

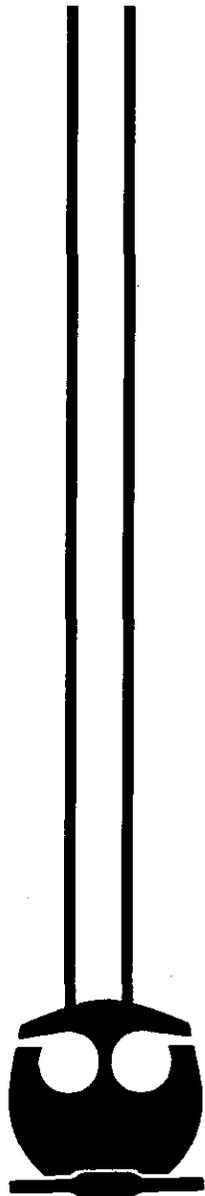
02562

1
25g



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

Producción y detoxificación enzimática de
especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz
con distinta sensibilidad al envejecimiento



T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
QUIMICAS(BIOQUIMICA)
P R E S E N T A:
ADRIANA CAMACHO VILLANUEVA

273205

México D.F.

1999

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/230/99

ADRIANA CAMACHO VILLANUEVA
Alumno de la Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica),
Facultad de Química
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 14 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Producción y destoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento", dirigida por la Dra. Irma Bernal Lugo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
VOCAL	Dr. Jesús Aguirre Linares
SECRETARIO	Dr. José Pedraza Chaverri
SUPLENTE	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
SUPLENTE	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 1999.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA

Amelia Farrés González-Saravia
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*lgg.



El presente trabajo se realizó en Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM; bajo la dirección de la Dra. Irma O. Bernal Lugo y con apoyo del proyecto CONACyT 4798-N9406.

A mis padres,

porque me dieron la vida,
pero también la enseñanza para admirarla,
descubrirla y vivirla

A Pavel,

por su gran corazón y su presencia siempre incondicional

A Mauricio,

por su compañía, por su amor, por la oportunidad de crecer juntos

A Andrés,

por tener la maravillosa bendición de acompañarlo a iniciar su camino

A mi abuelita Felisa, Soco, Mariano, Sari, Gerardo, Bety y Ale,

por el cariño de cada día, por compartir la vida y ser una gran familia

A Vanessa, Laurel y Sobeida,

por compartir conmigo su entusiasmo, su amor por la vida y por cada uno de los
actos que la componen

A Cafh,

por la enseñanza permanente, por la oportunidad de desenvolvimiento

Quiero agradecer infinitamente y con todo mi corazón a la Dra. Bernal por todo lo que he aprendido de ella, más que la formación académica, una filosofía de vida, una entrega total y una convicción firme con respecto a todo lo que hace.

Agradezco también a la Dra. Marina Gavilanes por todos los acertados comentarios que me ha hecho siempre.

También le agradezco a la UNAM, porque me ha brindado el espacio y la posibilidad de aprender y trabajar en ella y me ha permitido formarme y crecer académica y personalmente.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
1. Envejecimiento de las semillas y alteraciones asociadas.....	5
A. Alteración a nivel de biomoléculas de reserva.....	6
B. Actividad respiratoria.....	7
C. Integridad membranal.....	8
D. Síntesis de ARN y proteínas.....	8
E. Estabilidad del ADN.....	9
F. Actividades enzimáticas.....	9
2. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	10
3. Sistema enzimático antioxidante o supresor de ERO.....	12
4. Participación de la mitocondria en la producción de ERO.....	12
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	14
MATERIALES Y METODOS	15
Material biológico.....	15
Envejecimiento y curvas de viabilidad.....	15
Actividades enzimáticas.....	16
Producción mitocondrial del radical superóxido.....	17
Exo-difusión de H ₂ O ₂	17
Determinación del contenido de carbonilos.....	18

Determinación del contenido de sustancias reactivas a tiobarbitúrico (SRT).....	18
Escape de electrolitos.....	18
Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	37
RESUMEN DE RESULTADOS.....	49
CONCLUSION.....	49
ABREVIATURAS.....	50
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

La velocidad con la que las semillas envejecen depende de su genotipo y de sus condiciones de almacenamiento. Las causas exactas del proceso no se conocen, sin embargo, en diferentes trabajos se ha demostrado que en las semillas envejecidas se presentan especies reactivas de oxígeno (ERO) como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y disminuye la actividad de algunas de las enzimas encargadas de eliminar a estas ERO como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las peroxidasas (POD). Estas observaciones sugieren que los efectos dañinos asociados al envejecimiento podrían ser consecuencia de una acumulación de especies potencialmente dañinas, considerando a esta acumulación como el resultado del desbalance entre la generación y la eliminación de las ERO. Lo anterior sugiere que si el sistema enzimático de defensa frente a ERO, conformado por la SOD, la CAT y las POD, fuese determinante en la protección de las semillas contra el envejecimiento que se realiza en el almacén, entonces, semillas de maíz que presentan distinto grado de envejecimiento después de ser sometidas a las mismas condiciones y tiempo de almacenamiento, tendrían una actividad diferente del sistema enzimático de defensa frente a las ERO antes y/o después de la germinación.

Para poner a prueba esta hipótesis se trabajó con tres cultivares de maíz con diferente sensibilidad al envejecimiento.

El envejecimiento estuvo asociado con peroxidaciones en el eje embrionario, las cuales se reflejaron en un aumento en la lipoperoxidación y en una disminución

de la integridad membranal. Solo este último parámetro correlacionó positivamente con la sensibilidad al envejecimiento. Además del daño membranal observado en los materiales envejecidos, también se detectó un incremento de la producción mitocondrial, evaluado al nivel de la poza de quinonas, del radical superóxido (O_2^-).

La capacidad de detoxificación del H_2O_2 de la semilla germinada disminuyó en los materiales envejecidos.

Por último, el envejecimiento estuvo asociado, de manera general, a una menor actividad de la SOD con respecto a los controles, antes y después de la imbibición y a un cambio en la actividad de la POD y la CAT: la actividad de la primera disminuyó solamente en el material más sensible, mientras la segunda lo hizo en el más sensible y en el de mediana sensibilidad. La actividad de la SOD después del envejecimiento, correlacionó positivamente ($r^2=0.99$, $P=0.06$ $\alpha=0.05$) con el valor de P_{50} de los diferentes materiales, esto es, la mayor actividad de la enzima se presenta en el cultivar de menor sensibilidad al envejecimiento.

Los resultados obtenidos sugieren que la acumulación del H_2O_2 durante la imbibición de diferentes materiales envejecidos, es mayor en el cultivar de mayor sensibilidad al envejecimiento y que esta acumulación está asociado a la menor actividad de la SOD y las POD en este material.

INTRODUCCIÓN

El término "envejecimiento" es usado para describir tanto la progresiva pérdida de viabilidad durante el almacenamiento de las semillas (Noodén 1988) como la disminución de su vigor evaluado por ejemplo, como disminución de la velocidad de germinación (Vertucci 1992). Diversos estudios sobre los efectos del envejecimiento de semillas en almacén indican que este deterioro está asociado a procesos oxidativos en los que intervienen especies reactivas de oxígeno (ERO) y eventos de lipoperoxidación (Parrish y Leopold 1978, Stewart y Bewley 1980; Wilson y McDonald 1986; Hendry 1993; Bailly *et al.* 1996; Sung 1996). También se ha demostrado que la sensibilidad al envejecimiento o bien la velocidad con que las semillas pierden viabilidad en el almacén, varía entre especies y entre genotipos de la misma especie (Priestley *et al.* 1985; Moreno Martínez *et al.* 1988, Bernal-Lugo y Leopold 1995). Lo anterior sugiere que las semillas poseen mecanismos genéticos que las protegen diferencialmente de las reacciones deletéreas que se manifiestan con el envejecimiento y que la expresión de estos mecanismos de defensa varía cualitativa y/o cuantitativamente en cada especie o variedad. Estos posibles mecanismos de protección pueden estar presentes en la semilla seca o bien expresarse durante la germinación. Dado que en el envejecimiento se presentan procesos oxidativos como las peroxidaciones (Priestley *et al.* 1985; Bailly *et al.* 1996; Wilson y McDonald 1986), es lógico suponer que uno de los mecanismos protectores de la semilla debería estar constituido por procesos antioxidantes. Entre estos se encuentran el sistema

enzimático de descomposición del superóxido (O_2^-) y el peróxido (H_2O_2) constituido por la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las peroxidases (POD).

El objetivo de este trabajo fue determinar si el sistema enzimático que defiende contra las peroxidaciones celulares, participa en la protección de la semilla durante el envejecimiento y en su posterior germinación. Así como también el efecto del envejecimiento sobre la actividad de dicho sistema enzimático de defensa. La estrategia utilizada fue la de correlacionar la actividad del sistema enzimático de defensa frente a ERO, conformado por la SOD, la CAT y las POD, con la sensibilidad al envejecimiento de diferentes cultivares de maíz.

ANTECEDENTES

1. Envejecimiento de las semillas y alteraciones asociadas

El envejecimiento es considerado un proceso degenerativo, no regulado y determinado principalmente por factores externos. La muerte o pérdida de viabilidad no es la única ni la principal consecuencia del envejecimiento (Noodén 1988, Smith y Berjak 1995). Algunos de los cambios asociados al envejecimiento se han documentado en los siguientes niveles: a) daño a las biomoléculas de reserva, b) disminución de la actividad respiratoria, c) pérdida de integridad membranal, d) disminución de ARNr, degradación de ARNm presentes en la semilla madura y disminución de la capacidad de síntesis *de novo* de ARNm, e) degradación del ADN, f) disminución de la síntesis de proteínas, g) disminución de actividades enzimáticas y h) disminución de integridad cromosómica (Smith y Berjak 1995). Todas estas alteraciones pueden conducir tanto al incremento de la probabilidad de muerte, como a la disminución de la resistencia a diferentes tipos de estrés (Noodén 1988).

La disminución de la viabilidad y del vigor (velocidad de germinación, crecimiento de plántula, desarrollo de plántula, etc.) de las semillas durante el almacenamiento se conoce como envejecimiento (Noodén 1988, Mckersie *et al.* 1988, Vertucci 1992) y aunque el o los mecanismos por los cuales las semillas envejecen cuando son almacenadas no se han dilucidado, se sabe que la velocidad con la que el fenómeno se establece depende de diversos factores ambientales, como la temperatura, la humedad (Vertucci 1992, Smith y Berjak 1995) y la presencia de

oxígeno (Hendry 1993). La teoría del envejecimiento por radicales libres, postula que durante el envejecimiento en el almacén se acumulan algunas de estas especies (Wilson y McDonald 1986, Hendry 1993) y que ellas podrían relacionarse con los daños asociados al envejecimiento (Hendry 1993).

A. Alteraciones al nivel de biomoléculas de reserva

Lípidos

La composición de lípidos de reserva de las semillas es determinada por factores genéticos, pero puede ser afectada por las condiciones ambientales como la luz y la temperatura. Un estudio de la relación entre longevidad y la composición general de diferentes semillas ha mostrado la tendencia de las semillas ricas en lípidos a ser poco longevas (Priestley 1986). Esta tendencia parece estar relacionada con la susceptibilidad de estas biomoléculas a la oxidación y a las condiciones de temperatura y humedad relativa (HR) presentes en el almacenamiento. Las semillas ortodoxas maduras constituyen un sistema seco en el que la velocidad de lipoperoxidación de los triacilglicéridos inicia lentamente (período de inducción) y se acelera conforme avanza el tiempo de almacenamiento. Se ha demostrado que a altas temperaturas y HR el período de inducción se hace más corto y la velocidad de la siguiente fase se incrementa exponencialmente (Smith y Berjak 1995).

Carbohidratos

Se ha demostrado que durante el envejecimiento se presenta una disminución de azúcares en semillas de maíz y soya (Bernal-Lugo y Leopold 1992; Sun y Leopold

1995). En cultivares de maíz con similar calidad inicial y diferente sensibilidad al envejecimiento se ha observado acumulación de monosacáridos (Díaz de León 1993) y disminución significativa de rafinosa y en menor grado de sacarosa (Bernal-Lugo y Leopold 1992). Todas estas alteraciones parecen influir en la estabilidad del estado vítreo, el cual es un estado de alta viscosidad, que limita la generación de reacciones deletéreas (Bernal-Lugo y Leopold 1998) y por lo tanto mantienen la estabilidad de la semilla.

Proteínas

En estudios donde se ha evaluado el efecto del envejecimiento de las semillas sobre las biomoléculas que la forman se ha sugerido que durante el envejecimiento en el almacén se promueven entrecruzamientos y proteólisis (Ching y Schoolcraft 1968). Estas alteraciones modifican la estructura de las proteínas y en el caso de las enzimas, su actividad. Aquéllas enzimas implicadas en la movilización de reservas, como la amilasa, pueden ocasionar alteraciones que resulten en la disminución de la germinación y el establecimiento de la plántula (Petruzeli y Taranto 1990). En semillas envejecidas en el almacén se ha demostrado que la actividad de enzimas como la SOD, la CAT y las POD es extremadamente baja (Nandi *et al.* 1997).

B. Actividad respiratoria

En estudios donde se han evaluado los efectos del envejecimiento sobre el metabolismo respiratorio durante la imbibición, se ha encontrado una disminución en la actividad de la cadena respiratoria sensible a cianuro (Abdul-Baki 1980)

debida principalmente a una reducción de la actividad mitocondrial (Woodstock *et al.* 1984) y a un incremento en el transporte de electrones a través de vía de la oxidasa alterna, insensible a cianuro (Leopold y Musgrave 1980).

C. Integridad membranal

En numerosos trabajos en los que se han utilizado sistemas de envejecimiento natural y acelerado, se ha postulado la pérdida de integridad membranal. Esta propuesta sobre la alteración de la estructura y funcionalidad de las membranas, se apoya en el incremento de los productos de lipoperoxidación (p. ej. malondialdehído), el incremento de ácidos grasos libres y la disminución de fosfolípidos (ácidos linoleico y linolénico) y proteínas de membrana (Stewart y Bewley 1980; Noodén 1988). Otra observación que indica pérdida de la integridad de las membranas, es el incremento en la salida de electrolitos.

D. Síntesis de ARN y proteínas

Si durante las primeras horas de imbibición (24 h) se añaden al sistema inhibidores de la transcripción, la germinación y la síntesis de proteínas no se alteran, por lo tanto, se ha propuesto que en la semilla seca los ARNm acumulados durante la maduración de la misma son los principales responsables de la síntesis proteica necesaria durante el inicio de la germinación. En diferentes estudios se ha demostrado que los ARNs de transferencia son particularmente resistentes a alteraciones durante el envejecimiento y que los ARNs mensajeros son muy sensibles. En embriones de semillas envejecidas de centeno, se ha encontrado una disminución del 40% de todos los ARNs poli-A, con respecto a los

presentes en semillas no envejecidas (Osborne 1980). Además de estas alteraciones también se ha documentado la disminución de la síntesis *de novo* de ARN. Todo lo anterior conduce a una disminución de la síntesis de proteínas y de la viabilidad.

E. Estabilidad del ADN

En semillas secas envejecidas de centeno se ha encontrado un incremento en el contenido de nucleótidos libres y ADN con menor integridad con respecto al de sus contrapartes no envejecidas (Roberts y Osborne 1973, Osborne 1982). En estudios relacionados se ha sugerido que durante el almacenamiento prolongado se lleva a cabo la inactivación de inhibidores de ADNasas que pueden entonces degradar el ADN de la semilla. En diversos trabajos en hongos y en mamíferos se ha propuesto que el ADN mitocondrial (ADNmit) de todos los tipos celulares es un posible blanco de ataque de los radicales libres. (Osiewacks 1990; Ames *et al.* 1995; Benzi y Moretti 1995; Kadenbach *et al.* 1995; Richter 1995) y que el envejecimiento está dado por cambios en el genoma mitocondrial de las células diferenciadas (Miquel 1991).

F. Actividades enzimáticas

Se ha propuesto que durante el envejecimiento generado en el almacén, se llevan a cabo una serie de reacciones de entrecruzamiento y/o proteólisis que pueden conducir a la pérdida de la actividad enzimática (Wettlaufer y Leopold 1991, Sun y Leopold 1995). Las proteínas pueden modificarse al reaccionar con los productos de la oxidación por radicales libres, de oligosacáridos o ácidos grasos poli-

insaturados. Algunos ejemplos de estas modificaciones son las reacciones de glicosación no enzimática con azúcares reductores y las reacciones con aldehídos α, β -insaturados. Otra posibilidad de modificación, es que las proteínas sean atacadas directamente por los radicales libres.

Así mismo, la propagación de eventos oxidativos puede ocasionar alteraciones en el estado redox de proteínas con puentes disulfuro y llevar a la pérdida o disminución de su actividad enzimática.

2. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas, que contienen uno o más electrones desapareados. Estas especies pueden ser derivadas de muchos elementos químicos, sin embargo, las de mayor importancia desde el punto de vista biológico son los derivados del hidrógeno, el oxígeno, el carbono y el nitrógeno. Los radicales de oxígeno se denominan ERO. Los agentes productores de radicales libres son, entre otros, las radiaciones ionizantes y los metales de transición; los cuales están presentes en el sitio activo de enzimas tipo oxigenasas y oxidasas (Rotilio *et al.* 1970; Fee 1982; Fridovich 1974, 1978).

Entre las ERO, se encuentra el superóxido, que se producen por la adición de un electrón a una molécula de oxígeno. La adición de otro electrón y dos protones genera peróxido de hidrógeno y también puede hacerlo mediante una reacción de dismutación con la liberación de oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno, aunque no es un radical libre es el principal generador del radical hidroxilo, el cual tiene una alta velocidad y facilidad de reacción con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos.

Se ha determinado que durante el envejecimiento en el almacén de las semillas de soya, se acumulan radicales libres, principalmente en los ejes embrionarios (Buchvarov y Gantcheff 1984). Usando resonancia paramagnética del electrón (EPR) se ha sugerido que estos radicales son, aparentemente, derivados de quinonas debido a la semejanza de las señales con las proporcionadas por las semiquinonas y las ubiquinonas (Nandi *et al.* 1997, Buchvarov y Gantcheff 1984). También se ha sugerido que durante el envejecimiento en el almacén puede llevarse a cabo la acumulación de ERO vía generación no enzimática (Hendry 1993).

Otro aspecto que se ha estudiado es el efecto de los radicales libres en sistemas donde éstos son aplicados a las membranas de ejes embrionarios (Senaratna *et al.* 1987) o bien sometiendo plantas completas o segmentos de éstas a diversos tipos de estrés que inducen daño oxidativo y ERO (Medhy 1994, Wise 1995). Todos estos estudios han sugerido una relación entre la acumulación de ERO y daños membranales, como la peroxidación.

La fosforilación oxidativa, presente en todos los organismos aeróbicos, es un sistema en el que también se forman ERO, que en condiciones normales son transformadas en especies de baja reactividad o no dañinas mediante la acción de diferentes mecanismos. Estos mecanismos pueden ser tanto enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas), como no enzimáticos (por ejemplo: ascorbato, glutatión y tocoferol).

transporte de electrones en la mitocondria también parece ser la fuente principal del H_2O_2 citoplásmico vía el O_2^- generado en la cadena transportadora de electrones. Se ha estimado que entre un 3.6% y un 5.9% del flujo de electrones en la mitocondria resulta en una reducción univalente del oxígeno (Puntarulo *et al.* 1988).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con base en la información anterior se planteó la siguiente **hipótesis**: “Si la peroxidación es un proceso que participa en el esquema de daño asociado al envejecimiento de las semillas, entonces la actividad del sistema enzimático supresor de ERO, estará inversamente relacionada con las diferencias en sensibilidad al envejecimiento de varias semillas”. Lo anterior significaría que aquellos materiales que envejecen a menor velocidad tendrían una mayor capacidad enzimática para contender contra procesos peroxidativos, comparados con aquellos materiales que envejecen más rápidamente.

Para probar la hipótesis anterior, se plantearon los siguientes **objetivos** particulares:

1. Determinar la sensibilidad al envejecimiento de diferentes genotipos de maíz.
2. Determinar el contenido de posibles productos de actividad peroxidativa, en ejes embrionarios de maíz control y envejecidos, antes y después de la imbibición.
3. Determinar la capacidad de generación y/o acumulación de ERO, como el radical $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 .
4. Determinar la actividad del sistema enzimático supresor de ERO conformado por la SOD, la CAT y las POD, en semillas con distinta sensibilidad al envejecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Las semillas utilizadas en este trabajo fueron las accesiones Pepitilla 49 (PEP) y Tepecintle 100 (TEP) proporcionadas por el Centro de investigación para el mejoramiento del maíz y el trigo (CIMMYT) y los híbridos HS1 y A6, proporcionados por el Dr. A. Carballo, del Instituto de Recursos Genéticos del Colegio de Posgraduados de Chapingo (CP).

Envejecimiento y curvas de viabilidad

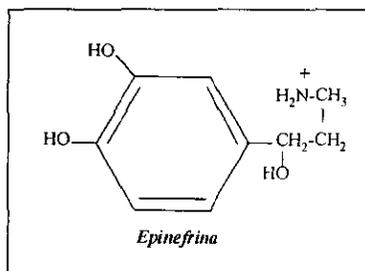
Las semillas almacenadas a 4°C y 50% de HR desde su cosecha, fueron denominadas control. El envejecimiento de las semillas se llevó a cabo, tomando muestras de la población control y almacenándolas a 30°C y 75% de HR o bien a 40°C y 100% de HR durante diferentes períodos, meses en el primer caso y días en el segundo. El primer tratamiento se denominó envejecimiento moderado y el segundo envejecimiento acelerado. Las condiciones de almacenamiento seleccionadas para este trabajo permiten que la disminución de la viabilidad, es decir el envejecimiento de las semillas de maíz se realice en tiempos adecuados para el trabajo de laboratorio y los muestreos requeridos ya que el almacenamiento en condiciones de menor temperatura y HR conduciría a la pérdida de viabilidad en períodos de años (Ellis *et al.* 1988)

A determinados tiempos de envejecimiento se tomaron muestras de las semillas almacenadas y lo mismo que a las del control, se les determinó el porcentaje de

germinación después de 72 h de imbibición. De las curvas de sobrevivencia (viabilidad versus el tiempo de almacenamiento) se obtuvo el P_{50} (tiempo en que el porcentaje de germinación se reduce a 50). Las semillas utilizadas en los experimentos descritos en este trabajo, se almacenaron por 4 meses y por 7 días en condiciones de envejecimiento moderado y acelerado respectivamente. Los porcentajes de germinación para las semillas de Tepencintle, Pepitilla y A6 envejecidas en condiciones moderadas fueron 90, 40 y 20 respectivamente. A los 7 días de almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado, Tepecintle, Pepitilla, A6 y HS1 presentaron 95%, 80%, 60% y 60% de germinación.

Actividades enzimáticas

La actividad de SOD se determinó registrando la autoxidación de la epinefrina a adrenocromo ($\epsilon=4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 480 nm (Misra y Fridovich 1972). El volumen final de reacción fue 1 ml y el medio contenía amortiguador de carbonatos 50 mM [pH 10.2], EDTA 0.1 mM y epinefrina 2.5 mM.



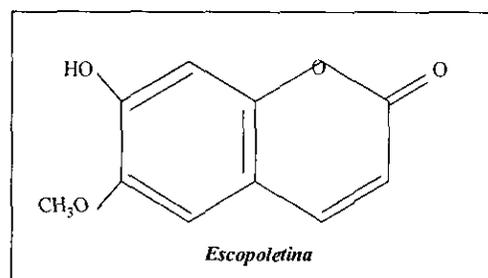
La actividad de POD se evaluó usando guaiacol ($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como sustrato y siguiendo la reacción a 470 nm (Chance y Maehly 1955). El volumen final de reacción fue de 1 ml y el medio de reacción contenía amortiguador de fosfatos 50

mM [pH 6.7], H₂O₂ 10 mM y guaiacol 10 mM.

La actividad de CAT se obtuvo registrando la desaparición de H₂O₂ ($\epsilon=40.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 240 nm (Chance y Maehly 1955). El volumen final de reacción fue de 1 ml y el medio contenía amortiguador de fosfatos 50 mM [pH 7.0] y H₂O₂ 10 mM.

Producción mitocondrial del radical superóxido (O₂⁻)

Las partículas submitocondriales se obtuvieron por el método de Boveris (1984), a partir de una fracción enriquecida en mitocondrias, resuspendida en Tris-HCl 20 mM [pH=7.4] y KCl 40 mM. La fracción se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación. Las partículas obtenidas se lavaron hasta eliminar la actividad de SOD. La mayoría de las veces fue suficiente con tres lavados. La cuantificación de O₂⁻, se basó en el seguimiento a 480 nm de la oxidación dependiente de este radical, de la epinefrina a adrenocromo ($\epsilon=4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El medio de reacción contenía Tris-HCl 20 mM, manitol 230 mM, sacarosa 70 mM, epinefrina 1 mM, EDTA 1 mM, succinato 7 mM, antimicina 0.001 mM y 400 U de CAT.



Exo-difusión de H₂O₂

La cuantificación de H₂O₂ se llevó a cabo en alícuotas del medio (amortiguador de fosfatos 50 mM [pH 7.0]) en el que fueron agitados 30 ejes embrionarios durante

30 min. La concentración de H₂O₂ se determinó registrando la disminución de la fluorescencia de una solución de escopoletina (Hildebrandt *et al.* 1985).

Determinación del contenido de carbonilos

La determinación de carbonilos se realizó en extractos de proteínas solubles en presencia de inhibidores de proteasas. Estos extractos fueron obtenidos por centrifugación a 16 000 x g después de la precipitación con TCA 10%. El ensayo se basó en la reactividad de estos carbonilos presentes en las proteínas oxidadas, con 2,4-dinitrofenilhidracina (Levine *et al.* 1990) y la cuantificación se realizó espectrofotométricamente a 366 nm ($\epsilon=22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Determinación del contenido de sustancias reactivas a tiobarbitúrico (SRT)

El grado de lipoperoxidación se determinó en fracciones microsomales obtenidas por centrifugación a 77000 x g y cuantificando espectrofotométricamente las SRT presentes en ellas (Heath y Packer 1968). Esta cuantificación se llevó a cabo determinando la diferencia de absorbencia a 532 nm menos la inespecífica a 600 nm de los productos generados después de dejar reaccionar el ácido tiobarbitúrico con las membranas microsomales durante 30 minutos ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Escape de electrolitos

La cuantificación se realizó determinando la conductividad eléctrica en agua destilada en la cual se agitaron 30 ejes embrionarios. Se utilizó un conductímetro Conmet 1 (Portable Conductivity-meter 0-1999 μS). Se realizaron registros cada

minuto durante los primeros 10 min. de agitación de los ejes en el agua destilada y posteriormente se hicieron lecturas cada 10 min. hasta que los valores de conductividad permanecieron constantes (C_{mtra}). Después de este tiempo, las muestras de agua con ejes se hirvieron, se dejaron enfriar y se registró la conductividad ($C_{mtra.total}$). La salida de electrolitos en cada tiempo registrado, se calculó como el porcentaje de electrolitos acumulados en el agua de imbibición con respecto al contenido total de electrolitos de la muestra (Stewart y Bewley 1980).

$$\% \text{ de salida de electrolitos} = (C_{mtra} \times 100) / C_{mtra.total}$$

El porcentaje de electrolitos escapados durante los primeros 10 min. se graficó y de la recta generada se calculó la pendiente. Este valor indicó la velocidad de escape de electrolitos durante estos primeros 10 min. de imbibición. La integridad de las membranas se expresó como el inverso de la velocidad con la que los electrolitos se escaparon de los ejes embrionarios.

Análisis estadístico

Los datos expresados en las figuras y tablas, son el promedio de 2 experimentos independientes realizados por triplicado con la desviación estándar respectiva. Para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos y materiales, se realizaron análisis multifactorial de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, utilizando el paquete Instat de la empresa GraphPad Inc. Las diferencias significativas se estimaron considerando un $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Distintos genotipos de maíz presentan diferente sensibilidad al envejecimiento

La estabilidad en almacén de los materiales utilizados, se determinó a través de la generación de curvas de sobrevivencia de estos materiales en dos condiciones de almacenamiento, una de ellas fue de envejecimiento moderado (30°C y 75% de humedad relativa) y la otra de envejecimiento acelerado (40°C y 100% de humedad relativa). Estas diferencias en temperatura y humedad relativa influyeron en la velocidad con la que se desarrolló la pérdida de viabilidad. A mayor humedad relativa y temperatura de almacenamiento, mayor fue la velocidad de deterioro (comparar Fig. 1A y Fig. 1B). Sin embargo, bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa, la estabilidad en almacén, es decir, la velocidad con que perdieron la viabilidad los diferentes cultivares de maíz fue distinta (Fig. 1).

Para expresar de manera cuantitativa las diferencias de estas curvas de sobrevivencia, se determinó el P_{50} (Roberts 1973) para cada cultivar (Tabla 1). Este valor expresa el tiempo de almacenamiento en que el 50% de las semillas de un lote han perdido su viabilidad, de forma tal que a mayor valor de P_{50} , menor es la sensibilidad al envejecimiento. Tomando en cuenta el valor calculado de P_{50} , los diferentes cultivares se clasificaron de acuerdo a su sensibilidad al envejecimiento (SE). Los cultivares A6 y HS1 se denominaron de alta sensibilidad (ASE), el Pepitilla de mediana (MSE) y el Tepecintle de baja (BSE) (Tabla 1).

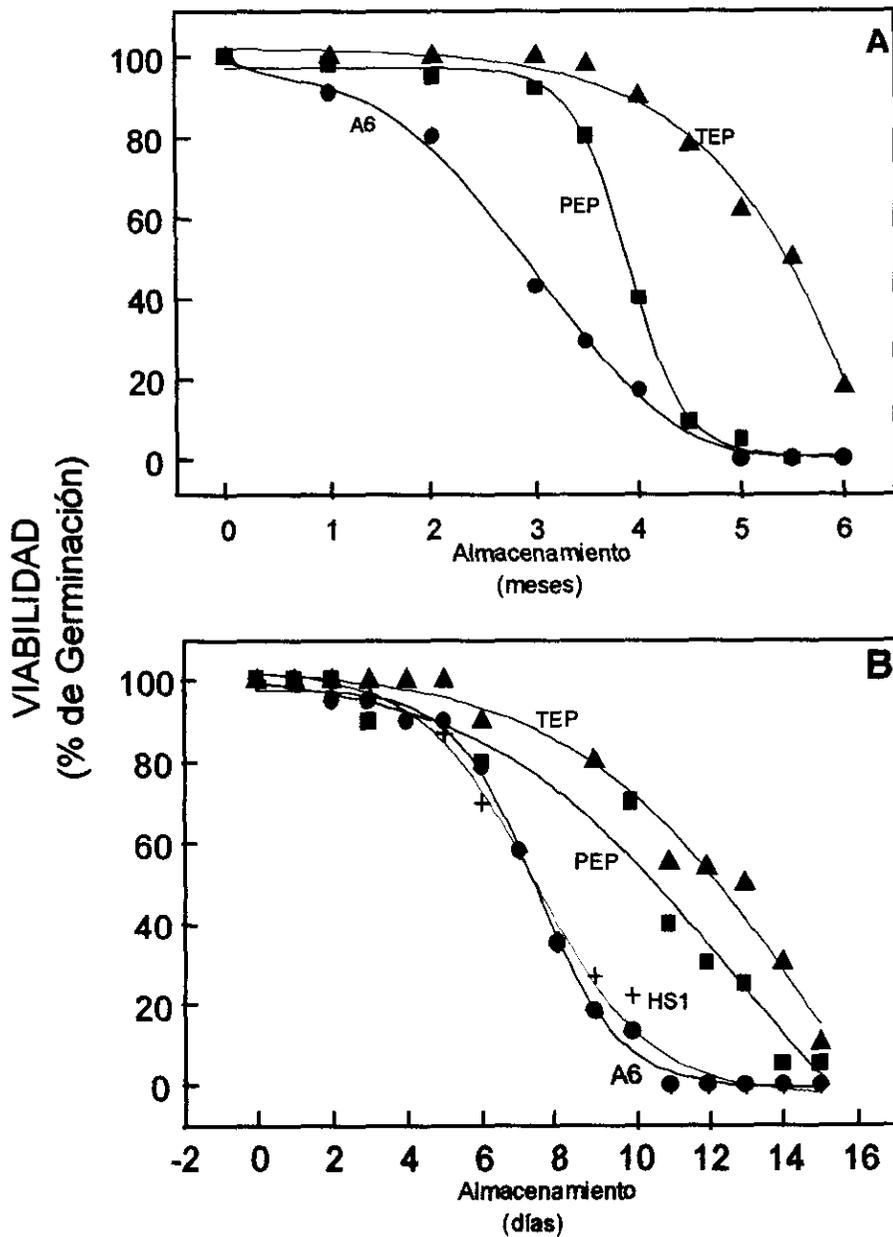


Figura 1. Curvas de sobrevivencia de diferentes cultivares de maíz. Las condiciones bajo las cuales se envejecieron los diferentes materiales fueron 30°C y 75% de humedad relativa (A) y 40°C y 100% de humedad relativa (B). Cada punto de las gráficas representa el promedio de tres experimentos independientes. A los diferentes tiempos de almacenamiento indicados en la figura, se tomaron tres lotes de 25 semillas y se colocaron en rollos de papel estraza mojados con agua destilada estéril. Los rollos de papel con las semillas se colocaron en una estufa a 30°C y cada 12 horas se contó el número de semillas en las cuales la raíz había emergido. El porcentaje de germinación es el total de semillas que germinaron con respecto a las 25 muestreadas. Este proceso se realizó en tres diferentes experimentos y cada punto en las gráficas representa el promedio de los tres experimentos independientes y las tres réplicas de cada determinación.

Tabla 1. Sensibilidad al envejecimiento de diversos cultivares de maíz

Cultivar	P50 30°C/75% HR (meses)	P50 40°C/100% HR (días)	Sensibilidad al Envejecimiento (SE)
HS1	nd	7.4	Alta (ASE)
A6	2.7	7.4	Alta (ASE)
PEPITILLA	3.9	12.6	Mediana (MSE)
TEPECINTLE	5.5	14.9	Baja (BSE)

nd= no determinado

La pérdida de viabilidad en almacén es un fenómeno asociado a procesos oxidativos

Para determinar si las condiciones de almacenamiento utilizadas en este trabajo promovían procesos oxidativos asociados a la pérdida de viabilidad, en ejes embrionarios de cada material se cuantificaron los productos de oxidación membranal o lipoperoxidación (sustancias reactivas a tiobarbitúrico: (SRT) y el contenido de proteínas oxidadas (contenido de carbonilos). También se cuantificaron las actividades de las enzimas de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ERO): superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (POD) y catalasa (CAT) después de 3 y 7 días de envejecimiento acelerado del material HS1, clasificado como de ASE. El nivel de oxidación antes y después del envejecimiento varía cuando se evalúa como contenido de proteínas oxidadas (Fig. 2A), pero no como lipoperoxidación a nivel de membranas (Fig. 2B). La variación observada estuvo dada por un incremento de las proteínas oxidadas a los 7 días de envejecimiento. A este tiempo, la actividad detectada para las tres enzimas supresoras de ERO, fue significativamente menor que la que presentaron

las semillas control (Fig. 3A, 3B, 3C). A los 3 días de almacenamiento, la actividad de POD se mantuvo en niveles similares a los detectados en semillas control (Fig. 3C), mientras que la de CAT aumentó (Fig. 3B) y la de SOD disminuyó (Fig. 3A).

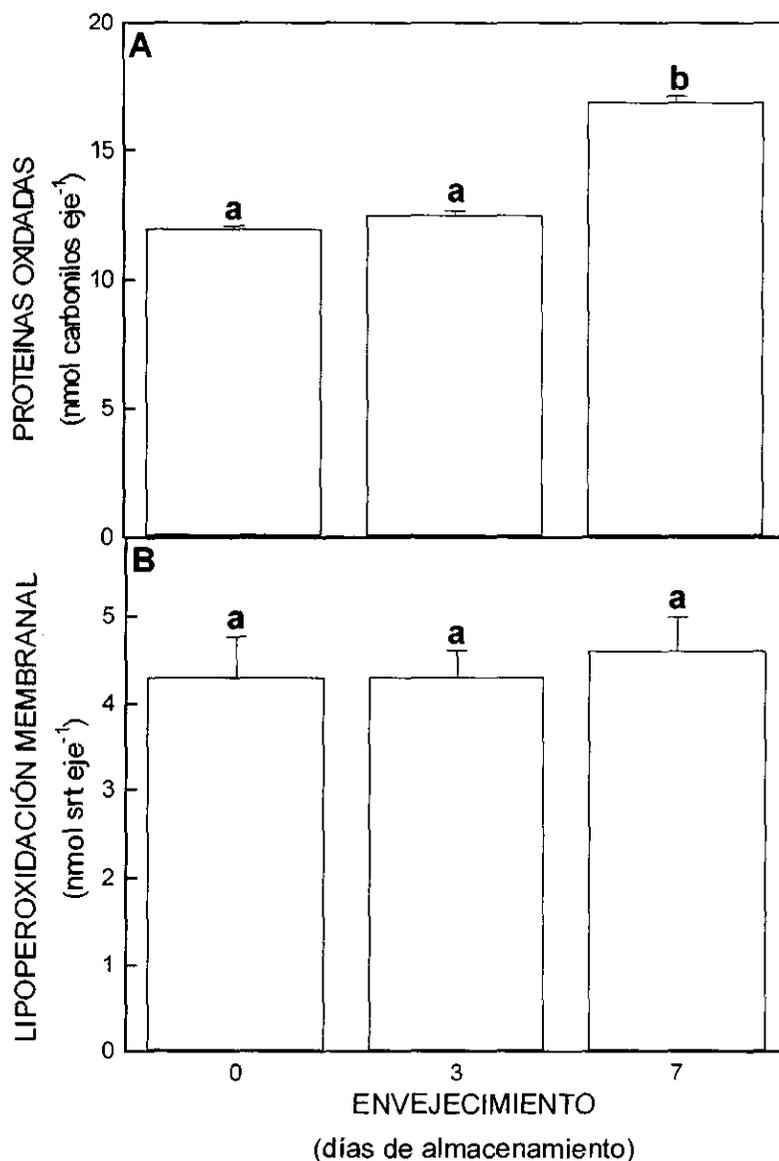


Figura 2. Efecto del envejecimiento sobre el contenido de proteínas oxidadas (A) y la lipoperoxidación membranal (B) en semillas de maíz HS1. Las condiciones bajo las cuales se envejeció el material fueron 40°C y 100% de humedad relativa. Las determinaciones para cada tiempo de envejecimiento se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de envejecimiento ($\alpha= 0.05$).

srt= sustancias reactivas a tiobarbitúrico

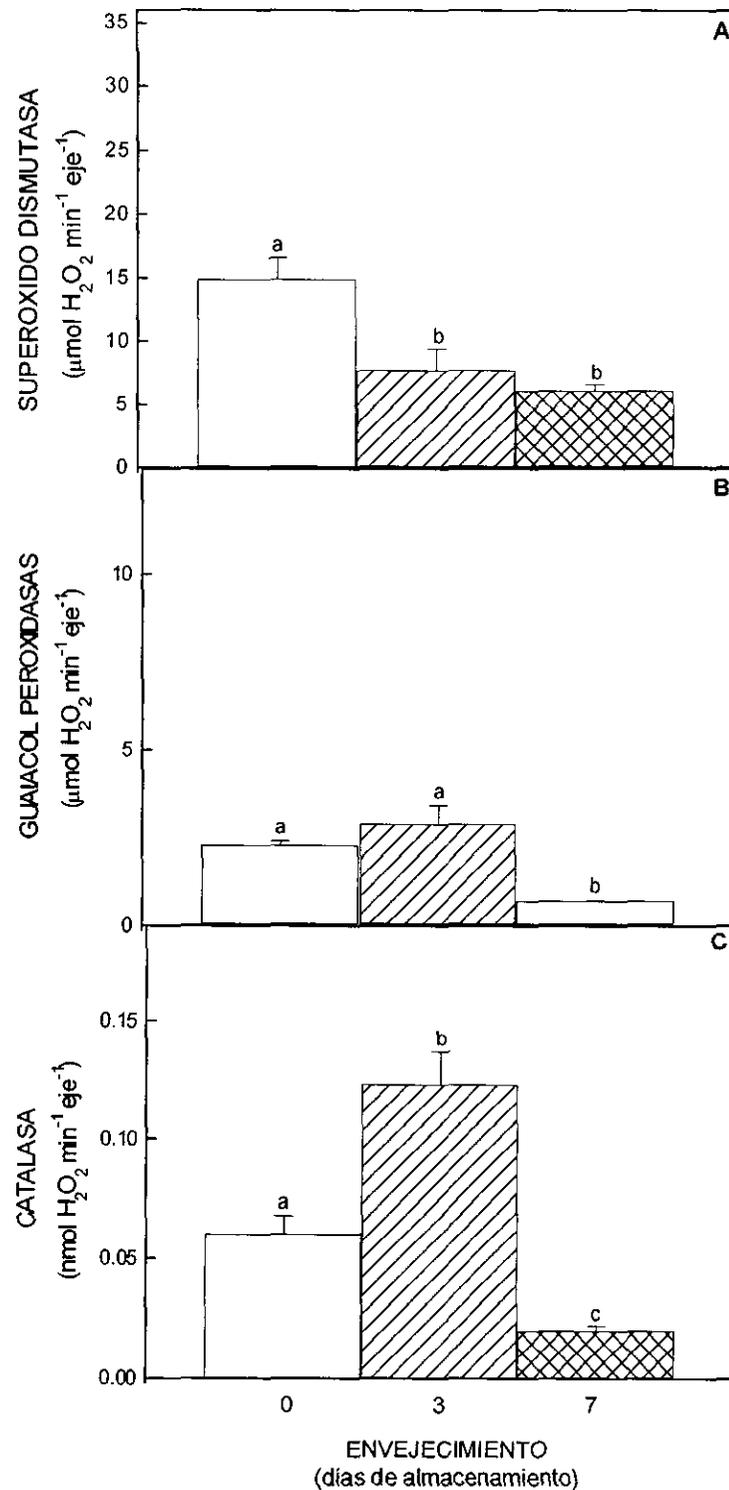
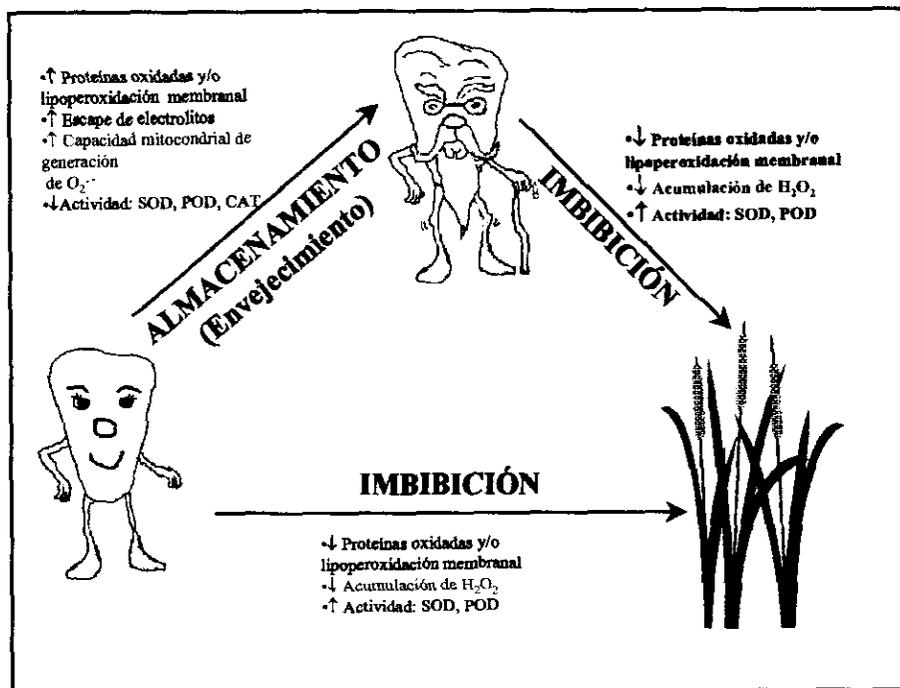


Figura 3. Efecto del envejecimiento sobre la actividad del sistema enzimático de defensa frente a ERO en semillas de maíz HS1. El envejecimiento del material se llevó a cabo a 40°C y 100% de humedad relativa. Cada valor de actividad enzimático graficado en la figura representa el promedio de determinaciones realizadas en semillas secas, por triplicado y en dos experimentos independientes. Las letras iguales sobre las barras indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de envejecimiento ($\alpha= 0.05$).

El contenido de proteínas solubles oxidadas, la integridad de la membrana plasmática y la actividad de SOD en ejes embrionarios, se relacionan con la sensibilidad al envejecimiento de las semillas

Los resultados de la sección anterior nos llevaron a plantear la hipótesis de que la SE de distintos materiales podría estar dada por diferencias en la cantidad de ERO presentes en las semillas control, en el nivel de estas especies después del envejecimiento o en la capacidad enzimática para inactivarlas antes o durante la germinación (Esquema 1).



Esquema 1. Envejecimiento y germinación de semillas. La pérdida de viabilidad que se manifiesta a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento de las semillas (envejecimiento), está asociado a un incremento de la generación potencial de ERO, al incremento de macromoléculas oxidadas y a la disminución de la actividad de algunas enzimas antioxidantes como SOD, POD y CAT. Durante la imbibición, tanto las semillas control como las envejecidas, disminuyen el nivel de macromoléculas oxidadas y la capacidad de generación o acumulación de ERO, además de incrementar la actividad de las enzimas de defensa frente a las peroxidaciones. Aunque durante la imbibición se lleva a cabo el mismo tipo de procesos en las semillas control y en las envejecidas la magnitud de ellos es menor en las semillas envejecidas.

Los experimentos realizados para probar la hipótesis anterior se describen a continuación y en ellos se utiliza al híbrido A6 como material de ASE.

Las semillas control del material de ASE, presentaron mayor contenido de proteínas oxidadas que los materiales de MSE y BSE (Tabla 2: columna control, 0 h de imbibición) observándose una correlación negativa ($r^2=-0.99$ y $P=0.05$) entre el contenido de proteínas oxidadas y el valor de P_{50} , cuando éste se determinó a 75% de HR y 30°C (Fig. 4A). La lipoperoxidación presente en ejes embrionarios del material de ASE fue significativamente mayor que la observada en los otros dos materiales (Tabla 2: columna control, 0 h de imbibición) y sin embargo, no hubo correlación cuantitativa entre ella y el indicador de sensibilidad al envejecimiento, P_{50} ($r^2=0.38$ y $P=0.57$). La integridad membranal, evaluada como el inverso de la velocidad de escape de electrolitos, fue mayor a medida que la sensibilidad al envejecimiento disminuyó (Tabla 2) y se encontró una correlación positiva ($r^2=0.99$ y $P=0.06$) entre integridad membranal y P_{50} (Fig. 4C).

TABLA 2. Efecto del envejecimiento y la imbibición sobre el contenido de macromoléculas oxidadas, la integridad membranal y las especies reactivas de oxígeno (ERO) presentes en semillas de cultivares de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. El tratamiento de envejecimiento fue de 30°C y 75% HR por 4 meses para todos los materiales.

	Material	CONTROL		ENVEJECIDO	
		Imbibición (h)		0	24
Oxidación de proteínas (nmol Carbonilos eje ⁻¹)	ASE	2.2 ^{1a}	3.6 ^{1b}	2.0 ^{1a}	1.5 ^{1c}
	MSE	1.8 ^{2a}	2.1 ^{2a}	2.1 ^{1a}	1.1 ^{2b}
	BSE	0.4 ^{3a}	1.1 ^{3a}	1.5 ^{2a}	1.6 ^{1a}
Lipoperoxidación (pmol SRT eje ⁻¹)	ASE	150 ^{1a}	80 ^{1b}	2200 ^{1c}	70 ^{1b}
	MSE	50 ^{2a}	80 ^{1a}	970 ^{2b}	70 ^{1a}
	BSE	80 ^{2a}	70 ^{1a}	580 ^{3b}	90 ^{1a}
Integridad Membranal (Inverso de la velocidad de salida de electrolitos)	ASE	0.4	nd	0.3	nd
	MSE	0.6	nd	0.4	nd
	BSE	1.1	nd	0.6	nd
Acumulación de H ₂ O ₂ (nmol eje ⁻¹)	ASE	407 ^{1a}	90 ^{1b}	380 ^{1a}	250 ^{1c}
	MSE	488 ^{2a}	150 ^{1b}	450 ^{2a}	230 ^{1c}
	BSE	403 ^{1a}	110 ^{1b}	430 ^{2a}	120 ^{2c}
Capacidad de generación de O ₂ ⁻ (μmol min ⁻¹ eje ⁻¹)	ASE	1.3 ^{1a}	1.1 ^{1a}	2.4 ^{1b}	2.7 ^{1b}
	MSE	1.9 ^{2a}	1.9 ^{2a}	2.5 ^{1b}	2.5 ^{1b}
	BSE	2.9 ^{3a}	2.7 ^{3a}	3.0 ^{2a}	3.1 ^{2a}

ASE= alta sensibilidad al envejecimiento, MSE= mediana sensibilidad al envejecimiento, BSE= baja sensibilidad al envejecimiento

HR= humedad relativa

srt= sustancias reactivas a tiobarbitúrico

CONTROL= semillas almacenadas a 4°C y 50% HR

ENVEJECIDO= Semillas almacenadas a 30°C y 75% de HR

0 horas de imbibición= semilla sin embeber (no germinadas)

24 horas de imbibición= semilla embebida por 24 horas (germinada)

Los números diferentes indican diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) entre valores de la misma columna.

Las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) entre valores colocados sobre el mismo renglón.

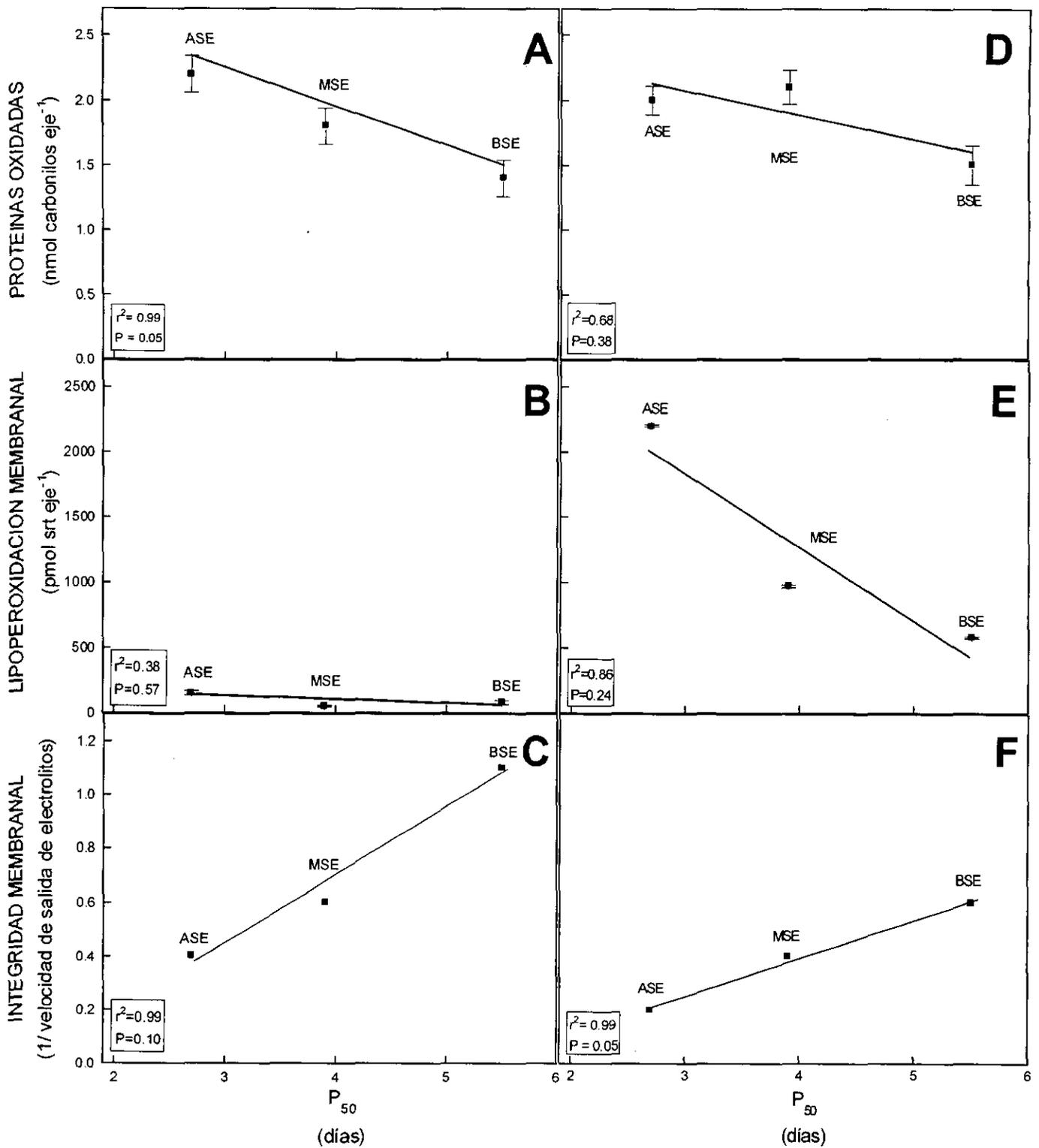


Figura 4. Correlación entre la sensibilidad al envejecimiento (P_{50}) de diferentes cultivares de maíz y algunos parámetros indicadores de daño oxidativo. Las determinaciones se realizaron en ejes embrionarios aislados de semillas control (A, B, C) y envejecidas (D, E, F).
srt= sustancias reactivas a tiobarbitúrico

Por otro lado, antes de la imbibición, el nivel de H_2O_2 fue mayor en el material de MSE que en los otros dos (Tabla 2: columna control, 0 h de imbibición), mientras que la producción del radical superóxido, O_2^- , por partículas submitocondriales, fue mayor a medida que se incrementó la SE (Tabla 2: columna control, 0 h de imbibición), mostrando una correlación positiva ($r^2= 0.99$ y $P=0.04$) con ésta (Fig. 5).

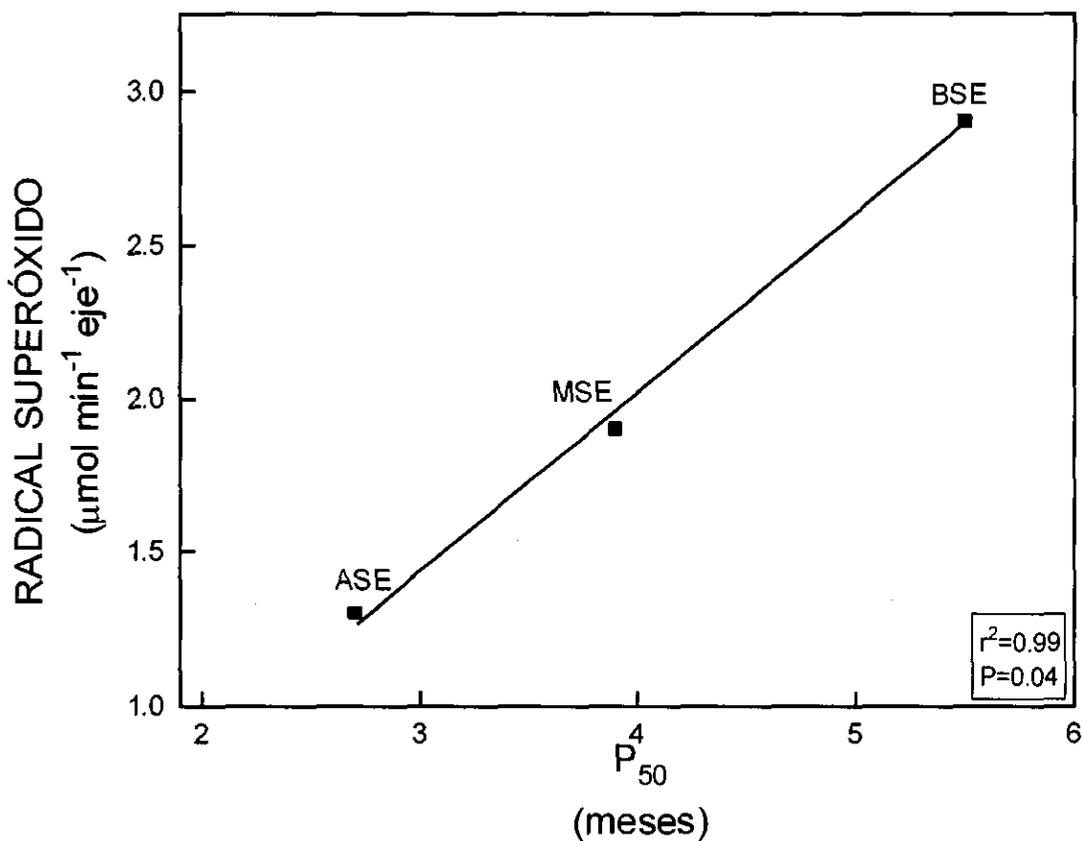


Figura 5. Correlación entre la capacidad de generación del radical superóxido y la sensibilidad al envejecimiento, evaluada como P_{50} , para diferentes cultivares de maíz. Las determinaciones se realizaron en partículas submitocondriales aisladas de ejes embrionarios de semillas control.

Otro factor que podría relacionarse con diferencias en la sensibilidad al envejecimiento es el nivel de defensa frente a ERO, constituido por la actividad de las enzimas del sistema antioxidante al inicio de la germinación. Para evaluar esta posibilidad, se cuantificaron las actividades de algunas de las enzimas involucradas en la eliminación de EROs. La actividad de SOD, la enzima encargada de dismutar el O_2^- y generar H_2O_2 , fue mayor en el material de BSE que en los otros dos y entre ellos fue semejante (Tabla 3: columna control, 0 h de imbibición).

TABLA 3. Efecto del envejecimiento y la imbibición sobre la actividad de la superóxido dismutasa en semillas control y envejecidas de tres materiales de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. El tratamiento de envejecimiento fue de 30°C y 75% HR durante 4 meses para todos los materiales

Material	SOD ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ eje}^{-1}$)			
	CONTROL		ENVEJECIDO	
	0	24	0	24
ASE	2.11 ^{1a}	4.42 ^{1b}	1.13 ^{1c}	0.75 ^{1c}
MSE	2.35 ^{1a}	4.49 ^{1b}	1.77 ^{2c}	1.20 ^{2d}
BSE	2.61 ^{2a}	4.75 ^{1b}	2.39 ^{3a}	1.98 ^{3c}

ASE= alta sensibilidad al envejecimiento, MSE= mediana sensibilidad al envejecimiento, BSE= baja sensibilidad al envejecimiento

CONTROL= semillas almacenadas a 4°C y 50% HR

ENVEJECIDO= semillas almacenadas a 30°C y 75% de HR

0 horas de imbibición= semilla sin embeber (no germinada)

24 horas de imbibición= semilla embebida por 24 horas (germinada)

Los números diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre valores colocados en la misma columna.

Las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre valores colocados sobre el mismo renglón.

Para la eliminación del H₂O₂ trabajan conjuntamente, las peroxidasas (POD) y la catalasa (CAT). La actividad de esta última fue semejante en los tres cultivares (Tabla 4: columna control, 0 h de imbibición), mientras que la actividad de POD fue similar en los materiales de MSE y BSE y significativamente mayor que en el de ASE.

Tabla 4. Efecto del envejecimiento y la imbibición sobre la actividad de la peroxidasa y la catalasa en semillas control y envejecidas de tres materiales de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. El tratamiento de envejecimiento fue de 30°C y 75% HR para todos los materiales

Material	POD				CAT			
	(μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ eje ⁻¹)				(nmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ eje ⁻¹)			
	CONTROL		ENVEJECIDO		CONTROL		ENVEJECIDO	
Imbibición (h)	0	24	0	24	0	24	0	24
ASE	3.0 ^{1a}	84.5 ^{1b}	1.7 ^{1c}	52.7 ^{1d}	1.3 ^{1a}	1.1 ^{1a}	0.4 ^{1b}	0.6 ^{1b}
MSE	8.0 ^{2a}	79.6 ^{1b}	7.7 ^{2a}	82.3 ^{2b}	0.8 ^{1a}	0.6 ^{2a}	0.8 ^{2a}	0.3 ^{2b}
BSE	8.2 ^{2a}	89.1 ^{1b}	8.3 ^{2a}	87.0 ^{2b}	1.1 ^{1a}	1.3 ^{1a}	0.9 ^{2a}	1.3 ^{3a}

ASE= alta sensibilidad al envejecimiento, MSE= mediana sensibilidad al envejecimiento, BSE= baja sensibilidad al envejecimiento

CONTROL= Semillas almacenadas a 4°C y 50% HR

ENVEJECIDO= Semillas almacenadas a 30°C y 75% de HR

0 horas de imbibición= semilla sin embeber (no germinada)

24 horas de imbibición= semilla embebida por 24 horas (germinada)

Los números diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre valores colocados en la misma columna.

Las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre valores colocados sobre el mismo renglón.

Los contenidos de proteínas solubles oxidadas, así como la lipoperoxidación y la pérdida de integridad membranal en los diferentes cultivares se incrementaron durante el envejecimiento en el almacén, de forma tal que se mantuvo la correlación entre estos parámetros y la SE de manera similar a la observada en

las semillas control no embebidas (Fig. 4D, 4E y 4F). La producción del radical O_2^- , se incrementó en los diferentes cultivares, de manera que los materiales envejecidos de ASE y MSE produjeron una cantidad de esta especie similar entre sí y menor que la del material de BSE (Tabla 2: columna envejecido, 0 h de imbibición). Después del envejecimiento de las semillas y al igual que en otros reportes, se detectó una correlación positiva ($r^2=0.96$ y $P=0.18$) entre el grado de lipoperoxidación y la pérdida de integridad membranal (Figura 6).

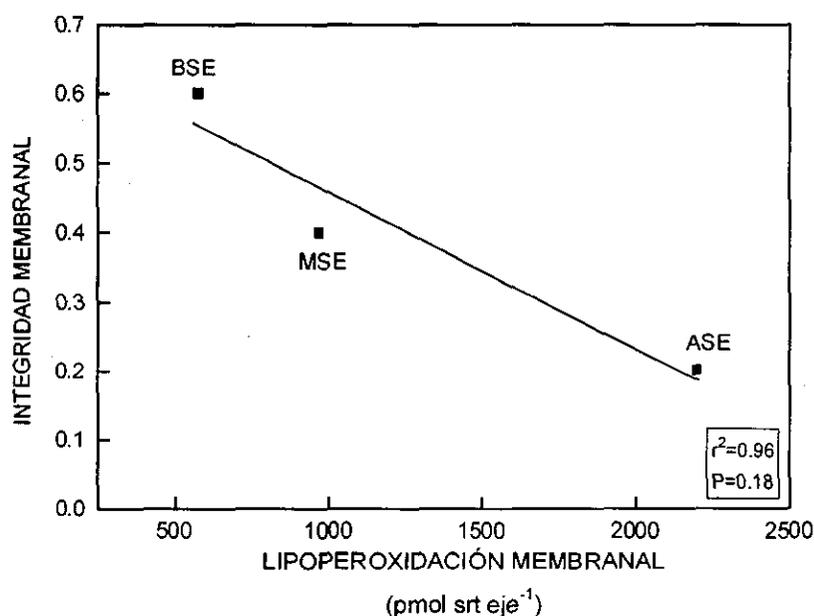


Figura 6. Correlación entre la integridad membranal de ejes embrionarios envejecidos de maíz y su grado de lipoperoxidación. Los materiales fueron envejecidos a 30°C y 75% de humedad relativa. La integridad membranal se determinó calculando el inverso de la velocidad de salida de electrolitos de cada material, mientras que la lipoperoxidación membranal se estimó como el contenido de sustancias reactivas a tiobarbitúrico (srt) en fracciones microsomales.

Respecto a la actividad enzimática antioxidante, se observó que después del envejecimiento, la actividad de SOD disminuyó de manera significativa en los materiales de ASE y MSE (Tabla 3: columna envejecido, 0 h de imbibición) y la de POD y CAT solamente en el material de ASE (Tabla 4: columna envejecido, 0 h de

imbibición). La actividad detectada para SOD después del envejecimiento, presentó una correlación positiva ($r^2=0.99$ y $P=0.06$) con el P_{50} (Fig. 7) a diferencia de lo observada en semilla control, donde ninguna actividad de las enzimas antioxidantes correlacionó con este indicador de SE. Los resultados anteriores sugieren que las semillas envejecidas del material de ASE, inician la imbibición con desventajas para una germinación exitosa, debido a la posible proliferación de macromoléculas oxidadas, daños membranales y la baja actividad de enzimas para la detoxificación de ERO.

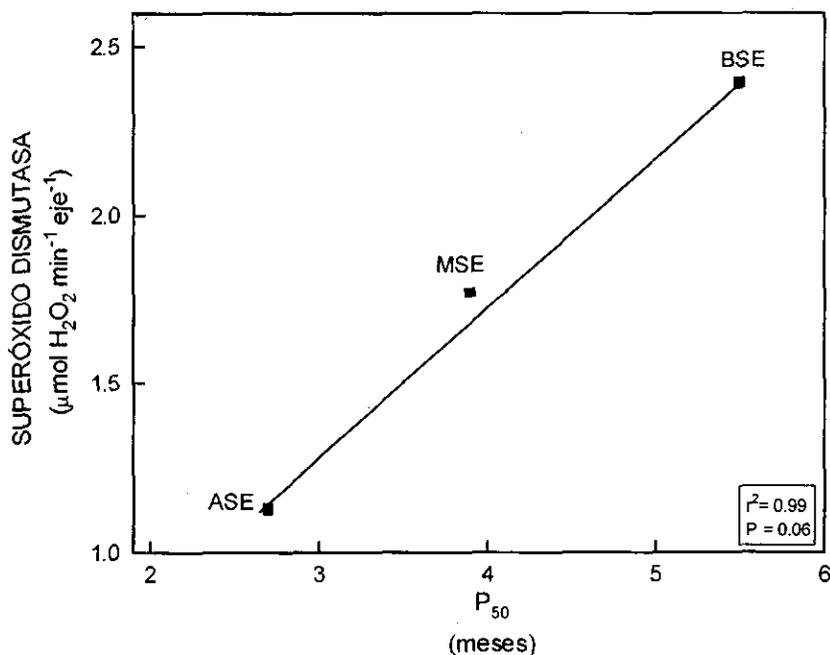


Figura 7. Correlación entre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en semillas envejecidas a 30°C y 75% de humedad relativa y la sensibilidad al envejecimiento (P_{50}) de diferentes cultivares de maíz.

La imbibición de semillas control promueve el incremento de la actividad de las enzimas del metabolismo del H₂O₂, reduce el contenido de esta ERO y la lipoperoxidación membranaral

Durante los tiempos iniciales de la germinación tiene lugar la reactivación de los procesos metabólicos que se redujeron en la fase de secado, durante el desarrollo de la semilla y que serán determinantes para el posterior establecimiento de la plántula. A las 24 h de imbibición de los ejes embrionarios aislados de semillas control, el contenido de proteínas oxidadas se incrementó respecto a la que presentaban las semillas antes de la imbibición, mientras que la lipoperoxidación membranaral disminuyó en el material de ASE y se mantuvieron sin variación en los otros dos cultivares. Por otro lado, el contenido de H₂O₂, mostró una tendencia general a la disminución y la producción de O₂⁻ se mantuvo (Tabla 2: comparar control 0 y 24 h de imbibición).

La imbibición promovió un incremento de la actividad de SOD y POD (Tablas 3 y 4: comparar control 0 y 24 h de imbibición) a un nivel semejante en los tres materiales para cada una de las enzimas. Se observó un incremento promedio en la actividad, de 2 veces para la SOD, pudiéndose calcular este promedio ya que los tres cultivares partieron de actividades similares. En el caso de POD y considerando la diferente actividad inicial de cada material, el incremento de actividad después de la imbibición fue entre 10 y 28 veces sobre el control. Este último corresponde al cultivar de ASE. La imbibición no modificó la actividad de la catalasa.

Los materiales control, independientemente de los valores absolutos de las especies oxidadas y las ERO, presentaron una viabilidad del 100%. Se consideró

que las diferencias entre los tiempos 0 y 24 h de imbibición, para cada material, representaban un manejo eficiente de estas especies y una adecuada actividad del sistema enzimático de eliminación de ERO.

La acumulación de H₂O₂ se incrementa durante el envejecimiento

Después del envejecimiento, los materiales embebidos por 24 h modificaron su contenido de algunas de las especies oxidadas y de las ERO evaluadas. Los cultivares de ASE y MSE tendieron a disminuir el contenido de proteínas oxidadas mientras el de BSE lo mantuvo (Tabla 2: comparar envejecido 0 y 24 h de imbibición). Todos los materiales envejecidos y germinados por 24 h, redujeron su nivel de lipoperoxidación membranal al mismo nivel que los controles (Tabla 2: comparar control y envejecido, 24 h de imbibición). La capacidad de generación de O₂⁻ no se modificó durante la imbibición de los materiales envejecidos (Tabla 2: comparar envejecido, 0 y 24 h de imbibición), pero con excepción del cultivar de BSE, los niveles de esta ERO fueron mayores que los presentes en sus respectivos controles (Tabla 2: comparar control y envejecido, 24 h de imbibición). Todos los cultivares redujeron el nivel de H₂O₂ acumulado (Tabla 2: comparar envejecido 0 y 24 h de imbibición); pero éste se mantuvo por encima del acumulado en los controles después de la imbibición.

Los datos anteriores, sugerían que la disminución de la viabilidad de las semillas envejecidas podría estar relacionada con la pérdida de la eficiencia para manejar el H₂O₂ durante la imbibición.

Para evaluar la posibilidad anterior, se determinó la actividad de las enzimas SOD, POD y CAT durante la imbibición. Se encontró que como efecto de la imbibición,

los controles aumentaron 2 veces la actividad de SOD, mientras que los cultivares envejecidos la mantuvieron o la redujeron ligera pero significativamente ($\alpha= 0.05$), entre 20 y 30%.

La actividad de POD se incrementó en la misma proporción tanto en los materiales control como en los envejecidos y la actividad final a la que se llegó después de 24 h de imbibición se redujo significativamente sólo en el material de ASE, A6 (38%) (Tabla 4). La actividad de CAT no se modificó, después de la imbibición, ni en los materiales control ni en los envejecidos.

DISCUSIÓN

Durante el almacenamiento, los diferentes materiales perdieron viabilidad, es decir, envejecieron. La velocidad a la que se efectuó esta pérdida de viabilidad fue dependiente del genotipo y fue mayor en condiciones de envejecimiento acelerado (alta temperatura y humedad relativa) que en condiciones de envejecimiento moderado. Sin embargo, independientemente de las condiciones de almacenamiento (Fig. 1), las curvas de sobrevivencia generadas para cada uno de los genotipos mostraron dos fases: una de relativa estabilidad, en la cual la viabilidad del lote disminuyó lentamente y otra de pérdida rápida de viabilidad. La duración de la fase de relativa estabilidad fue dependiente del cultivar y proporcional al P_{50} . Esta fase se ha asociado con un mecanismo protector basado en la formación de estado vítreo en el cual se previene la proliferación de reacciones deletéreas (Bernal-Lugo y Leopold 1995, 1998). El estado vítreo se forma debido a interacciones entre el agua y los grupos hidroxilo de los carbohidratos presentes en la semilla a medida que esta se va secando durante su desarrollo (Smith y Berjak 1995). Debido a la extrema viscosidad que se obtiene en el estado vítreo, las reacciones deletéreas quedan suprimidas temporalmente (Bernal-Lugo y Leopold 1998). Este estado vítreo se ha detectado en semillas secas (contenido de humedad $\leq 8\%$) de diferentes materiales y su estabilidad depende de la temperatura.

En las condiciones de envejecimiento acelerado manejadas en este trabajo, el estado vítreo de la semilla se pierde en menos de dos horas (Bernal-Lugo, datos

no publicados) y a pesar de ello, las curvas de sobrevivencia siguen presentando dos fases. Lo anterior apoya la propuesta de que, además del estado vítreo, la semilla posee mecanismos adicionales que le permiten contender con las reacciones deletéreas que conducen al envejecimiento. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar si existía una correlación entre la protección frente a reacciones oxidativas deletéreas durante el envejecimiento en el almacén y la actividad del sistema enzimático antioxidante formado por la SOD, la CAT y las POD.

Todos los cultivares usados en este trabajo mostraron que a tiempos prolongados de envejecimiento e independientemente de la viabilidad del lote, se llevan a cabo reacciones de oxidación. El tipo de oxidación detectado depende de las condiciones de almacenamiento. Los niveles de lipoperoxidación membranal (Tabla 2 comparar control y envejecido, 0 h de imbibición), que de acuerdo a la literatura son inducidos por el radical superóxido (Winston 1990), se incrementaron de manera significativa en los lotes sometidos a 4 meses de envejecimiento moderado, mientras que en estas condiciones, la oxidación de proteínas solubles, es decir citoplásmicas, no se aumentó. Con excepción del material de BSE, el resto de los cultivares presentó una viabilidad baja en estas condiciones de envejecimiento (fase de pérdida rápida de viabilidad) (Fig. 1). En el caso de las condiciones de envejecimiento acelerado, se detectó la oxidación de proteínas solubles a los 7 días de envejecimiento (fase de pérdida rápida de viabilidad), pero no se observó lipoperoxidación en la fracción microsomal.

Los resultados anteriores sugieren que los procesos oxidativos y por lo tanto, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), son factores deletéreos

importantes durante o al inicio de la fase de pérdida rápida de viabilidad de las semillas. También sugieren que el compartimento celular que se daña, es decir membranas o citoplasma, depende de las condiciones en las que el envejecimiento se lleve a cabo. Este daño diferencial podría deberse a una diferente afinidad por agua debida a la composición química particular de cada compartimento.

Las semillas alcanzaron un contenido de humedad de 19.5% durante el almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado y 13.5% en las de moderado. En estas condiciones el sistema enzimático de defensa frente a la peroxidación no contribuye a la protección de la estabilidad de la semilla, ya que estos contenidos de agua, de manera general no son compatibles la actividad enzimática (Vertucci 1992). Sin embargo, la preservación o la estabilidad de este sistema de defensa durante el envejecimiento en el almacén, parece estar asociada a la capacidad de la semilla para retener la viabilidad, ya que durante la fase de estabilidad relativa o en el umbral entre ésta y la de pérdida rápida de viabilidad, la actividad del sistema SOD, CAT, POD permanece constante o aumenta (HS1 3 días de envejecimiento, Fig. 2 y TEP, Tablas 3 y 4). En contraste, cuando la semilla ha entrado en la fase de pérdida rápida de viabilidad, exceptuando al material de MSE, las actividades de las enzimas supresoras de ERO disminuyen notablemente con respecto a las observadas en el control (HS1 a los 7 días de envejecimiento, Fig. 2 y A6, Tablas 3 y 4). Esta disminución de la actividad de las enzimas del sistema protector contra peroxidación, podría generar una disminución de la capacidad de la semilla para contender con los procesos

oxidativos que se generan durante la germinación, lo que se traduciría en una disminución de la viabilidad de la semilla.

La reactivación metabólica que se lleva a cabo durante las fases iniciales de la imbibición, va acompañada de procesos activos de generación y consumo de especies reactivas de oxígeno como el O_2^- y el H_2O_2 (Puntarulo *et al.* 1988 y 1991; Cakmak *et al.* 1993). Durante este período de la germinación, en semillas de soya la mitocondria es aparentemente la principal fuente generadora de O_2^- (Puntarulo *et al.* 1991) y aproximadamente, 2% del oxígeno consumido por ella, es dismutado a H_2O_2 (Boveris *et al.* 1978). Dado que se ha demostrado que el envejecimiento de las semillas modifica tanto la estructura como la funcionalidad de las mitocondrias (Woodstock *et al.* 1984), es de esperar que durante la germinación de semillas envejecidas estos organitos produzcan mayor cantidad de O_2^- que las semillas no envejecidas. Nuestros resultados son consistentes con ello, ya que las partículas submitocondriales aisladas de ejes de semillas envejecidas, germinadas o no, presentaron mayor capacidad de producción de ese radical que sus controles (Tabla 2). Sorpresivamente, la cantidad de superóxido generado por partículas submitocondriales aisladas de ejes control fue mayor en el material de menor sensibilidad al envejecimiento, como lo indica la correlación positiva entre generación de superóxido antes del envejecimiento y P_{50} (Fig. 5). Lo anterior no se observó en los materiales envejecidos. Este resultado podría explicarse si las mitocondrias de cada uno de los diferentes genotipos control trabajados fueran funcionalmente distintas, es decir, si presentaran, por ejemplo, diferente consumo de oxígeno o cociente respiratoria y el envejecimiento les produzca un daño tal que las haga funcionalmente similares. Aparentemente

este es el caso, ya que las semillas control de cada genotipo tienen una capacidad de producción de O_2^- diferente, mientras que las semillas envejecidas presentan capacidad similar. Además, el consumo de oxígeno durante la germinación de estos ejes también fue diferente para cada cultivar (datos no mostrados). Los datos anteriores se interpretaron en el sentido de que si *in vivo* la capacidad de producción del radical fuese similar a la determinada *in vitro*, la capacidad de formación de este radical no contribuye de manera significativa a la sensibilidad al envejecimiento mostrada por los tres genotipos. Es claro, que la cantidad de ERO disponible para dañar a la célula depende no solamente de la generación, sino del balance entre su producción y su detoxificación. El primer paso para esta eliminación lo constituye la dismutación del radical, la cual depende de la actividad de SOD. La cuantificación de esta enzima en los diferentes genotipos, indicó que aquellos considerados de MSE y ASE, pierden significativamente la actividad de la enzima después del envejecimiento. La actividad remanente correlacionó positivamente con el P_{50} . Si bien la generación de O_2^- era menor en los genotipos de mayor sensibilidad, control o envejecidos (Tabla 2), en los primeros tiempos de imbibición, la cantidad disponible de esta ERO podría causar menor daño debido a la menor actividad de SOD en estos materiales. Esto podría estar relacionado con la diferente viabilidad observada en los distintos materiales bajo las mismas condiciones y a los mismos tiempos de almacenamiento. Para determinar si la pérdida de viabilidad estaba relacionada con proliferación de daños oxidativos, se cuantificaron algunos productos indicadores de daño celular por superóxido: lipoperoxidación membranal, pérdida de integridad membranal y oxidación de proteínas. Se encontró un aumento significativo de la lipoperoxidación membranal

y como ya se ha mencionado, no se observó aumento de la oxidación de proteínas. El aumento en lipoperoxidación detectado en las semillas envejecidas no correlacionó significativamente (Fig. 4E) con la sensibilidad al envejecimiento, pero sí positivamente, con la pérdida de integridad membranal (Fig. 4C y 4F).

El hecho de que el contenido de lipoperoxidos en membranas control sea similar en los tres cultivares, pero que la permeabilidad membranal sea diferente (contrastar Fig. 4B y 4C), sugiere la participación de otros procesos como la actividad de los mecanismos de transporte específicos e inespecíficos diferentes para cada cultivar. También sugiere que la composición química de las membranas de cada cultivar es diferente ya que el aumento en lipoperoxidación inducido por el envejecimiento fue diferente entre materiales (Comparar Fig. 4B y 4E).

Por otro lado, el hecho de que los niveles de lipoperoxidación alcanzados en semillas envejecidas no correlacione con la sensibilidad al envejecimiento, sugiere que además de la lipoperoxidación, otros componentes membranales podrían estar participando en la permeabilidad iónica de las membranas y que éstos podrían afectarse durante el envejecimiento. Entre estos componentes podrían estar algunas bombas, por ejemplo ATPasas y algunos canales iónicos como los canales de sodio, potasio o calcio.

Otro dato que refuerza la propuesta de que la lipoperoxidación no explica todo el fenómeno de pérdida de integridad membranal, es el hecho de que en semillas envejecidas la integridad membranal presentó baja correlación con la lipoperoxidación detectada en el mismo sistema (Fig. 6). Otra interpretación a este tipo de resultados es la de considerar que la cantidad de electrolitos escapados

de la semilla es el resultado del balance entre escape inespecífico, transporte específico y capacidad membranal de reabsorción de iones, todos ellos, procesos que dependen de la composición particular de la membrana que pudiera variar entre genotipos. Se sabe que existen variaciones importantes en la composición de lípidos y ácidos grasos entre especies y familias de plantas (Smith y Berjak 1995).

Durante la germinación de semillas control, el contenido de H_2O_2 disminuyó significativamente con respecto al detectado en semillas secas. La magnitud de esta disminución fue similar para los tres genotipos, indicando que los cultivares control poseen una capacidad similar para detoxificar H_2O_2 . Los datos de la tabla 2 también muestran que el envejecimiento disminuyó esta capacidad de detoxificación, medida como cantidad de H_2O_2 eliminado en 24 h de imbibición o como porcentaje de eliminación con respecto al control. Mas aún, la capacidad remanente de eliminación de H_2O_2 en la semilla envejecida correlacionó positivamente con la sensibilidad al envejecimiento (Fig. 8).

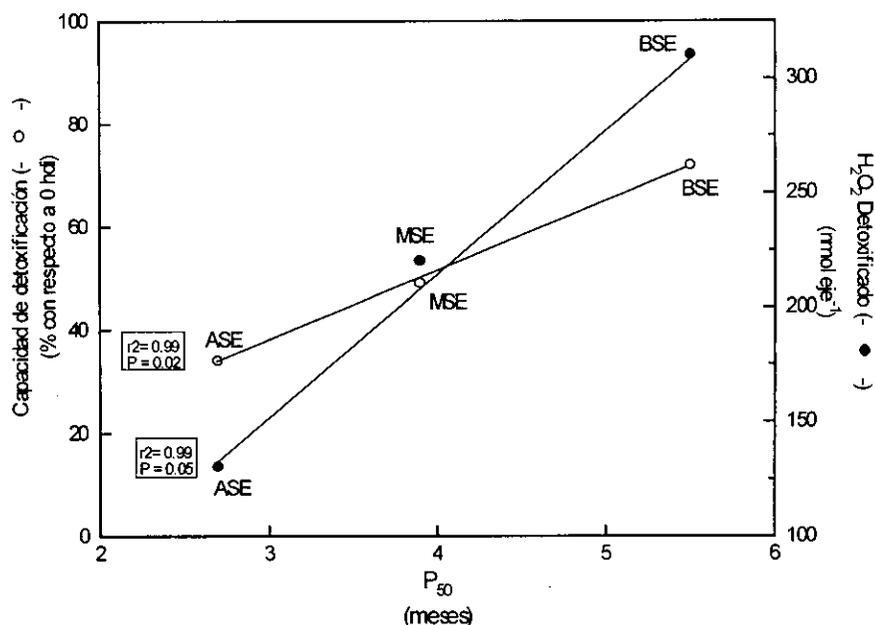


Figura 8. Correlación entre la capacidad de detoxificación de H_2O_2 y la sensibilidad al envejecimiento. El nivel de H_2O_2 se evaluó en semillas envejecidas de cada material a 0 y 24 h de imbibición (hdi). La capacidad de detoxificación se determinó como el porcentaje de H_2O_2 presente a las 24 hdi con respecto al inicial (0 hdi) y como nmoles de H_2O_2 presentes después de la imbibición.

Esta disminución en la capacidad de detoxificación presentó una baja correlación positiva con la actividad de POD remanente en la semilla envejecida y embebida por 24 horas (Fig. 9), cuando se expresó como porcentaje o como H_2O_2 total detoxificado ($r^2=0.92$, $P=0.33$ y $r^2=0.92$, $P=0.33$, respectivamente). Los datos anteriores y el hecho de que la actividad de POD fue en todo momento mayor a la actividad de CAT, sugiere que en nuestro sistema, la POD juega un papel determinante en la detoxificación del H_2O_2 .

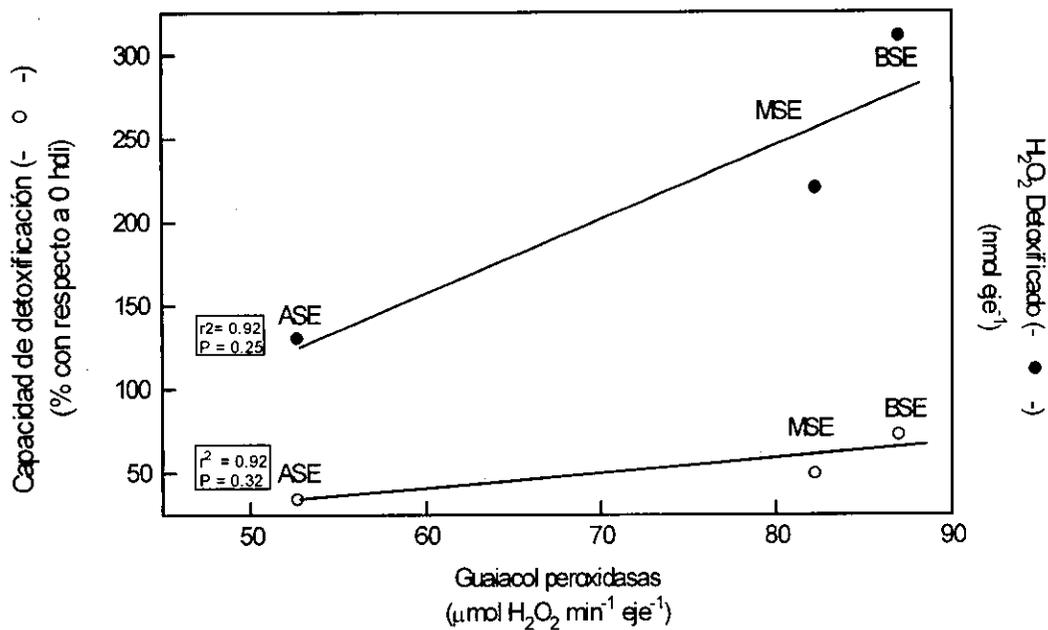
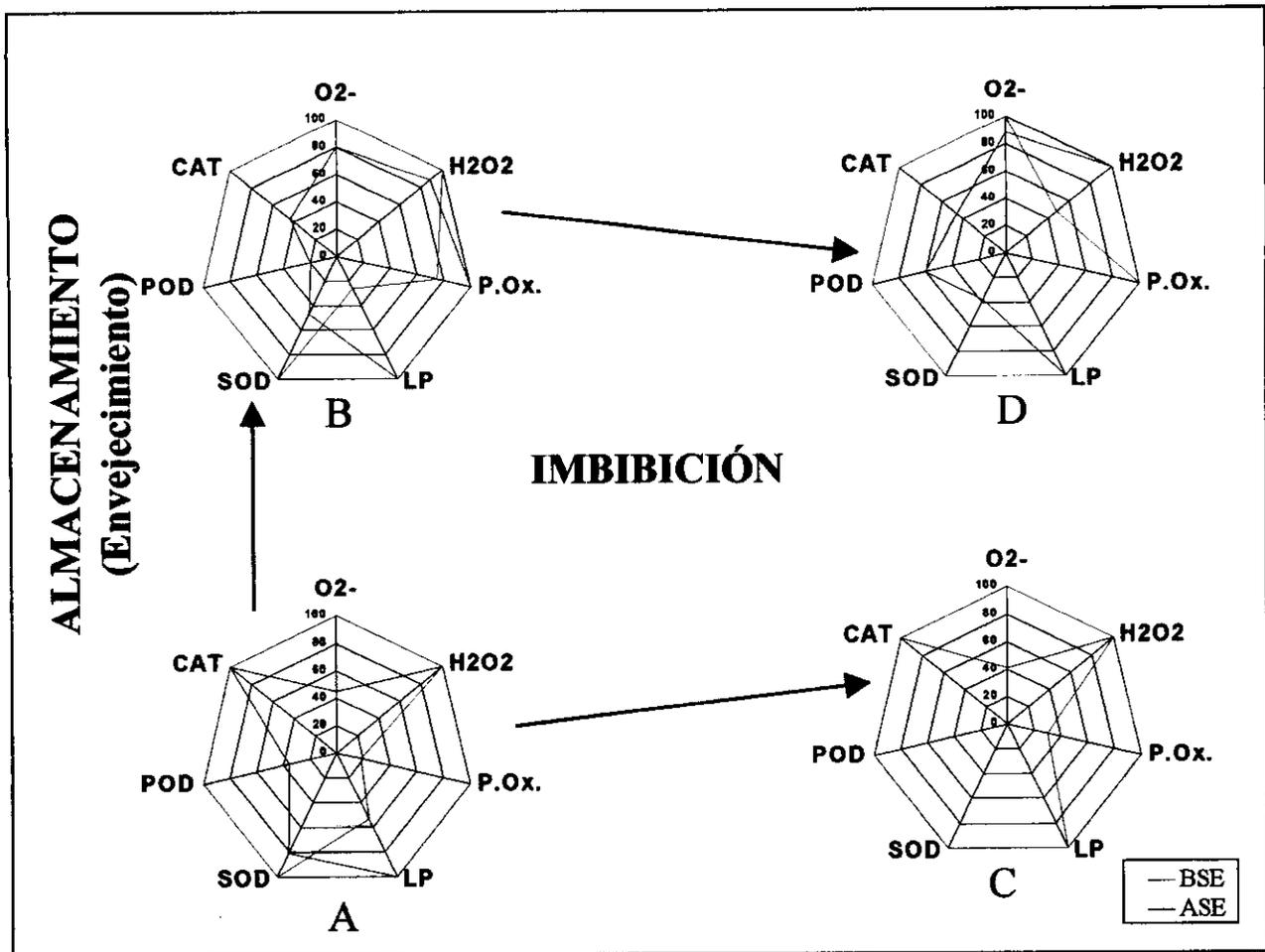


Figura 9. Correlación entre la capacidad de detoxificación de H₂O₂ y la actividad de guaiacol peroxidadas después de 24 h de imbibición (hdi) de ejes embrionarios de semillas envejecidas. El nivel de H₂O₂ se evaluó en semillas envejecidas de cada material después de 0 y 24 hdi. La capacidad de detoxificación se determinó como el porcentaje de H₂O₂ presente a las 24 hdi con respecto al inicial (0 hdi) y como nmoles de H₂O₂ presentes después de la imbibición.

Los datos anteriores, indican que el envejecimiento de las semillas produce un aumento significativo en la generación de O₂⁻, pero no de H₂O₂. Sin embargo, ambos tipos de ERO se acumulan durante la germinación, esta acumulación correlaciona con el grado de envejecimiento que se manifiesta en cada cultivar. Por ello, estas especies deletéreas parecen buenos candidatos a estar relacionados con muchos de los daños que se observan en las semillas envejecidas. La acumulación de O₂⁻ parece ser consecuencia de una mayor capacidad de producción y de una menor capacidad de eliminación. Esta menor capacidad de eliminación se presenta durante el envejecimiento en el almacén. En el caso del H₂O₂, el mecanismo por el cual se acumula no es claro ya que el

envejecimiento de la semilla no induce un aumento en su producción. Los datos tampoco indican claramente que el mecanismo de detoxificación para esta ERO se haya dañado de manera importante, ya que la actividad de POD disminuyó únicamente en el cultivar de ASE, A6. Mientras que en el de MSE, la capacidad de detoxificación disminuyó por el envejecimiento, pero no la actividad de POD (Esquema 2). Estos datos parecen indicar que en la detoxificación del H_2O_2 participan otros mecanismos, por ejemplo, moléculas antioxidantes de bajo peso molecular. Por último, la sensibilidad al envejecimiento de las semillas de maíz correlaciona con la estabilidad en almacén del sistema enzimático detoxificador de ERO.



Esquema 2. La sensibilidad al envejecimiento y la relación entre ERO, indicadores de metabolismo oxidativo y sistema enzimático antioxidante. Las semillas control del maíz de BSE (A), presentaron mayor capacidad de generación de $O_2^{\cdot -}$ y actividad de SOD y POD, así como un menor contenido de proteínas oxidadas (P.Ox.) y lipoperoxidación membranal (LP), que el material de ASE. Estas semillas control pueden ser germinadas (imbibición) o almacenadas (envejecimiento). En el primer caso (C), la capacidad de generación y acumulación de ERO, así como el nivel de LP membranal, se mantuvieron semejantes a los controles en ambos materiales, mientras todas las actividades enzimáticas se incrementaron y se igualaron en los materiales de BSE y ASE. En el caso de que las semillas control almacenadas (B), el envejecimiento se asoció con un decremento de la actividad de SOD, POD y CAT, el cual es fue más drástico en las semillas de ASE, en estas mismas se observaron los mayores niveles de P.Ox. y LP. La imbibición de las semillas envejecidas (D) con alto contenido de indicadores de daño oxidativo (p.Ox. y LP) y baja actividad del sistema enzimático antioxidante (SOD, POD, CAT) no permite el restablecimiento de la actividad de SOD, POD y CAT y se asocia con un incremento de la acumulación de H_2O_2 .

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Independientemente de las condiciones de almacenamiento, las curvas de sobrevivencia de los diferentes materiales utilizados para este trabajo son bifásicas: a) fase de relativa estabilidad y b) fase de pérdida rápida de viabilidad.
2. El envejecimiento está asociado a la oxidación de proteínas solubles o peroxidación membranal al inicio o durante la fase de pérdida rápida de viabilidad.
3. Los procesos oxidativos se realizan en diferentes compartimentos celulares, citoplasma o membranas, dependiendo de las condiciones de almacenamiento.
4. En las semillas envejecidas se incrementa la capacidad mitocondrial de generación de superóxido durante la imbibición
5. En las semillas envejecidas disminuyen las actividades de SOD, CAT y POD.
6. Las semillas envejecidas clasificadas como de ASE presentan menor actividad SOD y POD y mayor acumulación de H_2O_2 que los materiales de BSE.
7. Las semillas envejecidas clasificadas como de ASE presentan un mayor grado de lipoperoxidación y una menor integridad membranal que los materiales de BSE.

CONCLUSIÓN

“La actividad de las enzimas SOD-POD, las cuales son componentes del sistema enzimático que defiende a las células de la peroxidación, está asociada con la protección de las semillas durante el envejecimiento en el almacén y durante su posterior germinación”

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ABREVIATURAS

A6: Híbrido de maíz A6

ADNasa: Nucleasas de ácido desoxirribonucleico

ADNmit= Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ASE: Alta sensibilidad al envejecimiento

BSE: Baja sensibilidad al envejecimiento

CAT: Catalasa

CIMMyT: Centro de Investigación para el mejoramiento del maíz y el trigo

CP: Colegio de Posgraduados (Chapingo, México)

ERO: Especies reactivas de oxígeno

h: Horas

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HR: Humedad relativa

HS1: Híbrido de maíz HS1

min: Minutos

MSE: Mediana sensibilidad al envejecimiento

O₂⁻: Radical superóxido

PEP: Accesión de maíz Pepitilla

POD: Peroxidasa

SE: Sensibilidad al envejecimiento

SOD: Superóxido dismutasa

srt: Sustancias reactivas a tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)

TEP: Accesión de maíz Tepecintle

REFERENCIAS

1. Abdul-Baki AA. 1980. Biochemical aspects of seed vigor. *Hort. Sci.* 15:765-771.
2. Ames BN; Shigenaga MK y Hagen TM. 1995. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271:165-170.
3. Bailly Ch, Benamar A, Corbineau F y Côme D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant.* 104:104-110.
4. Benzi G y Moretti A. 1995. Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.* 19:77-101.
5. Bernal-Lugo I y Leopold AC. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol.* 98: 1207-1210.
6. Bernal Lugo I y Leopold AC. 1995. Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* 5: 75-80.
7. Bernal-Lugo I y Leopold AC. 1998. The dynamics of seed mortality. *J. Exp. Bot.* 49:1455-1461.
8. Boveris A, Sánchez RA y Beconi MT. 1978. Antimycin and cyanide resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.* 92:333-338.
9. Boveris A. 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Meth. Enzymol.* 105:429-441.
10. Buchvarov P y Gantcheff T. 1984. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. *Physiol. Plant.* 60:53-56.
11. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI y Stoppani AOM. 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:248-257.
12. Cakmak I, Strbac D y Marschner H. 1993 Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J. Exp. Bot.* 44:127-132.

13. Chance B y Mahely AC. 1955. Assays of catalase and peroxidase. *Meth. Enzymol.* 2:764-775.
14. Ching TM y Schoolcraft I. 1968. Physiological and chemical differences in aged seeds. *Crop Science.* 8:407-409.
15. Díaz de León Sánchez F. 1993. Contenido de carbohidratos y sensibilidad al deterioro de algunos cultivares de maíz. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química. UNAM.
16. Ellis RH, Hond TD y Roberts EH. 1988. A low-moisture-content limit the logarithmic relations between seed moisture content and longevity. *Ann. Bot.* 61:405-408.
17. Fee JA. 1982. On the question of the superoxide toxicity and the biological function of superoxide dismutases. En King TE, Mason HS y Morrison M (eds): *Oxidases and related redox systems.* New York. Pergamon Press. Pp. 101-149.
18. Fridovich I. 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 41:35-97.
19. Fridovich I. 1978. The biology of the oxygen radicals. *Science.* 201:875-880.
20. Heath RL y Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acids peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198.
21. Hendry GAF. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Sci. Res.* 3:141-153.
22. Hildebrandt AG, Roots I, Tjoe M y Heinemeyer G. 1978. Hydrogen peroxide in hepatic microsomes. *Meth. Enzymol.* 52:342-350.
23. Kadenbach B, Münscher C, Frank V, Müller-Höcker J y Napiwotzi J. 1995. Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mut. Res.* 338:161-172.
24. Leopold AC y Musgrave ME. 1980. Respiratory pathways in aged seeds. *Physiol. Plant.* 49:49-54.
25. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici S, Climent I, Lenz AG, Anh BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Meth. Enzymol.* 186:464- 478.

26. Mckersie BD, Senaratna T, Walker M, Kendall EJ y Hetherington PR. 1998. Deterioration of membranes during aging in plants: evidence for free radical mediation. En: *Senescence and aging in plants*. Noodén LD y Leopold AC. eds. Academic Press Inc.
27. Mehdy MC. 1994. Active oxygen species in plants defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105:467-472.
28. Misra HP y Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 3170-3175.
29. Miquel J. 1991. An integrated theory of aging as the result of mitDNA mutations in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12:99-117.
30. Moreno Martínez E, J. Ramírez González, M. Mendoza Ramírez y G. Valencia Ramírez. 1988. Comparison of mexican maize races stored under adverse humidity and temperature. In: *Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources*. 94-98. *Proceedings of the Global Maize Germplasm Workshop*. CIMMYT. México.
31. Nandi S, Sen-Mandi S y Sinha TP. 1997. Active oxygen and their scavengers in rice seeds (*Oryza sativa* cv. IET 4094) aged under tropical environmental conditions. *Seed Sci. Res.* 7:253-259.
32. Noodén LD. 1988. The phenomenon of senescence and aging. En: Noodén LD y Leopold AC eds. *Senescence and aging in plants*. Academic Press Inc. USA. pp. 1-50.
33. Osborne DJ. 1980. Senescence in seeds. In: Thimann KV, ed. *Senescence in plants*. Boca Raton: CRC Press. pp.13-37.
34. Osborne DJ. 1982. Deoxyribonucleic acid integrity and repair in seed germination: the importance in viability and survival. In Khan A (ed). *The physiology and biochemistry of seeds dormancy and germination*. Elsevier Press. pp. 435-463.
35. Osiewacs HD. 1990. Molecular analysis of aging processes in fungi. *Mut. Res.* 237:1-8.
36. Parrish DJ y Leopold AC. 1978. On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* 61:365-369.
37. Petruzelli L. y Taranto G. 1990. Amylase activity and loss of viability in wheat. *Ann. Bot.* 66:375-378.

38. Priestley DA, Cullinan V y Wolfe J. 1985. Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Environ.* 8:557-562.
39. Priestley DA. 1986. Seed aging: implications for seed storage and persistence in soil. Cornell Univ. Press, Ithaca NY.
40. Puntarulo S, Sánchez RA y Boveris A. 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embrionic axes at the onset of germination. *Plant Physiol.* 86:626-630.
41. Puntarulo S; Galleano M; Sánchez RA y Boveris A. 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embrionic axes during germination. *Biochim. Biophys. Acta.* 1074:227-283.
42. Richter C. 1995. Role of mitochondrial DNA modifications in degenerative diseases and aging. *Curr. Top. Bioenerg.* 17:1-19.
43. Roberts BE y Osborne DJ. 1973. Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescence. *Biochem. J.* 135:405-410.
44. Roberts EH. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1: 499-514.
45. Rotilio G, Calabrese L, Finazzi-Agro A y Mondovi B. 1970. Indirect evidence for the production of superoxide anion radicals by pig kidney diamine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 198:618-620.
46. Senaratna T, Bucharov A y McKersie BD. 1987. Desiccation and free radical induced changes in lipid and protein of cell membranes. *J. Exp. Bot.* 38:2005-2014.
47. Smith MT y Berjak P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. En: *Seed development and germination.* Kiegel J y Galili G. Eds. Dekker. pp.701-746.
48. Stewart RRC y Bewley JD. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65:245-248.
49. Sun WQ y Leopold AC. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiol. Plant.* 94:94-104.
50. Sung JM 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiol. Plant.* 97:85-89.
51. Turrens JF y Boveris A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191:421-427.

52. Vertucci CW. 1992. Towards a unified hypothesis of seed aging. En: Côme D. y Corbineau F. eds. Fourth international workshop in seeds: basic and applied aspects of seed biology. pp. 739-746. AFSIS. Paris.
53. Wettlaufer SH y Leopold AC. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.* 97:165-169.
54. Wilson DO y MacDonald MB. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* 14:269-300.
55. Winston GW. 1990. Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: *Stress responses in plants. Adaptation and acclimation mechanisms.* Wiley-Liss, Inc. pp. 57-86.
56. Wise RR. 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosyn. Res.* 45:79-97.
57. Woodstock LW, Furman K y Solomos T. 1984. Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. *Plant Cell Physiol.* 25:15-26.