

109  
23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"OSMOACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS DE  
FRIJOL Y SU EFECTO EN EVENTOS BIOQUÍMICOS  
PRE Y POST OSMOACONDICIONAMIENTO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

MA. DE LA PAZ SANCHEZ JIMENEZ



MEXICO, D. F.

1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente                    Prof. VAZQUEZ RAMOS JORGE MANUEL

Vocal                        Prof. BERNAL LUGO IRMA OFELIA

Secretario                 Prof. GAVILANES RUIZ MARINA

1er. Suplente              Prof. ROMERO AVILA MARIA TERESA

2do. Suplente             Prof. GIRAL BARNES CARMEN

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E Departamento de Bioquímica,  
Laboratorio 114

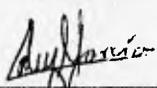
Asesor del Tenta:



---

DR. JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS

Supervisor Técnico:



---

M. en C. FELIPE CRUZ GARCIA

Suslente:



---

MA. DE LA PAZ SANCHEZ JIMENEZ

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos, por la dirección y el apoyo que me ha brindado en la realización de esta tesis

Al M. en C Felipe Cruz García, por su asesoría técnica.

## DEDICATORIAS

A mis padres Esteban y María Luisa ya que gracias a su esfuerzo, apoyo y comprensión logré la realización de mi anhelada carrera profesional.

A mis hermanos Carlos e Ignacio, por ayudarme a seguir siempre adelante.

A mis tíos, especialmente a Tere y Angel, por que siempre me recibieron con los brazos abiertos.

A mis primas, por todo el cariño que me han dado.

A Felipe, por toda la confianza y amistad que me brindó.

A mis compañeros del laboratorio 114.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
1.1. GERMINACION	2
1.1.1. Metabolismo de las semillas durante la germinación	3
1.1.1.1 Respiración	3
1.1.1.2 Síntesis de ADN	4
1.1.1.3 Síntesis de ARN y proteínas	4
1.2. OSMOACONDICIONAMIENTO	6
1.2.1. Síntesis de ADN	7
1.2.2. Síntesis de ARN	7
1.2.3. Síntesis de proteínas	8
1.3. PROTEINAS LEA	8
II. OBJETIVOS	10
III. MATERIALES Y METODOS	
III.1. MATERIAL VEGETAL	11
III.2. METODOS	11
III.2.1. Osmocondicionamiento de semillas de frijol	11
III.2.2. Germinación de semillas	12
III.2.3. Contenido de humedad	12
III.2.4. Deterioro de semillas	12
III.2.5. Síntesis de ADN	13
III.2.6. Northern blot	14
III.2.6.1. Extracción y purificación de ARN	14
III.2.6.2. Evaluación de la Integridad del ARN	15
III.2.6.3. Preparación de la sonda de cDNA (PvLEA-14)	15
III.2.6.3.1. Reamplificación	15
III.2.6.3.2. Extracción y purificación del plásmido	16
III.2.6.3.3. Obtención del inserto	16
III.2.6.4. Electroforesis desnaturante de ARN	17
III.2.6.5. Transferencia del ARN	18
III.2.6.6. Marcaje radiactivo de la sonda (PvLEA-14) con <sup>32</sup> P	19
III.2.6.7. Condiciones de hibridación	19
III.2.6.8. Autorradiografía	20
III.2.7. Western blot	20
III.2.7.1. Extracción de proteínas totales	20
III.2.7.2. Cuantificación de proteínas totales	21
III.2.7.3. Separación de proteínas por electroforesis	21
III.2.7.4. Electrottransferencia de proteínas	22
III.2.7.5. Inmunodetección de PvLEA-14	23

<b>IV. RESULTADOS</b>	
IV.1. Sistema de OSMA	24
IV.2. Parámetros fisiológicos y bioquímicos	25
IV.2.1. Contenido de humedad	25
IV.2.2. Uniformidad y velocidad de germinación	27
IV.2.3. Deterioro y revalorización	29
IV.2.4. Síntesis de ADN	30
IV.3. Cambios asociados al déficit hídrico	34
IV.3.1. Expresión de PvLEA-14	34
<b>V. DISCUSION</b>	37
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	41
<b>VII. APENDICE</b>	42
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	50

## ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscísico
DEPC	Diétil pirocarbonato
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Acido etilén diamino tetra acético
FCI	Solución de fenol cloroformo alcohol isoamílico
GPO	Germinación subsecuente al osmocondicionamiento
IPTG	Isopropil $\beta$ -D- tiogalactósido
LEA	Proteínas abundantes de embriogénesis tardía
MOPS	Acido 3 [N- morfolino] propano sulfónico
OSMA	Osmocondicionamiento
PEG	Polietilén-glicol
POP	2,5 difeniloxazol
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benceno
PSE	Solución de fosfatos, SDS y EDTA
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución de sales de sodio y citrato
STE	Amortiguador de Tris HCl, NaCl y EDTA
TAE	Solución de Tris acetatos
TCA	Acido tricloro-acético
TCES	Solución de Tris-HCl, NaCl, EDTA y SDS
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina
$\pi$	Potencial osmótico

## RESUMEN

En la presente investigación se establecieron las condiciones para osmocondicionar semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); se encontró que el potencial osmótico de  $-0.8$  MPa fue capaz de inhibir la germinación, cuando las semillas se incubaron en una solución de PEG-8000. Las semillas osmocondicionadas mostraron un incremento en su velocidad y uniformidad de germinación una vez que se removió el agente osmótico. Asimismo, el osmocondicionamiento fue capaz de revigorizar semillas de frijol deterioradas artificialmente. A nivel bioquímico, se encontró que los ejes embrionarios provenientes de semillas osmocondicionadas incorporaron ( $^3$ H) timidina a ADN en bajas cantidades durante el osmocondicionamiento; sin embargo, en la germinación subsecuente al osmocondicionamiento, la cinética de incorporación del precursor al ADN fue mucho mayor, por otra parte se observó que la actividad de la ADN polimerasa se incrementa notablemente a partir de las 6 horas de imbibición después del osmocondicionamiento, y parece mostrar una conducta cíclica, lo cual no sucede en las semillas control. Finalmente se determinó la expresión de PvLEA-14 (proteína de embriogénesis tardía) en respuesta al déficit hídrico generado durante el OSMA; la expresión de esta proteína y de su transcrito no fue inducida por el déficit hídrico generado durante el OSMA ( $-0.8$  MPa); sin embargo, los resultados sugieren que la expresión de la proteína PvLEA-14 se induce a  $-1.4$  MPa.

## I. INTRODUCCION

### I.1. GERMINACION

La germinación empieza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la iniciación de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula (Bewley y Black, 1994) ; este proceso incluye eventos como la hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, síntesis de macromoléculas, respiración y elongación celular. La combinación de estos eventos tiene como objetivo activar el crecimiento del embrión.

La germinación ha sido definida desde varios puntos de vista: el bioquímico que define a la germinación como la serie de eventos moleculares que anteceden y preparan la primera ronda de división celular (Meléndez López y Vázquez Rantos, 1991); el fisiológico que define a la germinación como la combinación de eventos que activan el crecimiento de un embrión deshidratado con un metabolismo casi nulo a un embrión con un metabolismo activo y vigoroso y que culmina en la protrusión de la radícula (Bewley y Black, 1994). La germinación en sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual es una consecuencia del término de la germinación. Estas definiciones no han sido aceptadas por los agrónomos, por lo que ellos definen a la germinación como los procesos de desarrollo y emergencia de aquellas estructuras provenientes del embrión, manifestando así la capacidad de las semillas para formar una plántula normal bajo condiciones favorables (ISTA, 1985).

Bajo condiciones óptimas, la entrada de agua a las semillas está caracterizada por tres fases (Bewley y Black, 1994). La fase I conocida como imbibición, es un proceso físico que

ocurre en las semillas viables y no viables, en esta fase el potencial de agua de la semilla es mucho menor que el de su entorno. En la fase II el potencial de agua de la semilla es igualado con el de su entorno, en ésta etapa ocurren muchos eventos metabólicos que preparan a la semilla para la emergencia de la radícula; en la fase III se presenta la protrusión radicular para dar origen al crecimiento de la plántula. La duración de cada fase depende de las propiedades inherentes ( tamaño, permeabilidad, etc. ) de las semillas.

### *1.1.1. Metabolismo de las semillas durante la germinación.*

*1.1.1.1. Respiración.* La respiración en las semillas secas es muy baja comparada con la respiración que se da durante el desarrollo y la germinación de éstas. La respiración sigue un patrón caracterizado por tres o cuatro fases (Bewley y Black, 1994): en la primera fase se incrementa el consumo de oxígeno, debido a la hidratación y activación de enzimas mitocondriales que funcionan en el ciclo del ácido cítrico y en el transporte de electrones; en la segunda fase el consumo de oxígeno se estabiliza debido posiblemente a que en este período puede haber una reducción en los procesos metabólicos de la germinación necesarios que preparan al embrión para el crecimiento celular; es en este momento cuando las semillas se han hidratado completamente y las enzimas preexistentes se han activado. Entre esta fase y la tercera fase es cuando emerge la radícula. La tercera fase se caracteriza por un nuevo incremento en el consumo de oxígeno, el cual es atribuido a un incremento de las mitocondrias y enzimas respiratorias; la última fase solo ocurre en tejidos de reserva.

El consumo de oxígeno está acoplado a la vez con la producción de ATP, que proporciona la energía necesaria para que se inicien otros procesos metabólicos de la germinación como síntesis de ADN, ARN y proteínas.

**1.1.1.2. Síntesis de ADN.** La síntesis de ADN es un evento que se inicia en tiempos tempranos de la germinación. Al respecto se ha reportado que existe síntesis temprana de ADN de tipo reparativo (Vázquez Ramos y Osborne, 1986), la cual tiene como fin sustituir al ADN dañado durante la maduración, deshidratación y almacenamiento de las semillas; en maíz esta síntesis temprana puede ser de tipo reparativo (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986), o de tipo organelar (Zlatanova *et al.*, 1987). La síntesis replicativa del ADN es un evento tardío que se inicia alrededor de las 14 horas, alcanzando su máximo valor a las 40 horas (Baiza *et al.*, 1989).

**1.1.1.3. Síntesis de ARN y proteínas.** La transición del desarrollo a la germinación necesita fundamentalmente de cambios en la expresión genética. Todos los estados de expresión de genes que codifican para proteínas de reserva y para enzimas que están involucradas en la síntesis de material de reserva durante la maduración de la semilla y otras actividades afines tienen que estar apagados, mientras que los genes que codifican para enzimas involucradas en la germinación, iniciación del crecimiento y la subsecuente movilización de reservas deben de ser activados (Beweley y Black, 1984). Asimismo, con la iniciación de la germinación se incrementa la demanda de proteínas esenciales para este evento. Al respecto, se ha reportado que en semillas de maíz, una vez que el metabolismo de la germinación se activa con la entrada de agua, ocurre síntesis de proteínas, la cual se incrementa en forma progresiva conforme avanza la germinación (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). La síntesis de proteínas, durante las primeras horas de germinación en semillas de maíz, pino y trigo se debe tanto a la presencia de ARNm preformados durante el desarrollo de las semillas, que son preservados durante la desecación y almacenamiento, como a transcritos sintetizados de novo (Spiegel *et al.*, 1975; Martín *et al.*, 1981; Datta *et al.*, 1983; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1984; Masumori *et al.*, 1992; y Bewley y Black, 1994 ); sin embargo, la función de los ARNm preformados es rápidamente

reemplazada por ARNm que se sintetizan de novo, estos nuevos mensajes pueden codificar para los mismos polipéptidos o para otros polipéptidos propios de la germinación (Caers *et al.*, 1979).

En un estado más avanzado de la germinación se inicia la división celular (Katterman y Hammett, 1975). Se ha demostrado en maíz que las células del mesocótilo son las primeras que sufren división celular, lo cual ocurre alrededor de las 28 horas de imbibición; posteriormente, la división celular también se presenta en raíces seminales a las 32 horas y en raíces primarias a las 36 horas de imbibición (Baiza *et al.*, 1986). Con la división celular se continúa la protrusión radicular que inicialmente puede ocurrir solo por elongación celular. Es en este momento cuando se desencadena la proliferación celular para iniciar el crecimiento del eje embrionario y dar origen al establecimiento de una nueva plántula.

El éxito de la germinación depende en gran medida de factores ambientales, tales como; humedad, oxígeno, luz y temperatura; sin embargo, si alguno de estos factores es alterado, sobre todo cuando hay bajo contenido de humedad, la germinación puede inhibirse parcialmente hasta que las semillas son liberadas del estrés hídrico (Hegarty, 1978). No obstante, el que pueda o no concluir la germinación dependerá del grado de avance que se haya alcanzado antes del déficit hídrico y la duración de éste. Lo anterior ha dado pie a postular un punto de regulación fisiológico de la germinación, antes del cual los procesos germinativos pueden suceder y no dañar la viabilidad de las semillas si éstos son interrumpidos por un déficit hídrico; sin embargo, si se rebasa dicho punto de regulación y se presenta un déficit hídrico, la germinación puede inhibirse parcialmente e inclusive puede haber una pérdida total de viabilidad en las semillas (Côme *et al.*, 1989).

La existencia de un punto de regulación en los procesos germinativos ha permitido desarrollar una serie de metodologías agrícolas por las cuales se regula la entrada del agua a las semillas para permitir que los procesos germinativos se inicien pero que no concluyan, sin afectar la viabilidad de las semillas, además de revigorizarlas. Dentro de estas técnicas se encuentra la del osmoacondicionamiento de semillas (Heydecker et al., 1973).

## 1.2. OSMOACONDICIONAMIENTO

El osmoacondicionamiento (OSMA) es un sistema que consiste en preinbibir semillas con un agente osmótico inerte como el polietilén-glicol, el cual genera un potencial hídrico que controla la hidratación de las semillas sin afectar su viabilidad, permitiendo que algunos eventos metabólicos se lleven a cabo sin que protruya la radícula; con esto se origina que al reestablecer las condiciones hídricas en las semillas, la protrusión radicular sea más rápida y uniforme que la de las semillas no osmoacondicionadas (Brocklehurst y Dearman, 1983). Otro beneficio obtenido durante el OSMA es que las semillas osmoacondicionadas al ser deshidratadas conservan en gran medida los beneficios ganados durante el tratamiento (Dearman et al., 1986).

Acercas de los eventos celulares que tienen lugar durante y después del OSMA, se ha propuesto que los procesos fisiológicos que ocurren en las semillas osmoacondicionadas son similares a los que ocurren durante la germinación temprana de las semillas, excepto por el bloqueo en la continuación de la germinación (Bewley y Black, 1985); al respecto se han evaluado los siguientes eventos bioquímicos:

*1.2.1. Síntesis de ADN.* Estudios realizados en embriones de poro (Bray *et al.*, 1989; Clarke y James, 1991) han demostrado que durante el osmoacondicionamiento no hay un incremento detectable en el contenido de ADN en tejido embrionario y endospermo de semillas de poro osmoacondicionadas por 14 días. Una situación similar se encontró en semillas osmoacondicionadas de tomate y maíz (Coolbear y Grierson, 1979; Cruz-García *et al.*, 1995); en ningún caso se detectó síntesis replicativa de ADN y los bajos niveles de síntesis de ADN encontrados durante el OSMA parecen deberse a la síntesis de ADN de tipo tanto reparativo como organelar (Ashraf y Bray, 1993; Cruz-García *et al.*, 1995); sin embargo, en otras investigaciones realizadas en semillas osmoacondicionadas de tomate y pimiento, se reporta que algunas células replican su ADN, particularmente las células de la raíz, aunque aparentemente estas células no entran a mitosis (Bino *et al.*, 1992; Lanteri *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha observado una rápida reanudación de la síntesis replicativa de ADN y división celular durante la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento de semillas de trigo y maíz (Dell' Aquila y Taranto, 1986; Cruz-García *et al.*, 1995)

*1.2.2. Síntesis de ARN.* El contenido de ARN en semillas de tomate, poro y maíz (Coolbear y Grierson, 1979; Bray *et al.*, 1989; Clarke y James, 1991; Cruz-García *et al.*, 1995) se incrementa al doble durante el período de osmoacondicionamiento en comparación con el ADN. Este incremento se debe en gran medida a la síntesis y acumulación de ARNr, el cual en semillas de poro contribuye con el 65% del ARN total al inicio del OSMA y en un 85% al final del OSMA; los niveles de ARNm se mantienen constantes en proporción al ARN total en embrión y endospermo de poro. Se ha detectado que el ARNr en semillas de poro de bajo vigor, se encuentra parcialmente degradado en los primeros días de OSMA; sin embargo, al final del OSMA (7-14 días) no hay evidencia de ARNr degradado, lo cual indica que durante el OSMA hay un recambio del ARNr dañado, lo cual genera un beneficio más para las semillas de bajo

vigor. Al igual que con el ADN, el contenido de ARN total en la germinación subsecuente al osmocondicionamiento es mayor que en las semillas no osmocondicionadas.

**1.2.3. Síntesis de proteínas.** La síntesis de proteínas en semillas osmocondicionadas es reiniciada minutos después de la hidratación de las semillas; en la primera fase de imbibición la síntesis de proteínas es un prerrequisito esencial para que las semillas logren los beneficios que les da este sistema y así la germinación se lleve a cabo con éxito (Cheung *et al.*, 1979; Hegarty, 1978). Se puede observar síntesis de proteínas en embriones y órganos de reserva de poro durante el OSMA (Davison y Bray, 1991); al igual que en semillas de maíz OSMA (Cruz-García *et al.*, 1995).

Estudios en semillas de chícharo (Dell'Aquila y Bewley, 1989) indican que todas las especies de proteínas sintetizadas durante el OSMA podrían estar asociadas con la germinación; sin embargo, durante el OSMA de semillas de poro hay síntesis de proteínas específicas que desaparecen durante la germinación subsecuente, las cuales posiblemente son inducidas por el déficit hídrico generado durante el OSMA (Davison y Bray, 1991). Con respecto a lo anterior, se ha reportado que algunas de estas proteínas sintetizadas durante el OSMA pertenecen a la familia de las LEAS (proteínas abundantes en la embriogénesis tardía).

### 1.3. PROTEINAS LEA

Uno de los cambios asociados con los eventos tardíos de la maduración de las semillas ortodoxas es la acumulación de proteínas de embriogénesis tardía (LEAS) (Galau *et al.*, 1986; Dure *et al.*, 1989). Las LEAS son proteínas hidrofílicas, ricas en glicina, altamente estables al

calor, algunas LEAS pueden ser inducibles en las semillas por desecación prematura o ácido abscísico (ABA) y en tejido vegetal de la planta en respuesta a déficit hídrico y ABA (Mundy y Chua, 1988; Skriver y Mundy, 1990; Bostock y Quatrano, 1992 ). Se sugiere que las proteínas LEAS juegan un papel de protección durante los procesos de desecación y rehidratación (Galau et al., 1987; Baker et al., 1988; Dure et al., 1989). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que las proteínas LEAS pueden efectivamente contribuir a la tolerancia a la desecación, pero no son suficientes para dar protección (Blackman et al., 1991).

Las LEAS han sido clasificadas en varios grupos de acuerdo a la similitud en sus secuencias de aminoácidos (Dure, 1993). Dentro del grupo 2 se encuentra la proteína PvLEA-14, proteína de frijol que se induce por estrés salino (Covarrubias, datos no publicados). Las proteínas de este grupo, conocidas también como dehidrinas, se caracterizan por tener una secuencia consenso de 15 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal. Se ha postulado que su función podría ser como el de una chaperona, o bien una proteína que ayude a preservar la estructura funcional de otras proteínas. Estas proteínas podrían ayudar a estabilizar proteínas citoplasmáticas o membranales para evitar posibles deformaciones generadas por una deshidratación.

De acuerdo a lo anterior estas proteínas resultan candidatos para utilizarse como marcadores moleculares de desecación en semillas sometidas a un déficit hídrico, como es el caso del OSMA.

## II. OBJETIVOS

- Establecer el sistema de osmocondicionamiento para semillas de frijol.
- Evaluar algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos durante el osmocondicionamiento y la germinación subsecuente de semillas de frijol.
- Estudiar la respuesta de una proteína tipo LEA al déficit hídrico generado durante el osmocondicionamiento, tanto a nivel transcripcional como traduccional.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### *III. 1. Material vegetal*

Semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*), variedad Negro Jamapa, con un porcentaje de germinación del 94%, donado por la Dra. Alejandra Covarrubias

La preparación de las soluciones utilizadas para la realización de los siguientes experimentos se mencionan en el apéndice.

#### *III. 2. Métodos*

##### *III. 2. 1. Osmocondicionamiento de semillas de frijol.*

El sistema de osmocondicionamiento (OSMA) se estableció embebiendo las semillas desinfectadas y protegidas con un fungicida (captán al 0.2%) con 40 ml de solución de PEG-8000 a las concentraciones mencionadas en el apéndice. La imbibición se llevó a cabo en cajas Petri que contenían discos de papel Whatman No. 3 MM y a una temperatura de 25°C por 3 y 7 días. Una vez determinado el potencial osmótico óptimo para el OSMA de semillas de frijol (-0.8 MPa), se osmocondicionaron semillas por diferentes días. Asimismo, se incubaron semillas con soluciones de PEG-8000 que generaron potenciales osmóticos de -0.9, -1.2 y -1.4 MPa.

### **III.2.2. Germinación de semillas.**

Las semillas después de ser osmoacondicionadas se lavaron y se pusieron a germinar a 25°C por diferentes tiempos, en papel absorbente sumergido previamente en agua. Lo mismo se realizó con semillas no osmoacondicionadas (control) y semillas incubadas a potenciales osmóticos más negativos (-0.9, -1.2, y -1.4 MPa).

La germinación se determinó como la protrusión radicular.

### **III.2.3. Contenido de humedad**

El contenido de humedad se determinó en semillas osmoacondicionadas (a -0.8 MPa) y en semillas incubadas a potenciales osmóticos más negativos (-1.2 y -1.4 MPa) por siete días, mediante la siguiente ecuación:

$$C.H. = [(Peso fresco - Peso seco) / (Peso fresco)] \times 100$$

El peso fresco es el peso que tienen las semillas al final del tratamiento.

El peso seco es el peso de las semillas obtenido después de ser deshidratadas a 80°C hasta peso constante.

### **III.2.4. Deterioro de semillas**

Las semillas de frijol previamente desinfectadas, se deterioraron por 4.5 horas a 54°C en una caja de plástico sellada herméticamente, la cual contenía 25 ml de agua, cuidando que las semillas no estuvieran en contacto con el agua. Posteriormente, una parte de las semillas deterioradas se puso a germinar y la otra parte se osmoacondicionó por 7 días.

La velocidad de germinación de dichas semillas se midió como índice de velocidad, utilizando la siguiente ecuación.

$$I.V.G. = \sum [\% \text{ de germinación} / \text{ tiempo de germinación}]$$

Donde % de germinación, es el porcentaje de germinación que tienen las semillas en los diferentes tiempos de germinación.

### **III.2.5. Síntesis de ADN**

La síntesis de ADN se evaluó indirectamente midiendo la incorporación de (<sup>3</sup>H) timidina al ADN, lo cual se realizó de la siguiente manera: a) capacidad sintética durante el OSMA: 10 ejes embrionarios de frijol (3 repeticiones) provenientes de semillas osmoacondicionadas por 1, 3 y 7 días, fueron incubados por un periodo de 3 horas con 100 µl de solución SAI que contiene PEG-8000 a un potencial osmótico de -0.8 MPa y 30 µCi/ml de (<sup>3</sup>H) timidina. b) actividad de ADN polimerasa: ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por 7 días y germinadas por 3, 6, 12, 24 y 36 horas se incubaron con la solución SAI sin PEG-8000, recibiendo pulsos de (<sup>3</sup>H) timidina 3 horas antes de concluir los tiempos arriba señalados, y c) síntesis continua: ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por 7 días se incubaron con la solución SAI con 30 µCi/ml de (<sup>3</sup>H) timidina, sin PEG-8000, por periodos continuos de 3, 6, 12, y 24 horas. Dichas incubaciones se realizaron a 25°C en un disco estéril de papel Whatman No. 3 MM colocado en una caja Petri estéril. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los ejes embrionarios dos veces con 5 ml de solución NET y se homogenizaron en un mortero a 4°C, agregando 1 ml de solución de lisis. Al homogenizado obtenido se le agregó 1 ml de ácido tricloro-acético (TCA) al 20% y se mantuvo en frío por 1 hora.

Para determinar la marca radiactiva incorporada al ADN, se filtró el precipitado de cada muestra a través de un filtro milipore (Whatman GF/A) y se realizaron los siguientes lavados:

dos con TCA al 5%, dos con TCA al 10% y dos con etanol al 90%. Los filtros se secaron a 50°C por 12 horas, pasado el tiempo de secado se colocaron en frascos viales los cuales contenían 5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad fue cuantificada en un contador de centelleo Beckman 2S 60001C.

### **III.2.6. Northern blot**

#### **III.2.6.1. Extracción y purificación de ARN**

Para la extracción de ARN se utilizaron ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por diferentes días, semillas osmoacondicionadas por 7 días, y germinadas a diferentes horas y semilla seca. Un gramo de ejes embrionarios se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en un mortero hasta formar un polvo fino. El polvo se pasó a un tubo Corex que contenía 5 ml de TCES, 5 ml de FCl y 25 µl de β mercapto-etanol; se realizó una centrifugación por 10 minutos a 2000 rpm. Se separó la fase acuosa y se hicieron cuatro extracciones (v/v), dos con FCl, una con trizol (reactivo de GIBCO) y una última con trizol más 50 µl de FCl. A la fase acuosa restante se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M pH=5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a -70°C por 15 minutos para precipitar el ARN. El ARN obtenido se lavó con etanol al 70% tres veces y se resuspendió en 50 µl de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

\*Es muy importante que el H<sub>2</sub>O utilizada para preparar las soluciones sea tratada con DEPC, para inactivar las RNAsas.

### **III.2.6.2. Evaluación de la integridad del ARN**

Para determinar la integridad del ARN se realizó una electroforesis nativa con un gel de agarosa al 1% , el cual contenía:

Agarosa.....	0.3 g
TAE 50X.....	0.6 ml
H <sub>2</sub> O-DEPC.....	29.4 ml
Bromuro de etidio.....	2.0 µl

Las muestras de ARN se prepararon mezclando la solución de ARN con amortiguador de carga A; se incubaron a 65°C por 5 minutos y en hielo por otros 5 minutos.

La electroforesis se realizó a 60 volts por 1 hora, utilizando TAE 1X como amortiguador de corrida.

Cada muestra de ARN fue cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm, teniendo como referencia que 1 unidad de densidad óptica equivale a 40 µg de ARN total. Además, se determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm; la relación DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> da una estimación de la pureza del ARN con respecto a cantidad de proteínas; valores entre 1.8 y 2 indican una muestra con un grado de pureza aceptable.

### **III.2.6.3. Preparación de la sonda de cDNA (PvLEA-14).**

#### **III.2.6.3.1. Reamplificación.**

La reamplificación del cDNA que codifica para PvLEA-14 se realizó transformando una suspensión de células competentes de *E. coli*; para ello a 100 µl de esta suspensión celular se le agregaron 2 µl de β mercapto-etanol y 1 µl del plásmido que contenía el cDNA para PvLEA-14 mezclándolos muy suavemente. Se realizaron las siguientes incubaciones: hielo por 30

segundos, a 42°C por 30 segundos y 2 minutos en hielo. Al término de las incubaciones se adicionaron 450 µl de medio SOC, volviendo a incubar por 1 hora a 37°C en agitación a una velocidad de 225 rpm.

Se plaquearon 50 µl de la suspensión celular ya transformada en una caja Petri con 20 ml de medio A, incubando a 37°C por 24 horas.

### ***III.2.6.3.2. Extracción y purificación del plásmido.***

La extracción y purificación del plásmido se realizó por el método de Mini-Prep (Sambrook, 1989). Una de las colonias obtenidas se resembró en 10 ml de medio Luria más ampicilina a una concentración de 50 µg/ml incubando a 37°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se realizó una centrifugación por 10 minutos a una velocidad de 4000 rpm. El precipitado obtenido fue resuspendido con 200 µl de solución 1. A ésta suspensión se le agregaron: 400 µl de solución 2 agitando manualmente y 300 µl de solución 3 agitando en vortex por 10 segundos e incubando 3 minutos en hielo. Después de la incubación se centrifugó a una velocidad de 12000 rpm, a 4°C por 5 minutos. A la fase acuosa remanente se le añadió 1/10 de volumen de acetato de sodio (3M pH=5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto incubando a -70°C por 15 minutos para precipitar el ADN plasmídico. El ADN obtenido se lavó con etanol 70% tres veces, se resuspendió en 20 µl de agua y se eliminó el ARN degradándolo con RNasa.

### ***III.2.6.3.3. Obtención del inserto (cDNA que codifica para PvLEA-14).***

Obtención del inserto. El ADN plasmídico se cortó con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III (enzimas comerciales de GIBCO). Cada enzima se utilizó a una concentración de 20 U con 2.3 µl de amortiguador de reacción; ambas enzimas se incubaron por separado 2 horas a

37°C, al término de cada incubación se realizó la extracción de la enzima con FCI (V/V). Con la muestra de ADN plasmídico cortado se efectuó una electroforesis con objeto de verificar la presencia del inserto.

#### III.2.6.4. Electroforesis desnaturizante de ARN.

Se hizo un gel de agarosa al 1.2%, el cual contenía:

Agarosa.....	1.2g
Formaldehído.....	17.85ml
MOPS 5X.....	19.64ml
H <sub>2</sub> O-DEPC.....	62.5ml
Bromuro de etidio.....	4.0µl

Las muestras de ARN fueron preparadas mezclando lo siguiente:

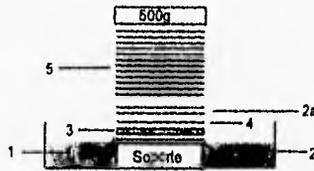
ARN (20µg).....	6.0µl
Formaldehído.....	4.6µl
Formamida.....	13.3µl
MOPS 5X.....	2.6µl
Amortiguador de carga B.....	2.0µl

Se incubaron a 65°C por 15 minutos y en hielo 5 minutos.

La electroforesis se realizó a 80 volts por 7 horas , utilizando MOPS 1X como amortiguador de corrida.

### III.2.6.5. Transferencia del ARN.

EL ARN en el gel desnaturalizante se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente, para ello se instaló la cámara de transferencia de la siguiente manera:



1.- Amortiguador de transferencia (SSC 10X)

2.- Papel Whatman de 3 MM, sumergido previamente en solución de SSC 10X

2a.- Papel Whatman de 3 MM, sumergido previamente en solución de SSC 2X

3.-Gel

4.-Membrana de nylon

5.-Papel absorbente

Al colocar las capas de papel, el gel y la membrana se evitó la formación de burbujas. La transferencia se hizo por 48 horas.

La membrana se expuso a 0.12 julios de luz de 254nm (U.V.) para fijación del ARN.

### III.2.6.6. Marcate radiactivo de la sonda (PvLEA-14) con $^{32}\text{P}$

50 ng del ADN correspondiente a PvLEA-14 se desnaturalizaron a 100°C por 5 minutos y 5 minutos en hielo. La sonda desnaturalizada fue marcada por el método de Random Primer (un equipo comercial de NEN); para lo cual se le adicionó lo siguiente:

Amortiguador de reacción.....	6 $\mu\text{l}$
dNTP's (excepto dCTP).....	6 $\mu\text{l}$
$\alpha$ $^{32}\text{P}$ -dCTP.....	30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O-DEPC (aforar a).....	30 $\mu\text{l}$
Fragmento Klenow de la DNA pol I ( <u>E. coli</u> ).....	1 $\mu\text{l}$

Se incubó por 2 horas a 37°C. Concluido el tiempo se adicionaron 8  $\mu\text{l}$  de EDTA 250 mM y 160  $\mu\text{l}$  de STE. Posteriormente, se pasó por una columna de sephadex G-50 pH=7 a 3000 rpm por 4 minutos. Se tomó 1  $\mu\text{l}$  de la sonda antes y después de pasar por la columna para determinar el porcentaje de incorporación de  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP.

### III.2.6.7. Condiciones de hibridación.

La membrana de nylon se prehibridó en tubos especiales para hibridación a 65°C por 2 horas con 5 ml de solución PSE. Con la misma solución se llevó acabo la hibridación adicionando la sonda previamente marcada. La hibridación se realizó por 24 horas, a la misma temperatura que la prehibridación.

Después de la hibridación, la membrana se lavó de la siguiente forma:

1.-30 minutos a temperatura ambiente con 50 ml. de la solución de SSC 2X y 0.1% de SDS.

2.-30 minutos a 65°C con 50 ml de la solución de SSC 2X y 0.1% de SDS.

3.-30 minutos a 65°C con 50 ml de la solución de SSC 0.2X y 0.1% de SDS.

### **III.2.6.8.-Autorradigrafía.**

Después de los lavados, la membrana se expuso a una película de rayos X en un cassette por 5 días a -70°C. Pasado este tiempo se reveló sumergiéndola en solución reveladora por 5 minutos, posteriormente se lavó con abundante agua y por último fue sumergida en solución fijadora por otros 5 minutos.

## **III.2.7. Western blot.**

### **III.2.7.1. Extracción de proteínas totales.**

Para la extracción de proteína total se utilizaron ejes embrionarios de semillas seca, semillas osmoacondicionadas por diferentes días, semillas osmoacondicionadas y germinadas por diferentes horas y semillas incubadas con soluciones de PEG que generan potenciales osmóticos más negativos (-1.0 MPa. a -1.4 MPa.). Primero se homogenaron 15 ejes embrionarios en un mortero a 4°C con 1 ml de solución de extracción, las muestras obtenidas de cada tratamiento se centrifugaron a 100 000 rpm por 1 hora a 4°C. Se separó el sobrenadante en el cual estaban disueltas las proteínas y se almacenaron a -70°C.

### ***III.2.7.2. Cuantificación de proteínas totales.***

Las muestras de proteínas fueron cuantificadas espectrofotométricamente a 595 nm; para ello se tomaron 3 µl de cada muestra a los que se les agregó 1 ml de solución de Bradford y 50 µl de NaOH 1N. Al mismo tiempo se preparó una curva patrón con albúmina para determinar la cantidad de proteína obtenida de cada muestra.

### ***III.2.7.3. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante con SDS.***

Para realizar la electroforesis se prepararon dos geles de acrilamida al 13%, los cuales contenían lo siguiente: 1 ml del gel sellador, 9 ml del gel separador y 3 ml del gel apilador.

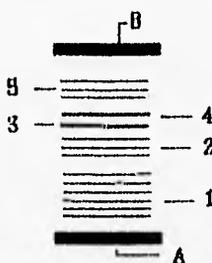
Una vez realizado el gel, se procedió a preparar las muestras de proteínas para lo cual en un tubo eppendorf se colocaron 5 µg de proteína y agua destilada hasta completar 5 µl, y 3 µl de amortiguador de carga para proteínas; esto se realizó para cada una de las muestras obtenidas. Estas muestras se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos e inmediatamente se incubaron en hielo por 2 minutos.

La solución de electrodos se utilizó como amortiguador de corrida a una concentración de 1X. El gel se corrió a 80 mA por 2 horas.

Pasado el tiempo de corrida uno de los geles fue teñido con azul de coomassie y el otro gel se utilizó para realizar la transferencia.

### III.2.7.4. Electrotransferencia de proteínas.

Las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de inmovilón, para ello se instaló el aparato de electrotransferencia de la siguiente manera:



A.- Anodo

B.- Cátodo

1.- 6 papeles Whatman de 3 MM, sumergidos previamente en solución anódica I.

2.- 3 papeles Whatman de 3 MM, sumergido previamente en solución anódica II.

3.-Membrana de inmovilón, sumergida brevemente en metanol absoluto, y posteriormente en agua e incubada por 10 minutos en solución anódica II.

4.-Gel previamente equilibrado por 30 minutos en solución anódica II.

5.- 3 papeles Whatman de 3 MM, sumergido previamente en solución catódica III.

La transferencia se realizó por 1 hora a 75 mA. Transcurrido el tiempo, se secó la membrana con papel absorbente y se guardó para realizar la inmunodetección.

### **III.2.7.5. Inmunodetección de PVLEA-14.**

Para realizar la inmunodetección se incubó la membrana de inmobilón con 10 ml de solución de bloqueo por 2 horas a 37°C, posteriormente se incubó por 12 horas a 4°C con 6 ml de solución de bloqueo nueva más el anticuerpo anti PVLEA-14 (anticuerpo proporcionado por el departamento de Biol. Mol. de plantas del IBT) a una dilución de 1:2500. Después de la incubación con el primer anticuerpo, se lavó la membrana dos veces con PBS 1X a intervalos de 15 minutos y una vez con PBS 1X más 0.5M de NaCl también por 15 minutos. Por último se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con 6 ml de solución de bloqueo más el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (anticuerpo comercial de GIBCO) a una dilución de 1:2500 y se lavó tres veces con PBS 1X a intervalos de 15 minutos.

La detección de la proteína PVLEA-14 se realizó utilizando como sustrato un equipo comercial de quimioluminiscencia de Amersham, en el cual se incubó la membrana en oscuridad por 30 segundos para después exponerla a una película de rayos X por 1 minuto para su posterior revelado.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Sistema de OSMA

Para establecer el sistema de OSMA para semillas de frijol, se evaluaron diferentes potenciales osmóticos ( $\pi$ ), utilizando soluciones de polietilén-glicol (PEG), las cuales generaron potenciales de -0.6, -0.7, -0.8, -0.9, -1.2 y -1.4 MPa, de acuerdo con la ecuación de Michael y Kaufman (1973).

Para que una población de semillas se considere osmoacondicionada, debe cumplir con los siguientes requisitos: a) las semillas durante el proceso de OSMA no deben presentar emergencia de radícula durante el proceso, b) que el sistema de OSMA no provoque pérdida de viabilidad y c) la germinación subsecuente de estas semillas debe ser más rápida y uniforme que la de las semillas sin OSMA (control).

Las semillas incubadas en soluciones con potenciales osmóticos de -0.6 y -0.7 MPa, presentaron emergencia de radícula a los tres días del tratamiento, mientras que las semillas embebidas en soluciones con  $\pi$  de -1.2 y -1.4, presentaron una caída en la viabilidad de casi 40% al terminar el período del tratamiento. Por otra parte, las semillas incubadas a un  $\pi$  de -0.8 MPa, no mostraron ni emergencia radicular, ni pérdida de viabilidad durante ni al final del tratamiento, por lo que se eligió este potencial osmótico como el óptimo para osmoacondicionar semillas de frijol (cuadro 1).

Potencial osmótico (MPa.)	% de germinación subsecuente al OSMA	
	Tres días de OSMA	Siete días de OSMA
-0.6	*	*
-0.7	*	*
-0.8	91.11% ± 0.6	86.60% ± 2.6
-0.9	71.11% ± 2.5	73.30% ± 1.0
-1.2	60.00% ± 0.0	66.66% ± 0.0
-1.4	73.00% ± 1.4	60.00% ± 2.8
Control	94.40 ± 7.9	

Cuadro 1. Porcentaje de germinación que presentaron las semillas de frijol a las 60 horas después de ser incubadas a diferentes potenciales osmóticos por tres y siete días.

(\*) Semillas que presentaron germinación durante el OSMA

(±) Representa el error estándar de tres repeticiones

Por lo anterior, las semillas osmoacondionadas que cumplen con los requisitos mencionados son las semillas que se incubaron a un  $\pi$  de -0.8 MPa.

## IV.2. Parámetros fisiológicos y bioquímicos

**IV.2.1. Contenido de humedad.** Cuando las semillas son embebidas en soluciones de PEG, el proceso germinativo inicia, pero no concluye con la emergencia de la radícula, debido probablemente a que la actividad metabólica que se desencadena durante el tratamiento se ve limitada por la insuficiente cantidad de agua que logra entrar a la semilla durante el OSMA. Con la idea de determinar el porcentaje de humedad que logran obtener las semillas durante el OSMA y en la germinación subsecuente, se determinaron los contenidos de humedad que alcanzan las semillas incubadas en soluciones con diferentes potenciales osmóticos (-0.8, -1.2,

-1.4 MPa). Una vez que termina el tratamiento, las semillas han alcanzado un contenido de humedad de alrededor del 35%, comparada con el 12% que tienen las semillas deshidratadas (fig. 1). Como se puede ver en esta figura, solo basta un aumento de aproximadamente un 5% respecto al contenido de humedad logrado durante el OSMA para que se presente la emergencia de la radícula; en el caso de las semillas incubadas a -0.8 MPa, la protrusión radicular inicia alrededor de las 12 horas de germinación subsecuente, mientras que para los potenciales más negativos esto sucedió a las 24 horas y a las 36 horas en las semillas control.

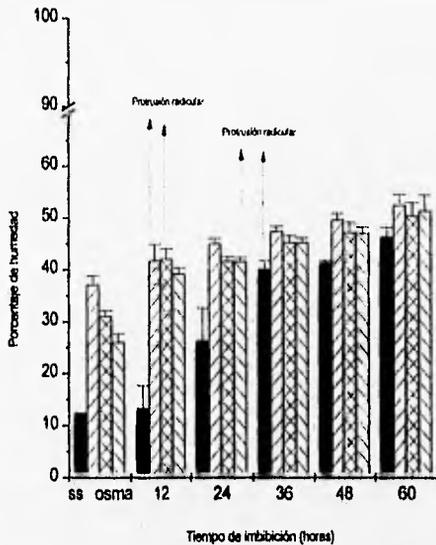


Figura 1. Cinéticas de imbibición de semillas incubadas por siete días a diferentes potenciales osmóticos (osma).

-0.8 MPa [▨]; -1.2 MPa [▩]; -1.4 MPa [▧]  
y semillas control (ss) [■]

**IV.2.2. Uniformidad y velocidad de germinación.** Una vez elegido el  $\pi$  de  $-0.8$  MPa para osmoacondicionar semillas, se evaluó la velocidad y uniformidad de la germinación subsecuente. En la figura 2 se presentan las cinéticas de germinación de las semillas OSMA por tres y siete días. Ambas cinéticas de germinación señalan que a las 12 horas de imbibición han germinado alrededor del 46% de las semillas OSMA, alcanzando cerca del 80% a las 24 horas, lo cual indica que este porcentaje de la población se ha homogenizado mediante el OSMA; dicha homogenización se presenta en las semillas control después de las 40 horas. Los beneficios logrados durante el OSMA deben ser conservados si las semillas son re-deshidratadas para ser almacenadas, por lo que se evaluó la capacidad de las semillas osmoacondicionadas para preservar tales beneficios. Cuando se deshidratan las semillas osmoacondicionadas hasta el contenido de humedad original (12%) y son rehidratadas para su germinación, éstas empiezan a germinar nuevamente a las 12 horas de imbibición como las semillas osmoacondicionadas, y puestas a germinar inmediatamente (Fig. 3). Sin embargo, la velocidad de germinación se reduce en comparación con las semillas osmoacondicionadas húmedas, pero mantienen una mayor velocidad que las semillas control, demostrando así que los beneficios ganados durante el OSMA son conservados aun cuando las semillas sean deshidratado.

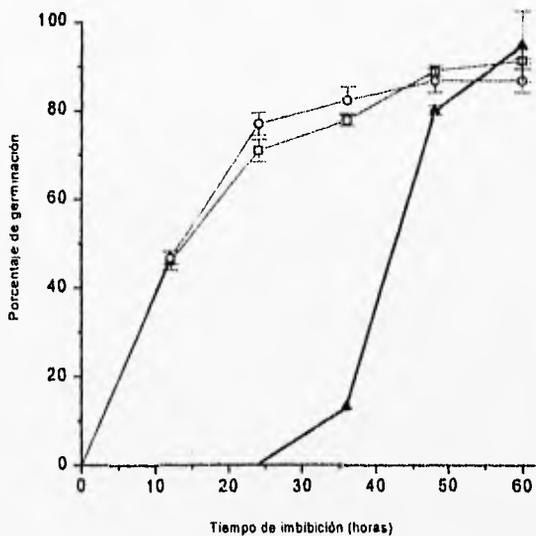


Figura 2. Cinética de germinación de semillas de frijol osmocondicionadas por tres días (—□—); por siete días (—○—) y semillas control (—▲—). Las barras verticales indican el error estándar del promedio de tres repeticiones

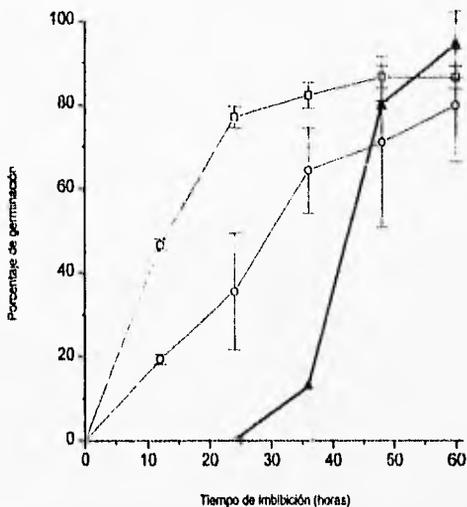


Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas osmocondicionadas por siete días y puestas a germinar inmediatamente (---○---); osmocondicionadas siete días, deshidratadas hasta 12% de contenido de humedad y puestas a germinar (-.-○.-) y semillas control (-▲-). Las barras verticales indican el error estándar del promedio de tres repeticiones

**IV.2.3. Deterioro y revigorización** Con el propósito de determinar si durante el OSMA ocurren procesos que permiten revigorizar semillas de bajo vigor, se osmocondicionaron semillas previamente deterioradas. Como se puede observar en la figura 4, las semillas deterioradas tiene un índice de velocidad de germinación menor que las semillas control; sin embargo, cuando éstas semillas se osmocondicionaron, su índice de velocidad de germinación fue mayor. Lo anterior indica que durante el OSMA ocurren procesos de reparación, que permiten la revigorización de las semillas.

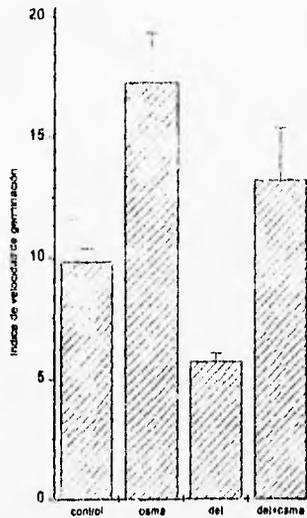


Figura 4. índice de germinación de semillas no OSMA (control), semillas OSMA por siete días (osma), semillas deterioradas (del) y semillas deterioradas y OSMA (del-osma).

**IV.2.4. Síntesis de ADN.** Para estudiar la capacidad metabólica durante el OSMA y la germinación subsecuente, se evaluó la capacidad de síntesis de ADN a través de la incorporación de  $(^3\text{H})$  timidina. Dando pulsos de 3 horas con el precursor, los ejes embrionarios provenientes de semillas con diferentes días de OSMA, mostraron una incorporación del radioisótopo al ADN a un nivel bajo. No obstante, conforme transcurren los días del tratamiento, existe una ligera tendencia a aumentar su capacidad de incorporación (Fig. 5). La determinación de la capacidad de sintetizar ADN durante la germinación posterior se hizo de dos formas: a) con marca continua (síntesis de ADN), o con pulsos de 3 horas, para medir indirectamente la actividad de polimerasa a los tiempos estudiados. Cuando se liberan las semillas del estrés y se ponen a germinar bajo condiciones óptimas de humedad en presencia continua de  $(^3\text{H})$  timidina, empiezan a incorporar el precursor al ADN con una

velocidad mayor que la de los ejes de semillas control. Alrededor de las 12 horas de imbibición, las células de los ejes de semillas osmoacondicionadas han triplicado la cantidad de incorporación al ADN con respecto al control, mientras que para los ejes de las semillas control esto ocurre después de las 20 horas (Fig. 6).

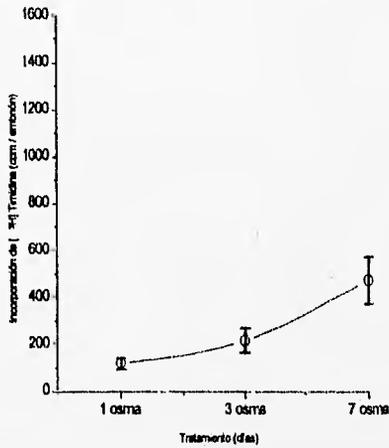


Figura 5. Capacidad de síntesis de ADN durante el osmoacondicionamiento (—○—). Las barras verticales indican el error estándar del promedio de tres repeticiones.

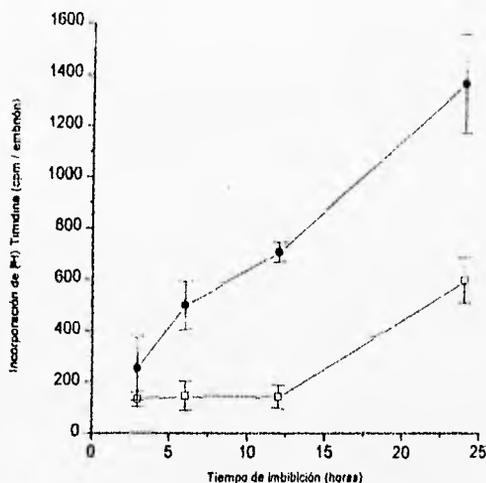


Figura 6. Síntesis de ADN durante la germinación subsecuente al OSMA (—●—) y semillas control (—□—). Las barras verticales indican el error estándar del promedio de tres repeticiones.

El incremento en la velocidad de germinación de las semillas osmocondicionadas, depende en gran medida de la reactivación de los procesos proliferativos que desencadenan el crecimiento vegetal, suspendido durante la embriogénesis, por lo que resultó importante evaluar, a través de la medición de la actividad de polimerasa, en qué momento de la germinación subsecuente podría iniciar la replicación, como una manera indirecta de evaluar la entrada a ciclo celular de las células del eje embrionario, para lo cual se dieron pulsos de 3 horas con  $^3\text{H}$  timidina a los tiempos indicados. Los resultados se muestran en la figura 7, en donde se observa que entre las 6 horas y las 12 horas hay un pico de actividad, y se vuelve a incrementar a las 24 horas de germinación subsecuente siguiendo una conducta relativamente cíclica, mientras que en las semillas no osmocondicionadas la incorporación máxima se

observa a las 24 horas de imbibición; sin embargo, es menor que la que se presenta en los experimentos de germinación subsecuente. Resultados semejantes se han observado en semillas se maíz tanto osinocondicionadas como estimuladas a germinar (Cruz-García *et al.*, 1995; Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995)

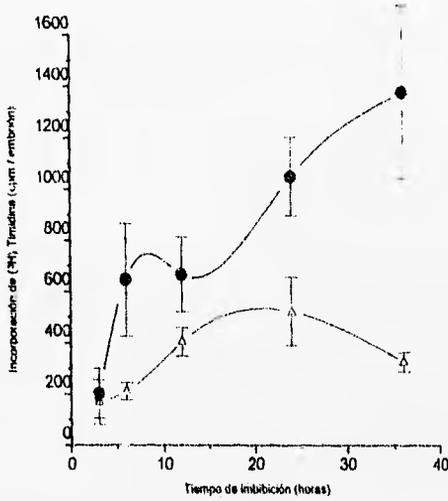


Figura 7. Actividad de ADN polimerasa durante la germinación subsecuente al OSMA [-●-] y semillas control [-△-]. Las barras verticales indican el error estándar de tres repeticiones.

### IV.3. Cambios asociados al déficit hídrico

**IV.3.1. Expresión de PvLEA-14** Con el propósito de determinar si existen cambios en la expresión genética de las semillas en respuesta al déficit hídrico generado por el OSMA, se evaluó la expresión de una proteína tipo LEA utilizada como marcador molecular de maduración de semillas, en especial la expresión durante el OSMA y la germinación subsecuente de PvLEA-14. La evaluación se realizó a nivel transcripcional mediante ensayos tipo Northern-blot y a nivel traduccional por ensayos tipo Western-blot; en ambos experimentos, la cantidad tanto de ARN como de proteínas cargadas en cada carril fue igual. Los resultados (fig. 8) indican que el mensaje se encuentra presente en semillas secas en una cantidad considerable (carril 1); sin embargo, la cantidad de este ARNm disminuye drásticamente durante el tratamiento de osmocondicionamiento hasta casi desaparecer a los 7 días (carril 4). Lo mismo sucede con respecto a la proteína, la que casi desaparece a los 7 días de OSMA (fig. 9 a, carril 1). Durante la germinación subsecuente, cuando las semillas son colocadas bajo condiciones óptimas de humedad, el mensaje desaparece casi totalmente a las 15 horas de germinación (Fig. 8, carril 6), mientras que la proteína se degrada hasta niveles no detectables a las 24 horas (figs. 9 b, carril 5). De acuerdo con los resultados anteriores, se puede concluir que el déficit hídrico generado por el OSMA no fue suficiente para inducir la expresión de PvLEA-14 a nivel de ARNm ni de su proteína, por lo que se decidió evaluar si potenciales osmóticos más negativos (-1.0, -1.2 y -1.4 MPa) eran capaces de estimular la expresión de PvLEA-14, a nivel traduccional. La figura 9 b muestra el resultado de este experimento. Se observa que potenciales de -1.0 y -1.2 MPa (carriles 6 y 7 respectivamente) no son capaces de incrementar el nivel de PvLEA-14 por arriba del mostrado en las semillas secas. Sin embargo, a -1.4 MPa si se observa un incremento significativo.

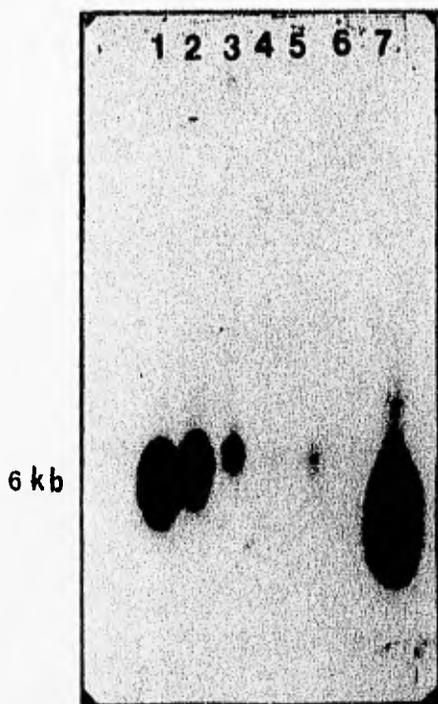
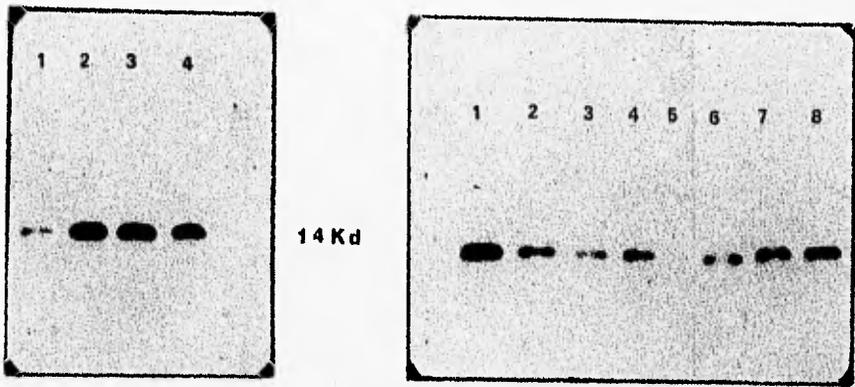


Figura 8. Estudio por Northern-blot de la expresión del gen PvLEA-14 en semillas de frijol durante el osmoacondicionamiento (OSMA) y la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento (GSO) Carril 1: semilla seca; 2: 1 día de OSMA; 3: 4 días de OSMA; 4: 7 días de OSMA; 5: 5 horas de GSO; 6: 15 horas de GSO y 7: control positivo ( cDNA de PvLEA-14).



9 a. Evaluación por Western-blot de la cantidad de proteína PvLEA-14 en semillas de frijol durante el OSMA y la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento (GSO). Carril 1: 7 días de OSMA; 2: semilla seca; 3: 1 día de OSMA y 4: 4 días de OSMA.

9 b. Evaluación de la cantidad de proteína en la germinación subsecuente y en semillas incubadas a diferentes potenciales osmóticos. Carril 1: semilla seca; 2: 7 días de OSMA; carriles 3, 4 y 5: 3, 12 y 24 horas de GSO respectivamente; carriles 6, 7 y 8: semillas incubadas a potenciales osmóticos de -1.0, -1.2 y -1.4 MPa respectivamente.

## V. DISCUSION

Las condiciones óptimas para osmoacondicionar semillas son específicas de especie (Bray, 1995), por lo que las semillas de cada especie se osmoacondicionan a un potencial osmótico ( $\pi$ ) diferente. En el caso de semillas de frijol se encontró que el  $\pi$  óptimo fue de  $-0.8$  MPa, ya que a  $\pi$  mayores ( $-0.7$  MPa) las semillas presentaron emergencia radicular durante el tratamiento, en tanto que en los  $\pi$  más negativos ( $-0.9$ ,  $-1.2$  y  $-1.4$  MPa) las semillas perdieron viabilidad. Las diferencias en cuanto a contenido de agua libre que hay entre estas tres soluciones no son muy grandes, como se detectó cuando se evaluaron los contenidos de humedad en las semillas osmoacondicionadas (medidos como la diferencia entre el peso seco y el peso fresco de las semillas), las cuales no variaron mucho respecto a los que presentaron las semillas incubadas a  $\pi$  menores; sin embargo, en las semillas osmoacondicionadas solo se requiere alrededor de un 5 % más de humedad para que se presente la protrusión radicular, lo que indica que las semillas osmoacondicionadas quedan detenidas en un punto muy cercano al punto donde se desencadenan los procesos que inducen a la germinación sensu stricto que reactivan el crecimiento vegetal durante la germinación. En este punto los procesos son inhibidos sin que se afecte la viabilidad de las semillas, lo que no sucede con las semillas incubadas en potenciales osmóticos más negativos (Tab. 1).

Se ha reportado que el osmoacondicionamiento permite que en las semillas los procesos germinativos queden detenidos en un mismo punto, por lo que al liberarlas del estrés para permitir que se desencadene la germinación, las semillas germinan más rápida y uniformemente que las semillas no osmoacondicionadas (Brockdehurst y Dearman, 1983). Lo anterior se presenta también en semillas de frijol, en donde se observa un adelanto en la germinación de aproximadamente 12 horas, con respecto a las semillas control (fig. 2).

Se ha postulado, que durante el OSMA se llevan a cabo procesos de reparación de ADN, reorganización de membranas, etc (Woodstock y Tao, 1981). Lo anterior pudo comprobarse de manera indirecta cuando se deterioraron semillas de frijol, las cuales después del tratamiento de envejecimiento artificial, presentaron un índice de germinación bajo; sin embargo, cuando las semillas deterioradas fueron osmoacondicionadas recuperaron el vigor incluso ligeramente por arriba del control (Fig. 4).

Otro aspecto interesante es el hecho de que las semillas osmoacondicionadas conservan los beneficios aún después de ser deshidratadas (Fig.3), lo que a la vez comprueba que los procesos germinativos iniciados durante el OSMA se mantienen en un punto donde no se compromete la viabilidad de las semillas.

Los estudios realizados sobre el metabolismo que presentan las semillas durante el OSMA, han sugerido que existe síntesis de ADN tanto de tipo reparativo como organelar (Ashraf y Bray, 1993; Cruz-García, *et al.*, 1995). En frijol se encontró que la síntesis de ADN durante el OSMA, medida indirectamente como la capacidad que tienen los ejes embrionarios de incorporar ( $^3\text{H}$ ) timidina al ADN, aumenta ligeramente conforme pasa el tiempo del tratamiento; sin embargo, es menor que en la germinación subsecuente (Fig. 5). Lo anterior sugiere que la síntesis de ADN encontrado durante el OSMA podría ser de tipo organelar y/o reparativo, lo que a su vez permitiría la revigorización de las semillas deterioradas (Fig. 4), junto con otros eventos metabólicos que permitieran a las semillas sobreponerse a los daños acumulados durante el almacenamiento.

Se podría especular que el punto de detención de la germinación durante el OSMA se relaciona con la entrada a ciclo celular, ya que no existe evidencia de que la fase de replicación del ADN se active, aún después de varios días de OSMA de semillas. En este sentido, es consecuente el que la síntesis de ADN se estimule notablemente durante la germinación subsecuente al OSMA. En la germinación subsecuente, las semillas OSMA tienen una mayor capacidad de síntesis de ADN que las semillas no osmoacondicionadas en los mismos tiempos de imbibición, lo que podría sugerir que el OSMA provocó que las células de los meristemas entraran a ciclo celular de manera más rápida y uniforme que las células de los ejes de las semillas control, lo cual se refleja en la velocidad de germinación de semillas OSMA (Fig 2).

Se ha reportado que en semillas de maíz la síntesis de ADN de tipo replicativo se inicia entre las 12 y 15 horas de germinación y que esto ocurre mucho antes si las semillas son osmoacondicionadas (Baíza, *et al.*, 1989; Cruz-García *et al.*, 1995); en el caso de frijol, el experimento en que se estudió la actividad de ADN polimerasa nos indica que la mayor capacidad de incorporación de (<sup>3</sup>H) timidina ocurre a las 24 horas de germinación normal; en cambio, en las semillas osmoacondicionadas existe un pico de incorporación entre las 6 y las 12 horas de germinación subsecuente, por lo que se podría sugerir que en este tiempo ya existe replicación del ADN que dará origen a una primera ronda de proliferación celular. Ya que la capacidad sintética es siempre mayor durante la germinación de semillas osmoacondicionadas que en las control, esto explicaría la mayor velocidad de germinación y crecimiento que muestran estas semillas.

El bloqueo de los procesos germinativos dado por la solución osmótica, se debe al déficit hídrico generado por esta solución. Se ha reportado en semillas de poro que el patrón genético es alterado durante el OSMA en respuesta al déficit hídrico (Davison y Bray, 1991); asimismo, en semillas de maíz el déficit hídrico induce la expresión de proteínas tipo dehidrinas pertenecientes a la familia LEA (Cruz-García, datos no reportados). Por lo anterior resultó interesante evaluar la

expresión de una proteína tipo LEA (PVLEA-14), propia del estado de maduración de semillas y determinar si el estado en que se encuentran las semillas osmoacondicionadas es similar al estado que alcanzan las semillas durante la embriogénesis tardía. La expresión de esta proteína y de su transcrito no fue inducida por el déficit hídrico generado durante el OSMA (-0.8 MPa), lo que indica que dicho estrés hídrico no es suficiente para inducir su expresión por lo que la función de esta proteína no sería importante durante el OSMA; además, como el patrón de expresión de la proteína y su mensaje son muy similares, se puede inferir que su regulación podría ser a ambos niveles transcripcional y traduccional. La cantidad de la proteína PVLEA-14 en semillas incubadas por 7 días a potenciales de -1.4 MPa fue mayor, respecto a la que se encuentra en semillas osmoacondicionadas a -0.8 MPa, por el mismo tiempo. Esto puede estar sugiriendo ya sea que la proteína no se degrada tan rápido bajo estas condiciones, o que existe una constante síntesis de novo promovida por el déficit hídrico generado por la solución osmótica.

Finalmente, el estudio de la conducta de otros genes propio de la maduración de semillas durante el periodo de OSMA, nos dará evidencia del estado fisiológico que representa el OSMA para las semillas.

## VI. CONCLUSIONES

El potencial osmótico óptimo para osmoacondicionar semillas de frijol fue de  $-0.8$  MPa.

Las semillas osmoacondicionadas presentaron mayor vigor en términos de velocidad y uniformidad de germinación que las control.

La actividad metabólica de las semillas osmoacondicionadas, en la germinación subsecuente, fue superior a la de las semillas sin osmoacondicionar.

El potencial osmótico de  $-0.8$  MPa no fue capaz de inducir la expresión de la proteína PvLEA-14, lo que sí parece ocurrir a  $-1.4$  MPa, por lo que se reitera que PvLEA-14 es inducida por un estrés hídrico severo.

## VII. APENDICE

### Soluciones:

#### -Osmocondicionamiento

##### a).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -0.7MPa

PEG (8000).....243.4853 g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

##### b).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -0.8MPa

PEG (8000).....261.9476 g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

##### c).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -0.9MPa

PEG (8000).....279.2969g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

##### d).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -1.0MPa

PEG (8000).....295.7131 g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

##### e).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -1.2MPa

PEG (8000).....326.2605g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

##### f).-Solución de Polietilén-glicol (PEG) -1.4MPa

PEG (8000).....354.3651g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

#### -Síntesis de ADN

##### a).-Solución amortiguadora de inhibición (SAI) pH=7.6

KCl.....0.05M

MgCl<sub>2</sub>.....0.01M

Tris-HCl.....0.05M

Sacarosa.....2%

Timidina 3H.....20µl

b).-Solución de NET pH=7.8

NaCl.....0.3M

EDTA.....0.1M

Tris. HCl.....0.01µM

Timidina.....0.04mM/ml

c).-Solución amortiguadora de lisis. (pH=7.5)

NaCl.....0.15M

EDTA.....0.1M

SDS.....0.5%

d).- Solución de lavado

TCA.....20%

Timidina.....40µg/ml

e).-Líquido de centelleo

1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benceno (POPOP).....0.1g

2,5 difeniloxazol (POP).....0.5g

Tolueno.....1000ml

-Extracción y purificación de ARN

a).-Solución de TCES (pH=8)

Tris .....0.2M

NaCl.....0.2M

EDTA.....50mM

SDS.....2%

b). -Solución de FCI

Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico(25:24:1)

c). -H<sub>2</sub>O-DEPC

DEPC..... 1ml

H<sub>2</sub>O..... 1000ml

d). -Sol. de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na 3M (pH=5.2)

C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na.....246.09g

H<sub>2</sub>O..... 1000ml

-Evaluación de la integridad del ARN

a). -TAE 50X

Tris-acetato.....0.04M

EDTA (pH=8).....0.01M

Acido acético glacial.....57.1ml

b). -Amortiguador de carga A

Glicerol.....50%

TAE..... IX

Azul de Bromofenol.....0.25%

Xilen Cianol.....0.25%

c). -Solución concentrada de bromuro de etidio 10mg/ml de H<sub>2</sub>O

-Reamplificación

a). -Medio SOC

Glucosa.....20mM

Medio Luria.....5ml

b). -Medio A

Ampicilina.....50µg/ml

X-Gal e IPTG.....	50µg/ml
Agar Luria.....	1000ml
<b>-Extracción y purificación del plásmido</b>	
<b>a).-Solución 1 (4°C)</b>	
Glucosa.....	50mM
Tris-HCl (pH=8).....	25mM
EDTA (pH=8).....	10mM
<b>b).-Solución 2 (25°C)</b>	
NaOH.....	0.2N
SDS.....	1%
<b>c).-Solución 3 (4°C)</b>	
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> K (5M).....	60%
Acido acético glacial.....	11.5%
H <sub>2</sub> O.....	28.5%
<b>-Electroforesis desnaturalizante</b>	
<b>a).-MOPS 5X</b>	
MOPS.....	0.1M
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na.....	40mM
EDTA (pH=8).....	5mM
<b>b).-Amortiguador de carga B.</b>	
Glicerol.....	50%
MOPS.....	1X.
Azul de Bromofenol.....	0.25%
Xilen Cianol.....	0.25%

-Transferencia.

a). -Solución de SSC 20X (pH=7)

NaCl.....	3M
Citrato de Na.....	0.3M

-Marcaje radioactivo e la sonda Pvl.EA- 14 con <sup>32</sup>P

a). -Solución de STE (pH=8)

Tris-HCl .....	10mM
EDTA.....	1mM
NaCl.....	100mM

-Condiciones de hibridación.

a). - Solución PSE

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.3M
SDS.....	7%
EDTA (pH=8).....	1 mM

-Extracción de proteínas totales

a). - Solución de extracción

Tris (pH= 7.5).....	70mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1mM
KCl.....	25mM
Sacarosa.....	0.25mM
β-mercaptoetanol.....	15mM
Tritón x-100.....	0.1%
EDTA.....	5mM
Inhibidores de proteasas.....	15.8mg

-Separación de proteínas por electroforesis desnaturizante con SDS

a).-Solución de Acrilamida (30%)

Acrilamida.....	29.2g
Bis-acrilamida .....	0.8g
H2O .....	100ml

b).-Gel sellador

Acrilamida (30%).....	433µl
SDS (10%) .....	10µl
Tris-HCl (1.5M, pH= 8.8).....	250µl
TEMED.....	5µl
Persulfato de amonio (10%).....	20µl
H2O .....	282µl

c).-Gel separador

Acrilamida (30%).....	4.33ml
SDS (10%) .....	100µl
Tris-HCl (1.5M,pH= 8.8).....	2.5ml
TEMED.....	5µl
Persulfato de amonio (10%).....	50µl
H2O .....	3ml

d).-Gel apilador

Acrilamida (30%).....	500µl
SDS (10%) .....	30µl
Tris-HCl (1.5M,pH= 8.8).....	720µl

137  
5472

TEMED.....3µl  
 Persulfato de amonio (10%).....15µl  
 H<sub>2</sub>O .....1.73ml  
 c).-Solución de electrodos (5X) (pH= 8.3)  
 Tris.....7.58g  
 Glicina.....36g  
 SDS.....2.5g  
 H<sub>2</sub>O.....500ml

**-Electrotransferencia de proteínas**

**a).-Solución anódica I (pH= 10.4)**

Tris-HCl.....0.3M  
 Metanol.....20% (V/V)

**b).-Solución anódica II (pH= 10.4)**

Tris-HCl.....25mM  
 Metanol.....20% (V/V)

**c).-Solución catódica III (pH=7.2)**

6-amino hexano caprónico.....10mM  
 Metanol.....20% (V/V)

**Inmunodetección**

**a).-PBS (5X)**

NaCl.....20g  
 KCl.....0.5g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....6.8g  
 Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O.....0.7g

ESTOY TENDIENDO  
SALA DE LA BIBLIOTECA

- H<sub>2</sub>O.....500ml
- b).-Solución de bloqueo
- PBS 1X.....20ml
- Leche descremada.....lg
- Tween 20.....240µl

## VII. BIBLIOGRAFIA

- ☐ Ashraf, M., and C.M. Bray. 1993. DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum* L.) seeds and evidence for repair and replication. *Seed Science Research*, 3 : 15-23
- ☐ Baiza, A. M., J. M. Vázquez-Ramos and E. Sánchez de Jiménez. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal. Plant Physiology*. 135 : 416-421
- ☐ Baiza, A. M., and E. Sánchez de Jiménez 1986. Effect of the auxin, 2-(2-methyl-4-chloro-phenoxy) propionic acid on cell cycle regulation in maize embryonic tissue. *Plant Physiology*. 68 : 259-264
- ☐ Baker, J., C. Steele, Dure L III. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*. 11 : 277-291
- ☐ Bewley, J. D., and M. Black 1985. *Seeds physiology of development and germination*. Plenum Press New York and London. p.p 343-345
- ☐ Bewley, J. D., and M. Black 1994. *Seeds physiology of development and germination*. Second Edition. Plenum Press New York and London. p.p 147-191
- ☐ Bino, R. J., J.N. De Vries, H. L. Kraack, and J. G. Van Pijlen. 1992. Flow cytometric determination of nuclear DNA replication stages in tomato seed during priming and germination. *Annals of Botany* 69 : 231-236
- ☐ Blackman, S. A., S. H. Wettlaufer, R. L. Obendorf, and A. C. Leopold. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology* 96 : 868-874

- ☐ Bostock, R. M., R. S. Quatrano. 1992. Regulation of Em gene expression in rice. Interaction between osmotic stress and abscisic acid. *Plant Physiology* 98 : 1356-1363
- ☐ Bray, C. M., and P. A. Davison, M. Ashraf, and R. M. Taylor. 1989. Biochemical changes during priming of leek seed. *Annals of Botany* 63 : 185-193
- ☐ Brocklehurst, P. A., and J. Dearman. 1983. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. I. Laboratory Germination. *Annals of Applied Botany* 102 : 577-584
- ☐ Caers, L. L., W. J. Peumans, and A. R. Carlier. 1979. Preformed and newly synthesized RNA in germination wheat embryos. *Planta* 144 : 491-496
- ☐ Cheung, C. P., J. Wu, and R. J. Sultadolnik 1979. Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. *Nature* 277 : 66-67
- ☐ Clarke, A. N. and P. E. James,. 1991. The effects of priming and accelerated ageing upon the nucleic acid content of leek seeds and their embryos. *Journal of Experimental Botany* . 42 : 261-268
- ☐ Côme, D., and F. Corbineau. 1989. Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy. In R. B. Taylorson (ed.), *Recent advances in the development and germination of seeds*. Plenum Press, New York. pp 165-179
- ☐ Coolbear, P., and D. Grierson. 1979. Studies on the changes in the major nucleic acid components of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum*) Mill resulting from osmotic presowing treatment. *Journal of Experimental Botany*. 30 : 1153-1162
- ☐ Cruz García, F., L. F. Jiménez, and J. M. Vázquez-Ramos. 1995. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. *Seed Science Research* 5 : 15-23

- Datta, K., L. Marsin and A. Marcus. 1983. Early growth of wheat axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology*. 72 : 394-397
- Davison, P. A., and C. M. Bray. 1991. Protein synthesis during osmopriming of leek (*Allium porrum*) seeds. *Seed Science Research* 1 : 29-35
- Dearman, J., P. A. Brocklehurst, and R. L. K. Drew. 1986. Effects of osmotic priming and aging on the germination and emergence of carrot and leek seed. *Annals of Applied Biology* 111 : 717-722
- Dell' Aquila , A. and G. Taranto. 1986. Cell division and DNA synthesis during osmopriming treatment and following germination in aged wheat embryos. *Seed Science and Technology* 14 : 333-341
- Dell' Aquila , A., and J. D. Bewley 1989. Protein synthesis in the axes of polyethylene glycol treated pea seeds and during subsequent germination. *Journal of Experimental Botany* 40 : 1001-1007
- Dure, LIII, M. Crouch, J. Harada, J. Mundy, et al., 1989. Common amino acid sequences domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*. 12 : 475-486
- Dure L III. 1993 Structural motifs in Lea proteins en: Plant responses to cellular dehydration during enviromental stress. T. J. Close, E. A. Bray, Eds. *Current Topics in Plant Physiology*, Vol. 10 American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp 91-103
- Galau, G. A., D. W. Hughes, and L. III Dure. 1986 Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*. 7 : 155-170
- Galau, G. A., N. Bijaisoradat, D. W. Hughes. 1987. Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis abundant mRNA and storage protein mRNAs: Coordinate

- regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Dev. Biol.* 123: 198-212
- ☐ Hegarty, T. W. 1978. The physiology of seed hydration and dehydration and the relation between water stress and control of germination. A review. *Plant Cell and Environment*. 1 : 101-119
- ☐ Heydecker, W., J. Higgins and R. L. Gulliver 1973. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature* 246 : 42-44
- ☐ Heydecker, W. and P. Coolbear. 1977. Seed treatments for improved performance survey and attempted prognosis. *Seed Science and Technology*. 5 : 353-425
- ☐ International Seed Testing Association (ISTA) 1985 International rules for seed testing seed. *Science. and Techonology*. 13 : 299-355
- ☐ Kiger, J., and G. Galili. 1995. Seed Development and Germination. *Biochemical*. p.p 767-789
- ☐ Lanteri, S., H. L. Kraak, C. H. Ric De Vos, and R. J. Bino. 1993. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annum*). *Physiologia Plantarum*. 89 : 433-440
- ☐ Martín C., D. H. Northcote. 1981. Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination. *Planta* 151 : 189-197
- ☐ Masumori, M., N. Yamamoto and S. Sasaki. 1992. Stored mRNA in pine seeds: prologed preservation in dry seeds and disappearece during germination. *Plant Cell Physiology*. 33 : 485-488
- ☐ Meléndez López , S. and J. M. Vázquez-Ramos. 1991. Nuclear DNA polymerase activities of germination in maize embryo axes. *Journal of Plant Physiology*. 137 : 581-585

- ☐ Mundy, J., and N. H. Chua. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO Journal* 7 : 2279-2286
- ☐ Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. p.p 21-32
- ☐ Sánchez de Jiménez, E. and R. Aguilar. 1984. Protein synthesis patterns. *Plant Physiology*. 75 : 231-234
- ☐ Skriver, K., and J. Mundy. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*. 2 : 503-512
- ☐ Spiegel, S. and A. Marcus. 1975. Polyrribosome formation in carle wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* 256 : 228-230
- ☐ Vázquez-Ramos J. M., and D. J. Osborne. 1986. Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research*. 166 : 39-47
- ☐ Woodstock, L. W., and K. L. J. Tao. 1981. Prevention of imbibition injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. *Physiologia Plantarum*. 51 : 133-139
- ☐ Zlatanova ,J. S., P. V. Ivanov, L. M. Stoilou., V. Chimshirova, and B. Stancheu. 1987. DNA repair precedes replicatives synthesis during early germination in maize. *Plant Molecular Biology*. 10 : 139-144
- ☐ Zúñiga-Aguilar, J.J., I. López, A. Gómez, and J.M. Vázquez Ramos. 1995 Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination? *Seed Science Research*. 5 : 219-226