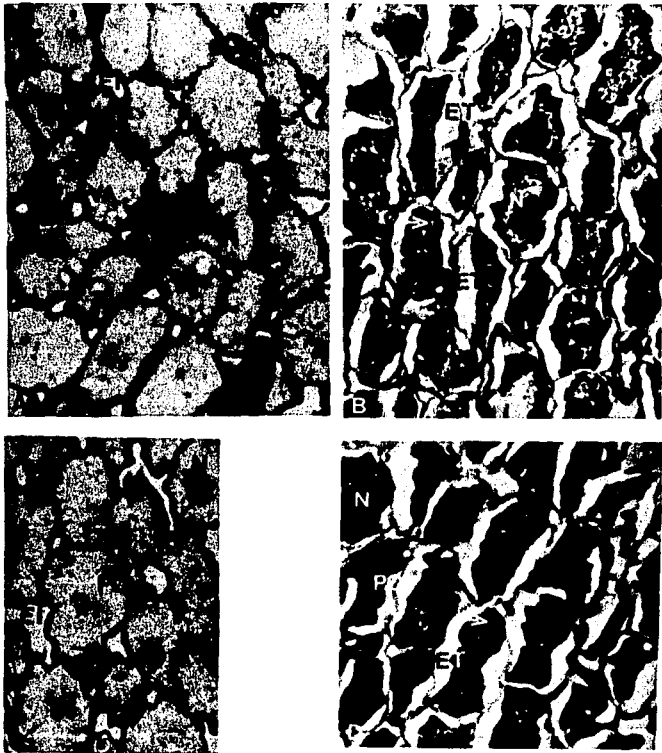


Figura 6. En A se muestra un corte longitudinal de la región 1 de la zona A, y en C un corte de la región 2, ambos cortes pertenecen a embriones de maíz control, las observaciones se realizaron a 20.48 aumentos en un microscopio fotónico, y utilizando un campo claro. B corresponde a la región 1 de la zona A, y D a la región 2, en este caso ambos cortes corresponden a embriones de maíz envejecidos, observaciones a 20.48 aumentos, en microscopio fotónico, contraste de fases. Pared celular (PC), espacios intercelulares (EI), espacios intracelulares (ET), núcleo (N) y vacuolas (VA). Las flechas indican inclusiones densas.

con un contenido denso en las células control, tales vacuolas no son observables en las células envejecidas (Fig. 7A, B, C y D).

Por último se puede observar que en las células controles de la región 2 de la misma zona A, la capa de mucllago que recubre el ápice radicular es de un grosor homogéneo y continuo, mientras que en las células de la misma región de un embrión envejecido, esta capa de mucllago se encuentra interrumpida en varios sitios y su grosor es heterogéneo. Aparentemente las células de los embriones envejecidos cambiaron su forma alargada a isodiamétrica, dejando a veces grandes espacios intercelulares (Fig. 8A, B y C).

Las células de la radícula de las semillas controles y las envejecidas mostraron diferencias estructurales, principalmente a nivel del núcleo, inclusiones densas en el citoplasma, plasmalema y espacios intercelulares.

Las células del embrión son ricas en esferoplastos (organelos de almacén de lípidos) y aparentemente, durante el envejecimiento de las semillas de pino (*Pinus sp.*) (Fernandez y Martínez-Hondévilla, 1984), y lechuga (*Lactuca sativa*) (Villers, 1973), éstos coalescen formando inclusiones densas de mayor tamaño. El embrión de maíz también es rico en lípidos y bien podría ser que durante el envejecimiento, la membrana unilamelar que rodea al esferosoma se desintegrara permitiendo la interacción de los contenidos lipídicos de estos organelos.

Las condiciones de envejecimiento aumentan el contenido de humedad de la semilla del 8 % en el control al 12 % en las semillas envejecidas (Díaz de León, 1993). Debido a que esta hidratación se realiza en condiciones limitantes de disponibilidad de agua, el grado de hidratación de las moléculas y estructuras celulares dependerá de su afinidad por el agua. Los ácidos nucleicos y los polímeros de carbohidratos constituyen las biomoléculas más afines por agua, por lo que es de esperarse que tanto el núcleo, organelo rico en ácidos nucleicos, como la pared celular, estructura rica en carbohidratos: pectinas y hemicelulosas, se encuentren más hidratados que el resto de la célula, y a esto podría deberse que en las micrografías de los embriones envejecidos el núcleo sea tan aparente y que los espacios intercelulares disminuyan. Otra evidencia que apoya la última

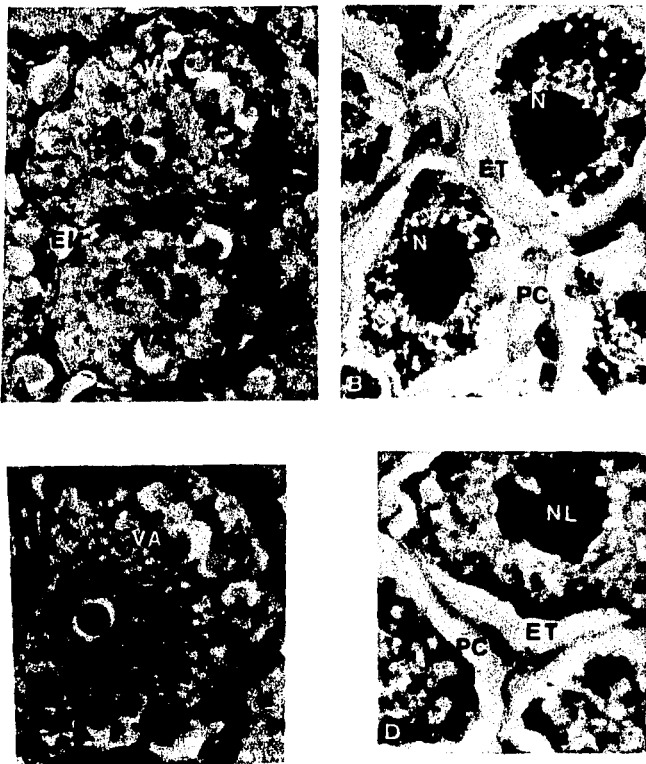


Figura 7. A y C son cortes longitudinales de la región 1 de la zona A de embriones de maíz controles, a 400 aumentos en A, y 512 aumentos en C, microscopio fotónico, contraste de fases. En B y D se presentan cortes de la región 1 de la zona A de embriones de maíz envejecidos, a 400 aumentos en B, y 640 en D, microscopio fotónico, contraste de fases. Pared celular (PC), espacios intercelulares (EI), espacios intracelulares (ET), núcleo (N), nucleolo (NL) y vacuolas (VA).

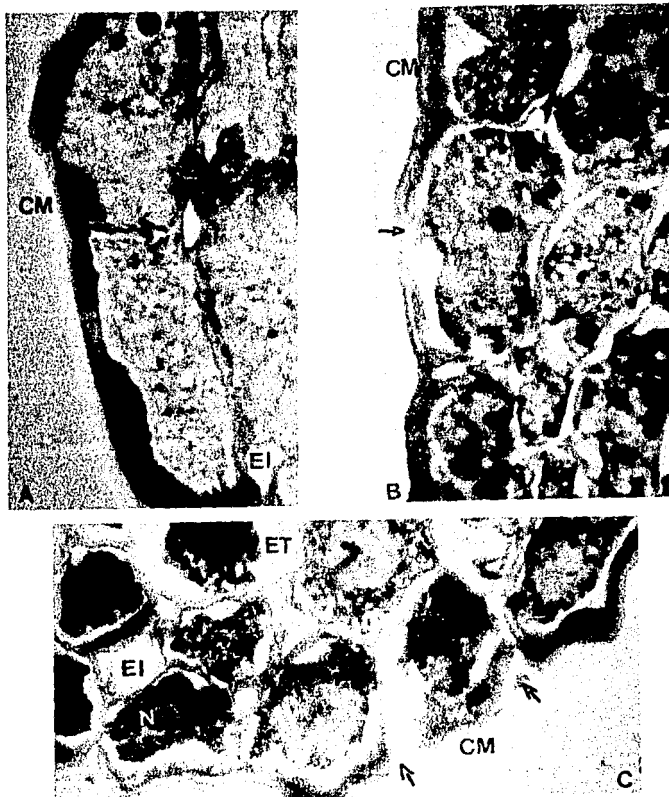


Figura 8. Observaciones de la región 2 de la zona A de embriones de maíz, en microscopio fotónico, contraste de fases. A, embriones control a 512 aumentos, B y C embriones envejecidos. Pared celular (PC), espacios intercelulares, (EI), espacios intracelulares (ET), núcleo (N), nucleolo (NL), vacuolas (VA) y capa de mucllago (CM). La flecha indica sitios de ruptura de la capa de mucllago.

sugerencia, la constituye la disminución del tamaño de los espacios intercelulares por el envejecimiento. Los geles artificiales de pectinas poseen una extraordinaria capacidad para cambiar reversiblemente su volumen. Estos cambios son inducidos por pequeños cambios en el contenido de humedad, sales, pH, etc. (Brett y Hillman, 1985), bien podría ser que debido a las condiciones en las cuales se realizó el envejecimiento de la semilla, el grado de hidratación de las pectinas presentes en la lamela media de la pared celular aumentara y por tanto su volumen, reduciendo de esta manera el espacio intercelular (Fig 6).

La plasmólisis observada en las células del embrión podría deberse a que el protoplasto se deshidrató durante la preparación para su observación al microscopio o a que durante el envejecimiento la célula tuvo la necesidad de disminuir su potencial osmótico. La primera posibilidad no parece factible, dado que las células de embriones germinados, en las que el contenido de humedad es mayor que el de los embriones aquí estudiados, preparados para observación al microscopio por el mismo método que el utilizado en este trabajo, no presentaron plasmólisis (Srivastava y Paulson, 1968; Lott, 1970). La segunda posibilidad, el ajuste osmótico, sería necesaria si durante el envejecimiento se aflojara la pared celular con la consecuente disminución en la presión de turgencia. Esta interpretación, más plausible, se apoya en el hecho de que durante el envejecimiento, el potencial de agua de la célula se equilibra con el de la atmósfera en que está almacenada la semilla y permanece constante (Díaz de León, 1993; González, 1994). Este nuevo potencial de agua es mayor que el que tenía la semilla antes de su almacenamiento en condiciones de envejecimiento y está dado por la diferencia entre el potencial osmótico y la presión de turgencia ($\Psi = P - \pi$) (Cosgrove, 1986). Si en esta nueva condición el componente P tiende a cero porque la pared se está relajando, se produciría una disminución en la presión hidrostática ejercida contra la pared celular y por tanto para mantener el Ψ de agua de la célula se tiene que aumentar π . Esto se puede lograr por un aumento en la concentración de solutos, y en las condiciones de envejecimiento,

dado que no hay transporte de solutos, sólo se puede lograr a través de una disminución en el volumen del protoplasto: la plasmólisis.

Suponiendo que el envejecimiento induce en el embrión cambios en la microestructura de los otros tejidos, similares a los de la zona de elongación, éstos se debían reflejar en un cambio en la composición de la pared celular del embrión. Por ello para demostrar si la pared celular de los embriones efectivamente se aflojaba durante el envejecimiento, se aisló y determinó la composición de la pared celular de los embriones controles y deteriorados.

Optimización de la metodología para la purificación y fraccionamiento de la pared celular de los embriones de maíz.

La composición química de la pared celular varía dependiendo del procedimiento utilizado en su purificación y el tipo de quelante empleado para la extracción de las pectinas (Maniñgat y Juliano, 1982; Shibuya *et al.*, 1985). Para ambos procesos en la literatura se describen diversos protocolos; en la purificación de la pared, los más comunes emplean disolventes que remueven almidón y las ligninas; tal es el caso del DMSO (Shibuya *et al.*, 1985). Para el fraccionamiento de los componentes de la pared, la mayoría de los protocolos reportados realizan como paso inicial una extracción con un quelante, el cual puede ser de pH ácido o básico, oxalato de amonio pH 5 o CDTA pH a 6.0. En el caso del presente estudio, se utilizó el CDTA a pH 13; esta extracción se efectúa a 90°C, independientemente del quelante utilizado. El resultado es una fracción rica en sustancias pécticas, aunque en algunos casos también se detectan pequeñas cantidades de hemicelulosas y proteínas (Cloudano *et al.*, 1982; Shibuya *et al.*, 1985; Manzi *et al.*, 1990; Presley, 1993). En el segundo paso de extracción, el residuo se somete a una extracción más fuerte que comúnmente involucra alguno de los siguientes reactivos: NaOH, KOH (ambos en atmósfera de nitrógeno o en presencia de borohidruro de sodio), urea, etc. Todos ellos pueden utilizarse en diferentes concentraciones, y dependiendo de éstas será el tipo de hemicelulosas

que se aislen; estos reactivos producen la ruptura de los puentes de hidrógeno, por lo que la fracción que aquí se obtiene es rica en hemicelulosas (Cloudano *et al.*, 1982, Shibuya *et al.*, 1985; Carpita y Canabus, 1988, Manzi *et al.*, 1990; Presley, 1993).

Tomando en cuenta esta información, se procedió a evaluar el efecto de incluir DMSO en la purificación de la pared celular y/o del tipo de quelante utilizado para la extracción pectinas en la recuperación cuantitativa de las fracciones extraídas de la pared celular. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 4. Se puede observar que la cantidad de pectinas extraídas de la pared celular es considerablemente mayor cuando en la extracción se utilizó CDTA (pH 13), que cuando se utilizó oxalato de amonio.

Tabla 4. Influencia del dimetilsulfóxido y del tipo de quelante en la composición de la pared celular.

DMSO ¹	Quelante	Fracción (µg / mg de pared celular)		
		Pectinas	Hemicelulosas	Proteínas
+	CDTA ² pH 13	90	530	90
+	OXA ³ pH 5	67	462	52
-	CDTA pH 13	77	682	28
-	OXA pH 5	66	691	21

¹ dimetilsulfóxido, ² cetildietiltetrametilamonio, ³ oxalato de amonio

Por otro lado, la cantidad de hemicelulosas recuperadas, cuando se utilizó KOH 4 M para su extracción, fue mayor en las paredes que no fueron tratadas con DMSO que en las tratadas con este disolvente. Respecto a las proteínas, se encontró que se extraía mayor cantidad de las paredes celulares purificadas con DMSO y si en la extracción de las pectina se utilizaba el quelante a un pH alcalino. El contenido de celulosa de la pared celular no pudo calcularse porque la variabilidad

en el peso del residuo después de la extracción era muy grande. Esta se debió, probablemente, al hecho de que la muestra inicial era pequeña (de 20 mg).

La matriz de la pared celular primaria de las gramíneas, familia a la que pertenece el maíz, está constituida por un 10 % de sustancias pécticas, 70 % de hemicelulosas, y el 20 % restante, en proporción equivalente, por proteínas y celulosa (McNeil, 1984, Burke *et al.*, 1974). Esta composición contrasta con la obtenida de pared celular purificada con DMSO, donde si bien el contenido de las pectinas extraídas con cualquiera de los quelantes utilizados (6.7 a 9.0 %), es del orden de lo reportado, el de hemicelulosas fue significativamente menor y fue sólo de 46.2 a 53 %. Este resultado podría deberse a que el contenido de hemicelulosas fuese diferente entre las paredes aisladas de células en crecimiento y de embriones maduros y secos, o bien a que el DMSO estuviera disolviendo parte de esta fracción. La primera posibilidad se descartó al observar que los contenidos de hemicelulosas extraídos de paredes no purificadas con DMSO (68.2 a 69.1 %) eran similares a los reportados para otras gramíneas (70 %). Por ello se decidió no utilizar DMSO en la purificación de la pared celular. El pH del quelante utilizado influyó sólo ligeramente en la cantidad de pectinas extraídas de las paredes celulares no purificadas con DMSO; esta diferencia podría deberse a que una fracción de las hemicelulosas de los coleóptilos de maíz se extrae con 0.01 M de KOH (Carpita, 1984). Bien podría ser que en la fracción de pectinas extraídas con CDTA pH 13, se estuviera extrayendo parte de las hemicelulosas, y esto explicaría por qué se extrae mayor cantidad de pectinas con el quelante básico que con el ácido (Tabla 4).

Tomando en consideración los resultados antes descritos, para el presente estudio se decidió no utilizar DMSO en la purificación de las paredes celulares, y utilizar el oxalato de amonio como quelante para extraer pectinas.

Las hemicelulosas de los cereales, tomando como representante al coleóptilo de maíz en crecimiento, están formadas principalmente por glucuronoarabinosilanos (GAX) los cuales constituyen cerca del 50 % de la masa total de la pared celular (Carpita y Gebeaut, 1993). Esta fracción a su vez está constituida por tres tipos de

polímeros, los cuales pueden separarse por extracciones sucesivas, utilizando un gradiente de KOH. La fracción 1 (GAX-1), constituye del 20 al 22 % de la fracción de las hemicelulosas, que se solubilizan con 0.01 a 0.045 M de KOH; consta de un glucuronoarabinosilano en el que cada 6 a 7 residuos del xilano están sustituidos por un grupo arabinosilo; la fracción 2 (GAX-2) es el material solubilizado por 0.45 a 0.8 M de KOH; esta también es una fracción enriquecida en glucoarabinosilano, pero sólo 2 de cada 3 residuos de xilosa están sustituidos. Esta fracción representa el 19 % de la fracción de las hemicelulosas. La fracción 3 (MG/GAX) se extrajo con 2 a 3 M de KOH; constituye un 59 % de la fracción de hemicelulosas, y su composición está dada por una mezcla de glucanos (60 %) y glucoarabinosilanos (40 %).

En este trabajo, las hemicelulosas se extrajeron como una sola fracción, utilizando KOH 4M, o en subfracciones, utilizando KOH 0.1 M para extraer la fracción GAX-1 y KOH 4.0 M para extraer el resto de las hemicelulosas, que en lo sucesivo serán denominadas GAX-2,3, y comprenderían las fracciones GAX-2 y GAX-3 (MG/GAX) arriba mencionadas. En la Tabla 5 se muestra la recuperación de las hemicelulosas, extraídas de la pared celular despectinada con uno y otro método. Cualquiera de los tratamientos utilizados solubilizó del 67.5 al 75.2 % del material de la pared celular (Tabla 5); este material está constituido principalmente por azúcares neutros (90 %). La proporción de galacturónico y proteínas fue ligeramente mayor en el caso de las extracciones sucesivas.

La solubilidad y la composición de los polímeros de la pared celular se modifica por el envejecimiento de la semilla.

Para estudiar si el envejecimiento de la semilla inducía cambios en la pared de las células del embrión, lo que se hizo fue comparar cualitativa y cuantitativamente las diversas fracciones extraídas de la pared celular de embriones de semillas frescas,

Tabla 5. Contenido y composición de hemicelulosas

Tratamiento ¹	Composición (mg/mg de pared)			
	Galacturónico	Azúcares	Proteína	% del total
KOH 4M	47	620	5.5	67.2
KOH 0.1 M	21	144	4.0	16.9
KOH 4 M ²	37	467	7.8	51.1

¹ Se utilizó pared celular despectinada; ² Se utilizó el residuo después de la extracción con KOH 0.01 M

con las extraídas de embriones aislados de semillas envejecidas. Para mayor claridad, en lo sucesivo se denominan pared celular control y pared celular envejecida a las aisladas de los embriones obtenidos por disección de semillas frescas y envejecidas, respectivamente.

Los polisacáridos extraídos con oxalato de amonio, supuestamente pectinas, constituyeron entre el 9.3 y 10.6 % del total de la pared celular envejecida y la control, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del envejecimiento de la semilla en la extracción de pectinas y su composición.

Lote	Control	Envejecido
Composición (mg/mg de pared celular)		
Ac. Galacturónico	19.0 (17.9) ¹	30.0 (32.5)
Azúcares Neutros	71.0 (66.9)	50.0 (53.7)
Proteínas	16.0 (15.0)	13.0 (13.97)
% de recuperación ²	10.6	9.3

1. Porcentaje en peso de abundancia en los azúcares de la fracción. 2. Considerando como 100 la cantidad de pared inicial.

El contenido de ácidos urónicos fue mayor en la fracción pectínica extraída de la pared celular envejecida (32.5 %), que en la extraída de la pared celular control (17.9 %). Sin embargo, la cantidad de azúcares neutros presente en esta misma fracción fue ligeramente mayor en la pared celular control (66.9 %, del total de la fracción), que en la deteriorada (53.7 %, del total de la fracción). Cualitativamente, el perfil de los azúcares neutros de las pectinas aisladas de cada tipo de pared celular fue similar (Tabla 7) pero cuantitativamente presentaron diferencias importantes.

Los azúcares neutros identificados y cuantificados en esta fracción fueron: arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, manosa y ramnosa. Los azúcares más abundantes presentes en la fracción de pectinas extraídas de la pared celular control, fueron glucosa, arabinosa y xilosa, el primero con una abundancia del 34 % y los dos últimos, que representaron cerca del 20 % del total de la fracción de azúcares.

Tabla 7 Composición de azúcares neutros de la fracción de pectinas extraídas de pared control y envejecida.

Lote	Control	Envejecida
Azúcar neutro (%)		
Galactosa	13.8	11.0
Glucosa	34.0	12.3
Arabinosa	8.3	16.2
Xilosa	9.7	11.7
Ramnosa	4.3	5.7
Manosa	2.2	1.5

Esta composición contrasta con la obtenida de las pectinas extraídas de la pared celular envejecida, donde la glucosa sólo contribuyó con un 12 % del total, y la arabinosa y xilosa con casi un 27 %. La proporción de xilosa a arabinosa también se modificó por el envejecimiento de la semilla. En pared celular control la relación de xil/ara fue de 1, mientras que en la envejecida fue de sólo 0.7. Esta disminución se debió principalmente a que la abundancia de arabinosa fue mayor en las pectinas extraídas de la pared celular envejecida (Tabla 7). Estos resultados sugieren que el envejecimiento de la semilla modificó de manera importante las interacciones de las pectinas con los GAXs, y que en este nuevo tipo de interacción se facilita la extracción de las fibras ricas en ácido galacturónico, las pectinas, así como una mayor cantidad de fibras ricas en azúcares neutros.

La cantidad de hemicelulosas extraídas de la pared celular envejecida fue significativamente menor que la extraída de la pared control (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del envejecimiento de la semilla en la extracción de hemicelulosas y su composición.

Lote	Control	Envejecido
Composición (mg/mg de pared celular)		
Ac. galacturónico	47.0 ((7.5)1	45.0 (10.1)
Azúcares Neutros	620.0 (92.2)	390.0 (87.83)
Proteínas	5.5 (0.8)	9.7 (2.18)
% de recuperación ²	67.2	44.4

1. Porcentaje en peso de abundancia en los azúcares de la fracción. 2. Considerando como 100 la cantidad de pared inicial.

Sin embargo, la composición de esta fracción con respecto al contenido de azúcares neutros (87.8 y 92.2 %, en paredes envejecidas y controles respectivamente) y ácido galacturónico (7.5 y 10.1 %, en paredes controles y envejecidas respectivamente) no se modificó de manera importante. Por su parte, la proporción de proteína extraída de la pared celular envejecida aumentó en casi tres veces.

Cuando la hemicelulosa fue aislada por subfracciones, la cantidad de GAX-1 extraída de la pared celular control fue mucho menor (16.9 %) que la extraída de la pared envejecida (51.1 %). Mientras que la mezcla de GAX-2,3 fue mayor para el caso de la pared control que la envejecida (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de las subfracciones de hemicelulosas extraídas de pared control y envejecida

Lote	Control		Envejecida	
	GAX-1	M GLU/GAX	GAX-1	M GLU/GAX
Subfracción (mg/mg pared)				
Ac. Galacturónico	21.0 (12.4) ¹	37.0 (7.2)	42.0 (15.8)	24.0 (7.4)
Azúcares Neutros.	144.0 (85.2)	467.0 (91.38)	214.0 (80.7)	293.0 (90.7)
Proteínas	4.0 (2.36)	7.8 (1.53)	2.5 (0.9)	6.6 (2.04)
Recup (%)	16.9	51.1	26.5	32.36

1. Porcentaje en pesos de abundancia en los azúcares de la fracción. 2. Considerando como 100 la cantidad de pared inicial.

Desafortunadamente la composición de azúcares neutros de las subfracciones de hemicelulosas no se determinó, pero la composición de azúcares de la fracción completa de hemicelulosas indica que los azúcares presentes en esta fracción son similares a los encontrados en la fracción de las pectinas (Tabla 10). En este caso también se observó que la abundancia de la glucosa es menor en la pared celular envejecida que en la control, y que la relación de xilosa a arabinosa también

disminuyó durante el envejecimiento de la semilla, debido a un aumento en la proporción de arabinosa. Dado que la arabinosa y la xilosa son epimeros, y en ambos tipos de pared celular se detectaron cantidades similares de estas pentosas (142 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pared celular), los resultados antes mencionados sugieren que durante el envejecimiento una parte de las xilosas se epimeriza a arabinosa.

La pared celular primaria de las gramíneas comprende dos dominios, los cuales aunque estructuralmente independientes, interactúan uno con el otro. Un dominio, que constituye el almacén de la pared celular, está formado por microfibrillas de celulosa y hemicelulosas, β -D-glucanos, xiloglucanos -en muy pequeña cantidad-

Tabla 10. Composición de azúcares neutros de las hemicelulosas aisladas de la pared celular control y la envejecida.

Lote	Control	Envejecida
Azúcar neutro ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		
PC)		
Galactosa	62.0 (10.8) ¹	62.4 (16.1)
Glucosa	228.0 (36.8)	27.3 (7.17)
Arabinosa	37.2 (5.9)	62.4 (16.1)
Xilosa	105.4 (16.9)	89.7 (23.7)
Ramnosa	ND	7.4 (1.9)
Manosa	4.3 (0.7)	2.34 (0.6)

ND no detectada. 1 Porcentaje en peso de abundancia en los azúcares de la fracción

y galacturonarabinoxilanos, embebidas en un segundo dominio constituido por una matriz de pectinas (Carpita y Gigeaut, 1993). Los componentes de cada uno de estos dominios pueden cambiar independientemente durante el desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Ye y Varner, 1991).

La elongación celular en las plantas resulta de dos procesos interdependientes: el aflojamiento de la pared celular y el aumento de la absorción de agua por el protoplasto. En condiciones fisiológicas, la pared de una célula turgente es elásticamente (reversible) estirada por el protoplasto, dando lugar a un estrés en las moléculas de la pared responsables de esta elasticidad; simultáneamente los componentes del protoplasto se comprimen, dando lugar a la presión de pared. El crecimiento por elongación se inicia cuando los polímeros de la pared que soportan el estiramiento ceden, produciendo un relajamiento de los elementos de la pared elásticamente distendidos y una reducción del estrés de la pared. La presión de la turgencia y la presión de la pared son fuerzas de la misma magnitud pero de signo contrario, por lo que ambas decrecen simultáneamente. Tal relajación reduce el potencial de agua del protoplasto, dando lugar a un aumento pasivo en el influjo de agua, que aumenta el volumen del protoplasto y elonga la pared celular (Cosgrove, 1986). Simultáneamente se deposita, de manera uniforme, nuevo material a lo largo de toda la pared.

Durante la elongación celular de las gramíneas, los constituyentes de la pared celular cambian drásticamente, especialmente los β -D-glucanos y los glucuronarabinoxilanos. El primero es hidrolizado y sintetizado durante la elongación celular, siempre y cuando haya aporte de glucosa; de lo contrario sólo se observa la hidrólisis, y el segundo, especialmente la fracción de GAX-1, se incrementa notablemente (Carpita, 1984). Estos dos tipos de polímeros son las principales moléculas que soportan la tensión en el eje longitudinal de la célula, y su hidrólisis o disociación constituyen el paso limitante en la elongación celular. A la luz de esta evidencia los resultados de este trabajo se pueden interpretar como que el envejecimiento de las semillas induce modificaciones en la pared celular semejantes a los inducidos durante la primera etapa de la elongación celular: el aflojamiento, lo que probablemente resulte en una relación: pared celular turgencia-incompetente, disminuyendo de manera significativa la elongación y por tanto la germinación. Los resultados que apoyan esta interpretación son: 1) en la pared celular envejecida, el contenido de glucosa es menor que en la pared

control (Tablas 6 y 9), lo que sugiere que el β -D-glucano se hidrolizó, y que estas modificaciones de la pared celular se realizan sin aporte de glucosa. 2) Los niveles de GAX-1 son menores en pared celular control que en envejecida (Tabla 6). Lo que puede resultar en pared celular envejecida, las microfibrillas de celulosa están menos enlazadas por estos polímeros 3) La composición de los azúcares tanto de las pectinas (Tabla 7), como de las hemicelulosas (Tabla 10) indica que en la pared celular control, el glucuronoarabinosilano está substituido a la mitad que en las células envejecidas. Esta estructura disminuye la capacidad del GAX para unirse a través de puentes de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa o entre ellos, lo que resultaría en una pared celular más laxa. Los grupos laterales no sólo impiden la formación del puente de hidrógeno, sino que también aumentan la solubilidad del GAX en agua, lo que explicaría por qué se extrae mayor cantidad de GAX a muy baja concentración de KOH en la pared celular envejecida, respecto al control.

HALLAZGOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES

1. El envejecimiento induce la plasmólisis de las células radiculares, dejándolas poco turgentes, y haciendo más evidentes estructuras como el núcleo y el nucleolo.

2. Las características tanto cuantitativas como cualitativas, (la extractibilidad y la distribución de los diferentes polímeros), de la pared celular de los embriones envejecidos cambian por efecto del deterioro, y se asemejan a las de una pared celular en elongación.

De las dos fases de la elongación (relajación de la pared y aumento del volumen celular), durante el envejecimiento se lleva a cabo la relajación de la pared celular; sin embargo, la velocidad de germinación de las semillas envejecidas es menor con respecto a la de semillas controles, probablemente por que la presión de turgencia es menor que la requerida para que se realice la elongación radicular.

REFERENCIAS

1. Basavarajappa B.S., Shetty H.S., Prakash H.S. 1991 Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. and Technol.* 19:279-286.
2. Bernal-Lugo I., Parra C., Carballo A. y Hamabata A. 1994 Enzymic systems altered by accelerated aging of seeds. *Plant Physiol (Life Sci. Adv.)* 13:287-294.
3. Blumenkrantz N. G. y Asboe-Hansen 1973 New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem* 54:484-489.
4. Biggs J. K. y Fry C. S. 1990 Solubilization of covalently bound extensins from *Capsicum* cell walls. *Plant Physiol.* 92:197-204.
5. Brett C. T. y Hillman J. R. 1985 *Biochemistry of plant cell walls.* Cambridge university press pp 99-124 y 259-268.
6. Brett C. T. y Waldron K. 1990 *Physiology and Biochemistry of plant cell walls.* Unwin Hyman. Londres pp 4-57.
7. Burke D., Kaufman P., McNeil M. y Albersheim P. 1974 The structure of plant cell walls. *Plant Physiol.* 54:109-115.
8. Byron L. G. 1994 Oxalate, germin and the extracelular matrix of higher plants. *FASEB J.* 8:264-301.
9. Campbell D.A. y Labavitch M.J. 1991 Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in culture pear cells. *Plant physiol.* 97:699-705.
10. Cardemil L. y Riquelme A. 1991 Expression of cell wall proteins in seeds and during early seedling growth of *Araucaria araucana* in response to wound stress and developmentally regulated. *J. of experimental Botany* 42:415-421.
11. Carpita C. N. 1983 Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea* coleoptiles. *Plant Physiol.* 72:515-521.
12. Carpita C. N. 1984 Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. *Phytochemistry* 23:1089-1093.
13. Carpita C. N. y Kanabus J. 1988 Chemical structure of cell walls of dwarf maize and changes mediated by gibberellin. *Plant Physiol.* 88:671-678.

14. Carpita C. N. y Gibeaut M. G. 1993 Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.
15. Cassab I. G. y Varner E. J. 1988 Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:321-353
16. Castillo M. A. 1990 Participación del ácido fítico, pectinas y proteínas en la velocidad de cocción del grano de frijol. Tesis de Licenciatura ENEP Iztacala.
17. Cleland R. E. 1971 Cell wall extension. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 22:197-222.
18. Condit M. C y Meagher B. R. 1986 A gene encoding a novel Glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* 323:178-181.
19. Condit M. C., McLean G. B. y Meagher B. R. 1990 Characterization of the expression of the *Petunia glycine rich protein-1* gene product. *Plant Physiol.* 93:596-602.
20. Cosgrove J. D. 1985 Cell wall yield properties of growing tissue. *Plant Physiol.* 78:347-356.
21. Cosgrove J. D. 1986 Biophysical control of plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:377-405.
22. Cosgrove J. D. 1989 Characterization of long term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* 177:121-130
23. Cosgrove J. D. 1993 How do plant cell walls extend?. *Plant Physiol.* 102:1 -6.
24. Cronquist A. 1988 The evolution and clasification of flowering plants. The New York botanical garden, Bronx, N. Y.
25. Darvill J. E., McNeil M., Darvill A. G. y Albersheim P. 1980 Structure of plant cell wall. XI Glucuronoarabinoxilanos, a second hemicellulose primary cell walls of suspension cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 66:1135-1139.
26. Dubois M., Gilles A. K., Hamilton K. J., Rebers A. P. y Smith F. 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
27. Díaz de León S. F. 1993 Contenido de carbohidratos y sensibilidad al deterioro de algunos cultivares de maíz. Tesis de maestría Facultad de Química.

28. Esau K. 1982 Anatomía de plantas con semillas. Editorial Hemisferio Sur. Madrid-España 1982, p.p.69-79y441-464.
29. Fernández G. C. y Martínez-Honduvilla C. 1984 Ultrastructural changes in naturally aged *Pinus pinea* seeds. *Physiol. Plant.* 62:581-588.
30. Fry S. C. 1980 Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. *Phytochemistry* 19:735-740.
31. Fry C. S. 1986 Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:165-186.
32. Fry C. S. 1988 The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis. De Logman scientific and technical pp.121.
33. Fry C. S., Smith C. R., Renwick F. K., Martin J. D., Hodge K. S. y Matthews J. K. 1992 Xiloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282:821-828.
34. Ganguli S. y Sen-Mandi S. 1990 Some physiological differences between naturally and artificially aged wheat seeds. *Seed Sci. & Technol.* 18:507-514.
35. Getz H. P. 1991 Activity of cell wall bound acid invertase of mature red beet root tissue. *Plant Physiol. Biochem.* 29:585-593
36. Gibeaut M. D. y Carpita C. N. 1991 Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants. *Plant Physiol.* 97:551-561.
37. Gibeaut M. D. y Carpita C. N. 1994 Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB Journal* 8:904-915.
38. González M. S. 1994 Efecto del deterioro en los niveles de biomoléculas que participan en la protección del estado seco de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de maestría Facultad de Ciencias.
39. Goto M., Gordon H. A. y Chesson A. 1991 Changes in cell wall composition and degradability of sorghum during growth and maturation. *J. Sci. Food Agric* 54:47-60
40. Goubet F. y Morvan C. 1994 Synthesis of cell wall galactans from flax (*Linum usitatissimum* L.) suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 35:719-727.
41. Harriman W. R., Tieman M. D. y Handa K. A. 1991 Molecular cloning of tomato pectin methyltransferase gene and its expression in rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and never ripe tomato fruits. *Plant Physiol* 97:80-87

42. Hayashi T. 1991 Biochemistry of xiloglucans in regulating cell elongation and expansion. The cytoskeletal basis of plant growth and form 131-144.
43. Hayashi T., Baba K. y Ogawa K. 1994 Macromolecular complexes of xiloglucan and cellulose obtained by annealing. *Plant Cell Physiol* 35:219-223.
44. Heckman W. J., Terhune T. B. y Lampion A.T. 1988 Characterization of native and modified extensin monomers and oligomers by electron microscopy and gel filtration. *Plant Physiol.* 86:848-856.
45. Herter U. y Burrell J. S. 1989 Evaluating drying on corn seed with a conductivity test. *Seed Sci. and Technol.* 17:625-638.
46. Hohl M., Hong Y. N. y Schopfer P 1991 Acid and enzyme mediated solubilization of cell wall, ~ 1-3, B 1-4-D-glucan in Maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 95:1012-1018.
47. Inouhe M. y Nevis J. D. 1991 Auxin enhanced glucan autohydrolysis in maize coleoptile cell walls. *Plant Physiol.* 96:285-290.
48. Jarvis C.M., Forsyth W. y Duncan J. H. 1988 A survey of the pectin content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.* 88:309-314.
49. Kato Y. y Nervis D. J. 1985 Isolation and identification of O (5-O Feruloyl-oc-L-arabinofuranosyl)-(1-3)-O-,B D-xilopyranosil-(1-4)-D-Xilopyranose as a component of Zea Shoot cell walls. *Carbohydr. Res.* 137:139-150.
50. Kauss H. y Hassid W. Z. 1967 Enzymic introduction of the methyl ester groups of pectin. *J. Biol. Chem.* 242:3449-3453.
51. Kenneth A. S., Greve C., Labavitch M. J. Y Ahmadi H. 1991 Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiol* 97:814-816.
52. Kieliszewski J. M., Leykam F. J. y Lampion A.T. 1990 Structure of the threonine-rich extensins from Zea mays. *Plant Physiol.* 92:316-326.
53. Kutschera U. 1991 Regulation of cell expansion. The cytoskeletal basis of plant growth and form 149-157.
54. Knox J. P., Linstead P. J., King J., Cooper C. y Roberts K 1990 Pectin esterification in spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181:512-521.
55. Labavitch M. J. y Ray P. M. 1978 Structure of hemicellulosic y polysaccharides of Avena sativa coleoptile cell walls *Phytochemistry* 17:933-937.

56. Lamport D. T. A. 1986 The primary cell wall: a new model. In cellulose: structure modification and hydrolysis. Young R. A. Editors. New York: Wiley pp 77-90.
57. Li Z. C., Durachko M. D. y Cosgrove J. D. 1993 An oat coleoptile wall protein that is antigenically related to similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191 :349-356.
58. Lott A. N. 1970 Changes in the cotyledons of *Cucurbita maxima* during germination. III Plastids and chlorophylls. *Can. J. Bot* 48:2259-2265.
59. Lowry O. N., Farr A. y Randall R. 1951 Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chemistry* 193:265-275.
60. Maniñgat C. C. y Juliano O. B. 1982 Composition of cell wall preparation of rice brand and germ. *Phytochemistry* 21 :2509-2516.
61. Manzi E. A., Ancibor E. y Cerezo S. A. 1990 Cell wall carbohydrates of the endosperm of the seed of *Gleditsia tricanthos*. *Plant Physiol.* 92:931-938.
62. Markwalder H. V. y Neukam H. 1976 Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* 15:836-837.
63. Martin-Cabrejas M. A., Waldron W. K., Selvendran R. R., Parker L. M. y Moates G. K. 1994 Ripening-related changes in the cell walls of spanish pear (*Pyrus communis*). *Physiologia Plantarum* 91 :671 -679.
64. Melotto E., Greve L. C. y Labavitch M. J. 1994 Cell wall metabolism in ripening fruit. *Plant Physiol.* 106:575-581
65. McCann C. M. y Roberts K. 1991 Architecture of the primary cell wall. The cytokeletal basis of plant growth and form 109-129.
66. McCollum T. G., Huber J. D. y Cartliffe J. D. 1989 Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiologia Plantarum* 76:303-308
67. Mcneil M., Darvill A. G. y Albersheim P. 1984 Structural and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53:625-663.
68. McQueen-Manson S. y Cosgrove J. D. 1994 Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :6574-6578.

69. McQueen-Manson S. y Cosgrove J. D. 1995 Expansin mode of action on cell walls. *Plant Physiol.* 107:87-100.
70. McQueen-Manson S., Durachko M. D. y Cosgrove J. D. 1992 Two endogenous protein that induce cell wall extension in plants. *Plant cell* 4:1425-1433.
71. Mortenson E. y Dreyfuss G. 1989 RNP in maize protein. *Nature* 337:312.
72. Neuman M. P. 1993 Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant, Cell and Environment* 16:1107-1114.
73. Nishitani K. y Tominaga R. 1992 Endo-xiloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xiloglucan molecule to another xiloglucan molecule. *J. of Biological Chemistry* 267:2105821064.
74. Nobel S. P. 1983 *Biophysical plant physiology and ecology*. Ed. Freeman San Francisco.
75. O'Donoghue E. M., Huber D. J. Timpa J. D., Erdos G. W. y Brecht J. K. 1994 Influence of avocado (*Persea americana*) Cx-cellulase on the structural features of avocado cellulose. *Planta* 194:573-584.
76. Ortega J. K., Smith M. E. y Erazo A. J. 1991 A comparison of cell wall yielding properties for two developmental stages of pycnomycetes sporangiothores. *Planta* 183:613-619.
77. Ponquett T. R., Smith T. M. y Roos G. 1992 Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. *Seed Science Research*. 2:51-54.
78. Powell D. A., Morrison E. R., Gidley M. J. y Rees D. A. 1982 Conformations and interactions of pectins. II Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.* 155:517-531.
79. Prestley A. P. 1986 *Seed aging*. Comstock publishing associates. N. Y. pp 40-75.
80. Preston D. R. 1979 Polysaccharide conformation and cell wall function. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:55-78
81. Rayle D. L. 1973 Auxin-induced hydrogen ion secretion in avena coleoptiles and its implications. *Planta* 114:63-73.

**ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

82. Rayle L. D. y Cleland E. R. 1992 The theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99:1271-1274.
83. Reiter W. D., Chapple C. C. y Somerville R. Ch. 1993 Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261:1032-1035.
84. Roberts H. E. y Black M. 1989 Seed quality. *Seed Sci. and Technol.* 17:175-185.
85. Robertson L. G. y Swinburne D. 1981 Changes in chlorophyll and pectin after storage and canning of kiwifruit. *Journal of food science* 46:1557-1559.
86. Roos E. E. y Davison D. A. 1992 Record longevities of vegetable seed in storage. *Hort. Science* 27:393-396.
87. Sabatini D. D., Miller F. y Barnett 1964 Aldehyde fixation for morphological and enzyme histochemical studies with the electron microscope. I *Histochem. Cytochem* 12:57-62.
88. Samson R. M., Jongeneel R. y Klis M. F. 1984 Arabinogalactan protein in the extracellular space of *Phaseolus vulgaris* hypocotyls. *Phytochem.* 23:493-496.
89. Serpe D. M. y Matthews A. M. 1994 Changes in cell wall yielding and store growth in *Begonia argenteo-guffata* L. Leaves during the development of water deficits. *Plant Cell Physiol.* 35:619-626.
90. Shibuya N., Nakane R., Yasui A., Tanaka K. y Iwasaki T. 1985 Comparative studies on cell wall preparations from rice brand. germ. and endosperm. *Cereal Chemistry* 62:252-258.
91. Showalter M. A. 1993 Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.
92. Smith G. B. y Harris J.P. 1995 Polysaccharide composition of unligified cell wall of pineapple (*Ananas comusus*) fruit. *Plant Physiol.* 107:1399-1409.
93. Srivastava L. M. y Paulson R. E. 1968 The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. II Changes during germination. *Can. J. Bot* 46:1447-1453.
94. Stafstrom J. P. y Staehelin L. A. 1986 Cross-linking patterns in salt-extractable extensins from carrot cell walls. *Plant Physiol* 81 :234-241.
95. Taiz L. 1984 Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:585-657.

96. Talbott D. L. y Pickard G. B. 1994 Differential Changes in size distribution of xiloglucan in the cell walls of gravitropically responding *Pisum sativum* epicotyls. *Plant Physiol.* 106:755-761.

97. Varner J. E. y Lin L-S 1989 Plant cell wall architecture. *Cell* 56:231-239.

98. Vertucci W. Ch. y Roos E. E. 1993 Theoretical basis of protocols for seed storage 11. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research* 3:201-213.

99. Villiers A. T. 1974 Seed aging: Chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. *Plant Physiol.* 53:875-878.

100. Ye Z.H. y Varner E. J. 1991 Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissue. *Plant Cell* 3:23-37.