

70



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ENZIMAS SUPRESORAS DE ESPECIES REACTIVAS
DE OXIGENO Y SU ASOCIACION CON LA
SENSIBILIDAD AL ENVEJECIMIENTO DE DIFERENTES
ESPECIES DE SEMILLAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
GABRIELA MADRID CUEVAS



MEXICO, D.F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

292955



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. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

Vocal Prof. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

Secretario Prof. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

1er. Suplente Prof. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

2do. Suplente Prof. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Sitio donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, Departamento de Bioquímica,

Conjunto "E", Laboratorio 104

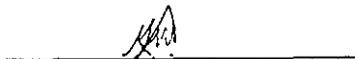
Asesor del tema

Irma Ofelia Bernal Lugo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Ofelia Bernal Lugo', written over a horizontal line.

Sustentante

Gabriela Madrid Cuevas

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gabriela Madrid Cuevas', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS.

A la **Dra. Irma O. Bernal Lugo**, por el apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo, así como también por todo lo que de ella aprendí.

Al **Dr. Rogelio Rodríguez Sotres**, por haberme facilitado las instalaciones de su laboratorio.

A la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**, por sus atinadas correcciones en este trabajo escrito.

Al **Biol. José Luis Busto** y al **M. en C. Carlos Luna**, por permitirme hacer uso de su equipo de laboratorio.

Al **Biol. Oscar Ricardo García Rubio**, por la ayuda técnica que me brindó.

A la **Q. Vanessa Maya Ampudia** y la **M. en C. Adriana Camacho Villanueva**, por su valiosa ayuda en la enseñanza de las técnicas de laboratorio.

Al **Dr. A. Carballo** del Instituto de Genética y Recursos Naturales del Colegio de Posgraduados por proporcionar la semilla de maíz.

Al **Proyecto de CONACYT 4798N: "Identificación de marcadores bioquímicos para la selección de semillas con buenas características de almacenamiento"** que financió este trabajo.

Al **Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación"** de la Facultad de Química de la UNAM que me concedió una beca.

DEDICATORIAS.

A mis padres Gabriela y Adolfo, quienes sin importar las circunstancias, siempre están en mi pensamiento y sentir.

A Mina, por su comprensión y cariño.

A mis hermanos Adolfo y Sonia que tanto quiero.

A mis abuelos que se fueron sin ver aquello en lo que me convertiría.

A mis amigos.

A Oscar, por enseñarme lo bello de vivir.

A mis futuros hijos...

A mi querida e invaluable Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, porque no sólo me dio saber, sino una vida.

©) ————— < —————

**Pienso que es, no sólo mi derecho, sino mi deber,
cuestionar la verdad de todo y la autoridad de todos,
pensar que ninguna cosa es sagrada y que ninguna
cosa ha de ser considerada de religioso respeto.**

Leonardo Woolf.

ABREVIATURAS.

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

CAT: catalasa

cm: centímetros

CN⁻: anión cianuro

Cu/Zn-SOD: superóxido dismutasa
asociada a cobre y zinc

-CH₂-: metileno

EDTA: ácido etiléndiaminotetraacético

ERO: especies reactivas de oxígeno

ES-ERO: enzimas supresoras de
especies reactivas de oxígeno

Fe-SOD: superóxido dismutasa
asociada a hierro

g: gramos

GSH: glutatión

GSH-POX: glutatión peroxidasa

H⁺: átomo de hidrógeno

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HR: humedad relativa

IAA: ácido indolacético

ind⁻¹: individuo⁻¹

MDA: malondialdehído

min: minutos

mL: mililitros

mM: concentración milimolar

Mn-SOD: superóxido dismutasa
asociada a manganeso

NAD-POX: nicotinamida dinucleótido
peroxidasa

ND: no determinado

O: oxígeno atómico

O₂: oxígeno molecular

O₃: ozono

p: plántulas

PM: peso molecular

POX: peroxidasa

r.p.m.: revoluciones por minuto

R[•]: radical libre orgánico

RH: ácido graso insaturado

RO[•]: radical alcoxi

ROO·: radical peroxilo o peroxirradical

ROOH: hidroperóxido

s: semillas

seg: segundos

SOD: superóxido dismutasa

T: temperatura

TG₅₀: tiempo en que se alcanza el 50%

de germinación de las muestras

μL: microlitros

μmol adrenocromo · min⁻¹ · ind⁻¹:

micromoles de adrenocromo por

minuto por individuo

μmol H₂O₂ · min⁻¹ · ind⁻¹: micromoles

de peróxido de hidrógeno por minuto

por individuo

·O₂·: radical superóxido

·OH: radical hidroxilo

¹O₂: oxígeno singulete

CONTENIDO.

ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIV
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 La Semilla.....	1
1.1.1 Ontogenia y Estructura.....	1
1.1.2 Germinación.....	4
1.2 Envejecimiento.....	6
1.2.1 Definición.....	6
1.2.2 Sensibilidad al Envejecimiento.....	7
1.2.3 Características del Envejecimiento de Semillas.....	8
1.3 Estrés Oxidativo.....	10
1.3.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	10
1.3.2 ERO y Envejecimiento.....	13
1.3.2.1 Peroxidación de Lípidos.....	14
1.3.3 Mecanismos de Defensa Contra el Estrés Oxidativo.....	17

1.3.3.1 Mecanismos No Enzimáticos.....	17
1.3.3.2 Mecanismos Enzimáticos.....	19
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Particulares.....	27
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 Material Biológico.....	28
2.2 Envejecimiento Acelerado.....	28
2.3 Germinación y Viabilidad.....	29
2.4 Vigor	29
2.5 Obtención de los Extractos Enzimáticos.....	30
2.6 Ensayos de Actividad Enzimática.....	31
3 RESULTADOS.....	33
3.1 Viabilidad, Velocidad de Germinación y Vigor de las Semillas Control.....	33
3.2 Actividad de las ES-ERO en Semillas y Plántulas Control.....	35
3.3 Sensibilidad al Envejecimiento de las Semillas de Maíz, Chícharo y Frijol Soya.....	36
3.4 Efecto del Almacenamiento Subóptimo en los Niveles de ES-ERO de las Semillas de Maíz, Chícharo y Frijol Soya.....	39

3.5 Aumento de la actividad enzimática de las ES-ERO en las Plántulas de las Semillas Almacenadas.	44
4 DISCUSIÓN.....	51
4.1 Viabilidad de las Semillas.....	51
4.2 Actividades Enzimáticas.....	53
4.3 Aumento de la Actividad Enzimática en la Germinación.....	55
5 CONCLUSIONES.....	59
6 BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN.

El proceso de deterioro de las semillas se asocia con la peroxidación de lípidos que probablemente es producto de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y que provoca la pérdida del vigor y la viabilidad de las semillas, disminuyendo consecuentemente sus características nutricionales y agrícolas. La sensibilidad de las semillas al envejecimiento es especie-específica y podría estar asociada a su capacidad de defensa en contra de las ERO. Para probar esta hipótesis, comparamos el efecto del almacenamiento subóptimo (75% humedad relativa [HR], 30°C) en la actividad de tres enzimas de defensa contra el estrés oxidativo: superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX) y catalasa (CAT), en semillas de tres especies con diferente sensibilidad al envejecimiento: maíz, chícharo y frijol soya. Los resultados que se obtuvieron mostraron que en cuanto al deterioro (medido como viabilidad, TG_{50} y longitud radicular), las semillas de maíz fueron las menos sensibles, seguidas por las de chícharo, mientras que las de frijol soya fueron las más sensibles de las tres especies. Por otro lado, se obtuvieron resultados que muestran que la actividad de las enzimas ensayadas disminuye tanto en las semillas como en las plántulas de las tres especies conforme avanza el periodo de almacenamiento subóptimo. Asimismo, el incremento de la actividad

enzimática durante la germinación es diferente para cada especie y para cada periodo de almacenamiento considerados.

De esta manera, los resultados sugieren que la sensibilidad al deterioro de las semillas no depende únicamente de su sistema enzimático de defensa, sino que es probable que también intervengan factores como su contenido de antioxidantes químicos y su composición lipídica entre otros.

INTRODUCCIÓN.

Hallar la forma correcta de almacenar las semillas de un año para la siembra del siguiente fue un invento esencial que cambiaría la forma de vida del hombre, pues se convirtió en agricultor... (Harrington, 1972)".

Aproximadamente el 70% de los alimentos que consumimos se obtiene directamente de las semillas, principalmente leguminosas y cereales, y una gran parte del 30% restante se deriva de animales que se alimentan de ellas (Bewley y Black, 1994). Cada día es más evidente que la productividad, en el ámbito agrícola, no puede aumentarse más de lo que ha aumentado en los últimos años, puesto que mientras la población mundial crece a gran velocidad, la superficie de tierra cultivable disminuye. Por ello, no nos resta más que almacenar y tratar de conservar en buen estado las semillas recolectadas en cada cosecha para utilizarlas en cultivos posteriores o como alimento en el futuro.

El envejecimiento se define como una degeneración crónica de los seres vivos consecuencia de lesiones que se acumulan al paso del tiempo; no necesariamente causa la muerte pero sí incrementa la probabilidad de que ésta ocurra (Noodén, 1988), sobretodo si las condiciones ambientales lo agravan.

Como cualquier ser vivo, las semillas también envejecen y los síntomas de ello van apareciendo gradualmente: primero pierden vigor (siendo una muestra de ello el que se retarde su crecimiento), disminuye su viabilidad y se exagera la susceptibilidad al ataque por patógenos o al estrés ambiental. Conforme el deterioro avanza, la radícula se acorta cada vez más y los cotiledones tienen problemas para deshacerse de la testa. Al final, llega un punto en el cual la testa ya no se rompe al hidratar la semilla: ésta ha muerto (Harrington, 1972).

Los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo el envejecimiento de las semillas durante el almacenamiento aún se desconocen, pero es preciso entenderlos para poder establecer condiciones que disminuyan la velocidad con que ocurre (Ching y Schoolcraft, 1968). Con respecto a ésta se sabe que no sólo está determinada por el contenido de humedad y genotipo de las semillas, sino también por las condiciones de temperatura y humedad relativa (HR) en que se almacenan (Chance y Maehly, 1955) las mismas.

Durante el envejecimiento de las semillas se llevan a cabo reacciones que son posibles principalmente en condiciones de bajos contenidos de humedad (< 20%), como las catalizadas por especies reactivas de oxígeno (ERO) que sabemos se forman de manera natural durante el metabolismo aerobio, o a partir de los lípidos de las semillas que de manera continua son atacados por el oxígeno presente en el aire. De esta manera, el oxígeno -aunque esencial para la vida aerobia- enfrenta a los seres vivos a un constante estrés oxidativo (Scandalios, 1993).

En el pasado, se asoció la rancidez de los lípidos de las semillas con su disminuida capacidad para germinar; hoy día sabemos que durante el envejecimiento de las semillas la presencia de oxígeno puede provocar peroxidación (mediada por ERO) en los ácidos grasos insaturados de los lípidos (Wilson y McDonald, 1986). Las diversas ERO formadas pueden llegar a dañar a las membranas (lípidos y proteínas) y en general a cualquier macromolécula biológica, por lo que se ha planteado que ésta podría ser una de las principales causas del deterioro de las semillas en el almacén que va asociado al envejecimiento (Hendry, 1993). Aunado a esto, se sabe que al inicio de la germinación de las semillas, durante la imbibición se favorecen las reacciones mediadas por ERO, por lo que el daño en las semillas puede ser aún mayor.

¿cómo se forman las ERO? El oxígeno molecular (O_2) es poco reactivo; sin embargo, la reducción por ganancia de cuatro electrones que sufre dentro de las células para convertirse en agua, genera intermediarios más reactivos como el radical superóxido ($\cdot O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el oxígeno singulete (1O_2), entre otros (Hendry, 1993). Estas especies son altamente reactivas y citotóxicas, pueden reaccionar con diversas biomoléculas provocando efectos como la disminución de la fluidez de membranas y la pérdida de electrolitos, que a la larga podrían causar la muerte de las células.

Sin embargo, las semillas no están desprotegidas: poseen diversos mecanismos de defensa en respuesta al estrés oxidativo. Éstos pueden ser no enzimáticos y

enzimáticos. Entre los primeros encontramos a los antioxidantes químicos como tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (provitamina A), glutatión (GSH) y otros, mientras que entre los segundos se encuentran las peroxidasas (POX), superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y otras enzimas que acarrear, neutralizan o eliminan las ERO (Hendry, 1993).

Por otro lado, se ha demostrado que diferentes especies de semillas muestran distinta sensibilidad al envejecimiento aún cuando se almacenan bajo condiciones similares; por ejemplo, a 10 °C y 50 % HR (humedad relativa), un lote de semillas de jitomate requiere 20 años de almacenamiento para que su viabilidad disminuya al 50%, mientras que lotes de maíz y chícharo requieren 10 y 16 años, respectivamente y lotes de frijol soya requieren alrededor de 3 años (Priestley *et al.*, 1985). Se piensa que es probable que estas variaciones en la sensibilidad al envejecimiento sean indicativas de su incapacidad para proteger o reparar sus sistemas celulares durante el almacenamiento o durante la rehidratación, resultando de ello la pérdida de viabilidad y su bajo valor nutricional. En otras palabras, tal vez se deba a una distinta eficiencia de sus sistemas de defensa para inactivar las ERO, por lo que se propone que éstos son más eficientes en semillas con baja tendencia a envejecer, que en aquellas que presentan mayor sensibilidad.

ANTECEDENTES.

1.1 LA SEMILLA.

1.1.1 Ontogenia y Estructura.

La semilla es el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de muchas especies vegetales, pues contiene las sustancias nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una nueva planta. Cada planta produce sus propias semillas cuya ontogenia, morfología, anatomía, histología, constitución genética y composición química varía notablemente de acuerdo con la especie.

Las semillas se originan de óvulos fertilizados y al llegar a la madurez constan de testa, endospermo y embrión (Figura 1). La testa se forma a partir de los integumentos del óvulo y su importancia es considerable para la semilla, ya que en ocasiones es la única barrera entre el embrión y el medio externo. Es generalmente una capa dura y su naturaleza protectora se debe a la presencia de una cutícula externa y otra interna, las cuales pueden contener ceras o grasas y una o más capas de una pared celular. Estas características confieren a la testa ciertas propiedades de impermeabilidad, con lo que logra un efecto de regulación mecánica sobre el metabolismo de la semilla.

El endospermo o material de reserva se forma de la fusión entre 2 núcleos polares del óvulo y un núcleo espermático (es triploide); químicamente está constituido por diversas sustancias entre las que destacan carbohidratos (almidón y hemicelulosa), lípidos y proteínas. Estos nutrientes son utilizados por el embrión durante la germinación y, posteriormente, por la plántula para sostener las primeras etapas de su crecimiento y desarrollo. La cantidad de endospermo contenida en cada semilla varía de acuerdo con la especie y, sobre esta base, se clasifica a las semillas en endospérmicas (como los cereales) y no endospérmicas (como la mayoría de las leguminosas, las cuales carecen de endospermo en la madurez, debido a que éste es consumido por el embrión durante su desarrollo (Niembro, 1988).

El embrión está formado por el eje embrionario y uno o más cotiledones. El eje embrionario incluye la raíz, el hipocótilo (al cual se unen los cotiledones) y el ápice del tallo con las primeras hojas verdaderas (plúmula); todas estas partes son fáciles de distinguir en las dicotiledóneas, pero en las monocotiledóneas el cotiledón es muy pequeño y delgado, ya que se ha modificado para formar el llamado escutelo; además, de que el coleóptilo rodea a la plúmula y en algunas especies (como el maíz) el hipocótilo se modifica para formar el mesocótilo (Bewley y Black, 1994). Una vez que se han desarrollado, los cotiledones pueden ser gruesos y carnosos para funcionar como órganos de reserva de nutrientes, o delgados y funcionar como órganos para la asimilación de las sustancias de reserva contenidas en el endospermo (Niembro, 1988).

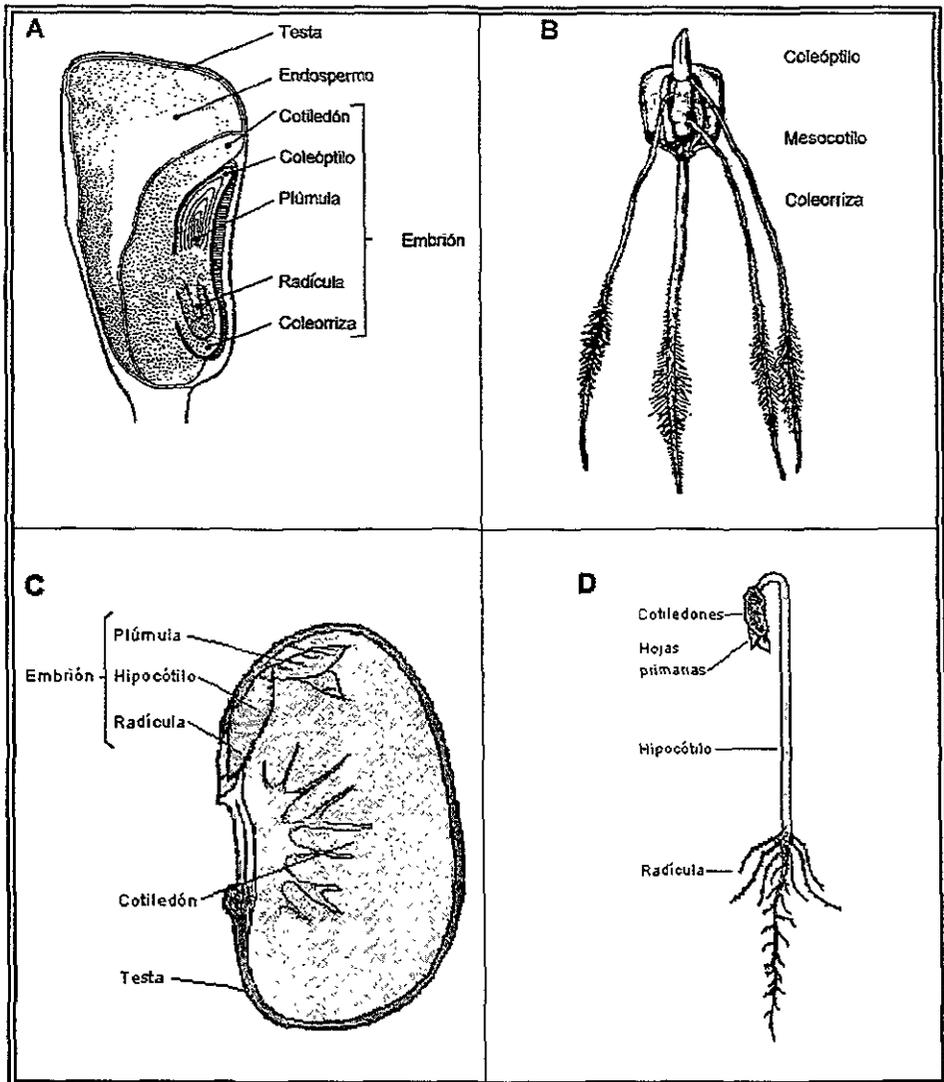


Figura 1. Estructura de las semillas (A, C) y plántulas (B, D) de una monocotiledónea (maíz) (Adaptado de Bewley and Black, 1982) y una dicotiledónea (frijol).

Los cambios que ocurren desde la fertilización hasta la formación de la semilla madura son: diferenciación morfológica y fisiológica de los órganos, adquisición de

la maquinaria metabólica necesaria para el crecimiento, almacenamiento de sustancias nutritivas y, por último, disminución del contenido de agua (deseccación). Una vez llegada la madurez, la semilla puede pasar a un estado de letargo o latencia (semillas ortodoxas) en el cual el crecimiento activo se suspende; o bien puede seguir su crecimiento hacia plántula, dependiendo de las condiciones ambientales que la rodean, como luz, temperatura y humedad, así como de la permeabilidad de la testa al agua y la presencia de inhibidores de la germinación en la semilla (Esau, 1977; Villiers, 1978).

1.1.2 Germinación.

Cuando la semilla seca y viable se embebe (toma agua) se inicia una serie de eventos que culmina con la protrusión de la radícula, tiempo en que se considera que la semilla ha germinado (Bewley y Black, 1994). Generalmente, se acepta que la germinación ocurre en tres fases (Figura 2), las cuales delimitan claros cambios en el metabolismo -hasta este momento casi imperceptible- de la semilla.

Fase i.

Esta fase se caracteriza por un incremento tanto del consumo de oxígeno como de la masa de la semilla. Hay una toma rápida de agua debida a la hidratación de los componentes de la semilla (proteínas, lípidos y carbohidratos, entre otros) y ocurre la reactivación de las moléculas y organelos formados y almacenados durante la maduración de la semilla. Dado que se trata de eventos de naturaleza fisicoquímica, tanto semillas viables como no viables pueden presentar esta fase.

Fase II.

Se caracteriza por una meseta metabólica en la cual se mantienen constantes el consumo de oxígeno y el incremento en masa. Se incrementa la síntesis de ATP, sustratos, coenzimas y proteínas, ADN, ARN, para formar los organelos y membranas, etc.; todo esto se realiza a expensas de las reservas almacenadas en el endospermo y los cotiledones.

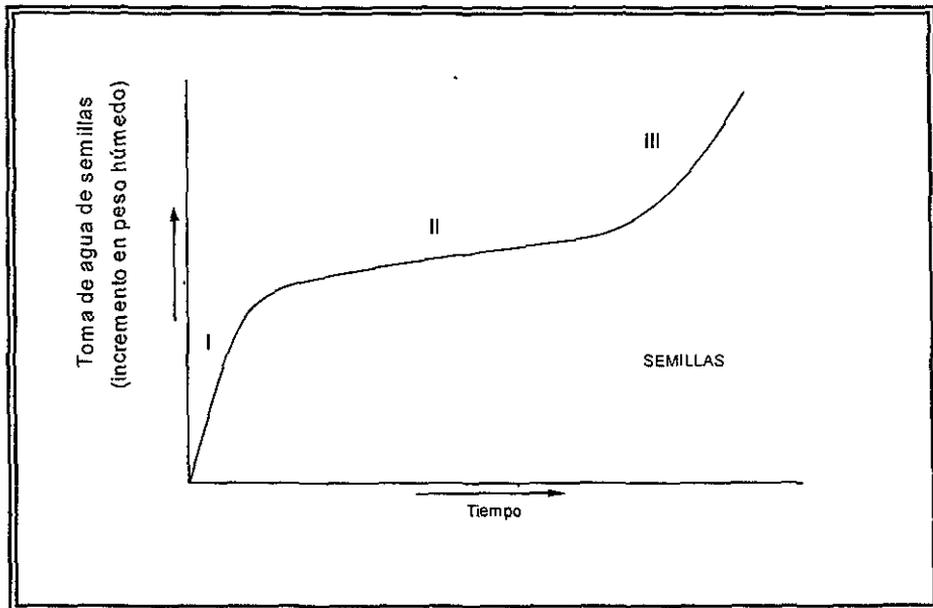


Figura 2. Patrón de la toma de agua de semillas en germinación (Adaptado de Bewley and Black, 1982).

Fase III.

En esta fase se completa la germinación, lo cual se manifiesta con un segundo aumento en el consumo de oxígeno (asociado con la protrusión de la radícula), la

radícula crece hasta convertirse en la raíz primaria y el epicótilo da origen al tallo y las primeras hojas.

1.2 ENVEJECIMIENTO.

1.2.1 Definición.

El envejecimiento es un proceso natural que ocurre a todo organismo vivo y, por lo general, se facilita cuando los organismos se encuentran bajo algún estrés (Ching y Schoolcraft, 1968). Comprende una serie de eventos pasivos o no regulados provocados principalmente por factores exógenos; es una degeneración crónica consecuencia de lesiones acumuladas con el tiempo. El envejecimiento no necesariamente causa la muerte pero sí disminuye la resistencia de los organismos al estrés, lo que incrementa la probabilidad de que mueran. En cualquier caso, la principal característica de la muerte celular sea cual fuere su causa, es la inhabilidad de las células para mantener la homeostasis, tal como se ve en las semillas envejecidas (Noodén, 1988). Éste es un fenómeno fisiológico

Para las semillas, el envejecimiento implica una serie de cambios degenerativos irreversibles en su calidad (como alimento y/o para ser cultivadas) después de que han madurado por completo; durante el almacenamiento, las semillas mantienen su viabilidad durante algún tiempo, antes de entrar a un periodo de rápido decaimiento en el cual se manifiestan desde disminución del vigor hasta pérdida de la viabilidad (Abdul y Anderson, 1972).

1.2.2 Sensibilidad al Envejecimiento.

Dependiendo de las condiciones de humedad relativa (HR) y temperatura (T) que predominen, ciertas zonas geográficas resultan más favorables para mantener la viabilidad de las semillas que otras; sin embargo, sin importar el ambiente, la velocidad con que se deterioran las semillas varía entre especies, variedades y cultivares pues la sensibilidad al envejecimiento que presenta cada una depende de múltiples factores (Priestley *et al.*, 1985).

No existe duda en cuanto a que la información genética de las semillas es la que determina cuan longevas o sensibles a envejecer pueden ser; sin embargo, las condiciones ambientales predominantes al momento en que se desarrollan, así como aquellas a las que se ven sometidas durante su cosecha y almacenamiento, pueden amplificar las diferencias entre especies, variedades o cultivares.

Los cambios ambientales durante la maduración y antes de la cosecha de las semillas influyen en la formación y deposición de las reservas (Smith y Berjak, 1995), mientras que la velocidad con que envejecen generalmente se incrementa cuando aumentan su contenido de humedad y/o temperatura durante el almacenamiento (Harman y Mattick, 1976). A este respecto, Harrington (1972) postuló que la vida en almacén de las semillas se reduce a la mitad por cada aumento de 5°C o cada 1% de HR que se incremente en el almacenamiento;

además, concluyó que cuando ambos parámetros se unen resultan aditivos y, por lo tanto, el deterioro se exagera (Smith y Berjak, 1995).

1.2.3 Características del Envejecimiento de Semillas.

Sabemos que la viabilidad y el vigor de las semillas dependen de la integridad de las macromoléculas y la compartimentalización ordenada de los organelos. En una semilla almacenada, la alteración de estos elementos estructurales y funcionales progresa irreversiblemente como consecuencia de diversas reacciones químicas y fisicoquímicas; por lo tanto, podemos decir que el envejecimiento implica una tendencia al desorden celular. Mecanismos de defensa innatos a la semilla pueden limitar la velocidad con que esto ocurre, pero en las semillas secas, donde el metabolismo es casi nulo y, por ende, los sistemas de reparación no están activos, el nivel de desorganización debe ser elevado. Así, el deterioro de una semilla seca puede llegar a un punto tal que los procesos de reparación normalmente activados durante la imbibición resulten incapaces de reorganizar las células y evitar su muerte (Priestley, 1986).

Las manifestaciones fisiológicas del envejecimiento de las semillas incluyen cambios de color, germinación lenta o retrasada (indicativo de la disminución del vigor), baja tolerancia al estrés ambiental durante la germinación o el almacenamiento, disminución de la viabilidad, etc. (Abdul y Anderson, 1972). Aparte, se identifican diversos eventos bioquímicos como: alteraciones en el ADN y aberraciones cromosómicas, modificaciones en la síntesis de ARN y proteínas

(estructurales y catalíticas), alteraciones en la composición de las reservas, modificación de la actividad mitocondrial, daños membranales, etc. (Smith y Berjak, 1995).

••

Por lo que respecta a las alteraciones en la composición de las reservas, se tiene evidencia de que en las semillas oleaginosas y los cereales la acidez aumenta como consecuencia del envejecimiento. Se piensa que esto es reflejo de la constante producción de ácidos grasos libres por actividad lipolítica, hidrólisis de fitina y proteólisis dentro de las semillas secas. También hay estudios que sugieren que el envejecimiento puede provocar entrecruzamiento de proteínas, que aunado a la actividad proteolítica puede ser factor importante en el daño a diversas enzimas; por lo tanto, no es extraño que haya evidencias que correlacionen la pérdida de viabilidad con una disminución en actividad enzimática (Smith y Berjak, 1995).

Wilson y Mc Donald (1986) sugieren que durante el almacenamiento de las semillas se da un constante flujo de especies reactivas de oxígeno (ERO) como producto de la peroxidación de los lípidos tanto membranales como de reserva, las cuales pueden dañar moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, etc. Así mismo, puede ocurrir daño adicional durante la imbibición, donde se facilitan las reacciones mediadas por ERO (Smith y Berjak, 1995).

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO.

1.3.1 Especies Reactivas de Oxígeno.

El 21% de la atmósfera terrestre está formado por oxígeno. Éste existe en diferentes formas en la naturaleza: ozono (O_3), oxígeno atómico o monooxígeno (O) y -el más abundante- oxígeno molecular o dióxígeno (O_2); Hendry, 1993.

El oxígeno molecular -como tal- es poco reactivo, pero dependiendo de su configuración electrónica y el estado iónico que adopte, puede formar especies altamente reactivas como radicales libres y otros derivados, a los que suele denominarse en conjunto especies reactivas de oxígeno o ERO.

Las ERO son intermediarios reducidos de O_2 formados, entre otros procesos, durante el metabolismo aerobio que transforma el oxígeno en agua (Figura 3); están presentes como subproductos de la fosforilación oxidativa (Gidrol y Lin, 1994), pues se sabe que las cadenas transportadoras de electrones pierden un pequeño porcentaje de dichos electrones en reacciones colaterales dando lugar a éstas ERO (Smith y Berjak, 1995). Las ERO más importantes incluyen al radical superóxido ($\cdot O_2^-$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al radical hidroxilo ($\cdot OH$) y al oxígeno singulete (1O_2). Todas estas especies son citotóxicas y reaccionan de diversas maneras con los componentes celulares. El H_2O_2 y el $\cdot O_2^-$, en presencia de Fe^{2+} , pueden reaccionar entre sí para formar $\cdot OH$, el cual es uno de los oxidantes más agresivos que se conoce pues ataca rápida e indiscriminadamente

cualquier macromolécula dañando severamente a las células, provocando en ellas disfunciones irreparables que las conducen finalmente a la muerte (Scandalios, 1993).

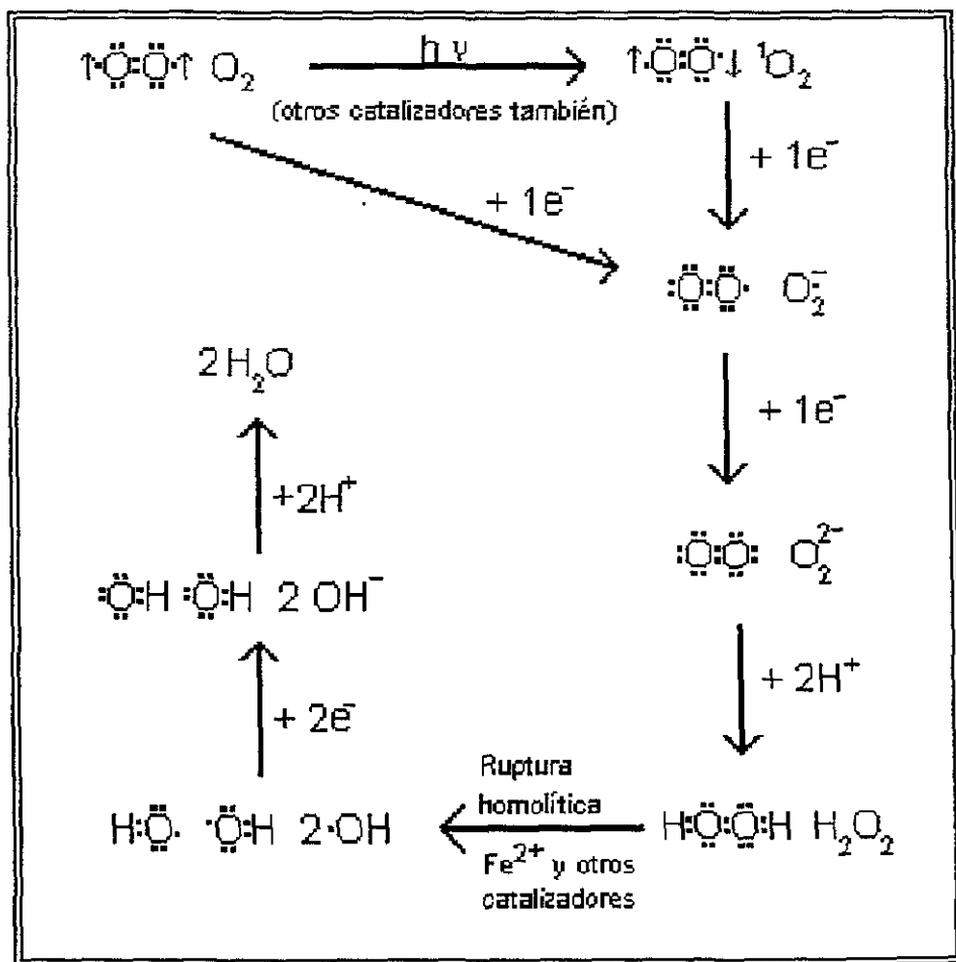


Figura 3. Vías de reducción del oxígeno molecular a agua que pueden dar origen a diversas especies reactivas de oxígeno (Adaptado de Scandalios, 1993).

Las ERO se forman en cantidades significativas en diversos compartimentos y organelos celulares como se puede apreciar en la Tabla 1 (Scandalios, 1993). Por otro lado, su vida media es inversamente proporcional a su reactividad como se aprecia en la Tabla 2 (Reiter, 1995).

Tabla 1. Origen y compartimentalización de las ERO. (Adaptada de Scandalios, 1993).

Localización subcelular.	Tipo de ERO.	Origen de las ERO.
Cloroplasto	$\cdot O_2^-$ H_2O_2	Fotosistema II Enzimático
Mitocondria	$\cdot O_2^-$ H_2O_2	Cadena respiratoria Enzimático
Citoplasma	$\cdot O_2^-$ H_2O_2	Enzimático
Glioxisomas y peroxisomas	H_2O_2	β -oxidación fotorrespiración

Tabla 2. Tiempo de vida media de los oxirradicales a 37°C (Adaptada de Reiter, 1995).

ERO	Símbolo	$t_{1/2}$ a 37°C (seg)
Oxígeno molecular	O_2	$> 10^2$
Radical Peroxilo	$ROO\cdot$	1×10^{-2}
Radical Alcoxi	$RO\cdot$	1×10^{-6}
Oxígeno singulete	1O_2	1×10^{-6}
Radical Superóxido	$\cdot O_2^-$	1×10^{-6}
Radical Hidroxilo	$\cdot OH$	1×10^{-9}

$t_{1/2}$ = tiempo de vida media.

Se ha visto que en las semillas, la producción de ERO puede aumentar bajo ciertas condiciones ambientales o de almacenamiento; cuando la producción de estas especies supera la capacidad celular de eliminarlas, los organismos sufren lo que se denomina estrés oxidativo y, en caso de que éste sea muy severo, las funciones vitales de la célula se verán dañadas (Harman y Mattick, 1976; Gidrol y Lin, 1994).

1.3.2 ERO y Envejecimiento.

Harman (1956) presentó una hipótesis para explicar el envejecimiento en sistemas biológicos; sugirió que existe una causa fundamental del envejecimiento, que se ve modificada por factores genéticos y ambientales, y que involucra un daño al azar mediado por reacciones entre las ERO formadas durante el metabolismo aerobio. Este autor planteó también que el envejecimiento es consecuencia del ataque de las ERO sobre los componentes celulares y, posteriormente, encontró que la peroxidación de lípidos *in vivo* es una de las principales fuentes de formación de ERO en las células (Harman, 1956 en: Wilson y Mc Donald, 1986). Priestley (1986), después de examinar la relación entre la longevidad y los componentes de las semillas (lípidos, proteínas y almidón) notó en las semillas una mayor susceptibilidad a envejecer cuando éstas eran ricas en lípidos. Teorías más recientes sobre el envejecimiento sugieren que en presencia de O₂, los ácidos grasos insaturados pueden oxidarse espontáneamente dando lugar a intermediarios altamente reactivos (ERO), hidroperóxidos y otros subproductos

(Ponquett *et al.*, 1992), los cuales pueden dañar los componentes membranales y diversas macromoléculas (Harman y Mattick, 1976).

1.3.2.1 Peroxidación de Lípidos.

Los ácidos grasos insaturados que forman los lípidos de membrana son altamente susceptibles a la degradación peroxidativa y mientras más insaturaciones posean, más lo son, lo cual resulta en la generación de productos potencialmente tóxicos. La peroxidación en las semillas secas almacenadas, aparentemente es consecuencia de un proceso de autooxidación de sus lípidos, al menos en buena medida (Bewley y Black, 1982). Alternativamente, la lipooxigenasa -enzima presente en muchas semillas secas- también es capaz de producir ERO y por tanto de catalizar lipoperoxidación, empleando los fosfolípidos de las membranas como sustratos (Sung y Chiu, 1995).

El modelo de lipoperoxidación en semillas se enfoca a los lípidos tanto de la membrana, como de reserva. Aunque por su ubicación, los lípidos membranales están más expuestos al ataque peroxidativo, en muchas especies los lípidos de reserva son más importantes, pues se encuentran en mayor cantidad.

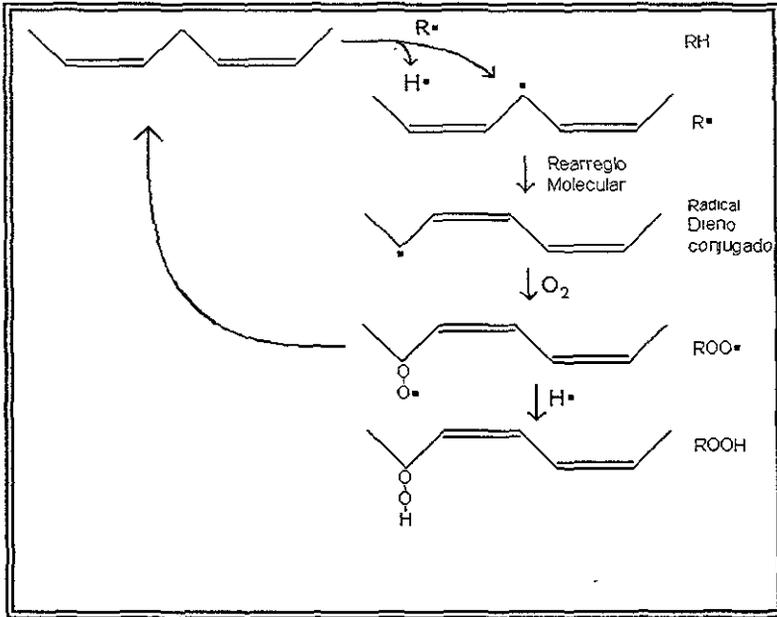


Figura 4. Peroxidación de lípidos (lipoperoxidación). La remoción de un átomo de hidrógeno (H^\bullet) de un ácido graso genera, al final, un peroxirradical que por sí mismo puede retroalimentar la reacción. La adición de O_2 y un H^\bullet al dieno conjugado forman un hidroperóxido (Adaptado de Reiter, 1995).

La peroxidación de un ácido graso insaturado (RH), como lo muestra la Figura 4, se inicia con la eliminación de un átomo de hidrógeno (H^\bullet) a un metileno ($-CH_2-$) adyacente a una insaturación para originar un radical libre orgánico (R^\bullet). Este R^\bullet reacciona con O_2 para formar un peroxirradical (ROO^\bullet) tras un rearrreglo de la cadena y, cuando éste reacciona con un (RH) vecino, se forma un hidroperóxido ($ROOH$) inestable, que se degrada para formar nuevos radicales libres. Un aspecto importante de las reacciones de autooxidación es que son autocatalíticas,

o sea que su velocidad aumenta conforme la reacción progresa y autosostenidas o en cadena (Smith y Berjak, 1995; Reiter, 1995).

Las condiciones de almacenamiento son relevantes con respecto a la inducción y la progresión de las reacciones de peroxidación, pues altas temperaturas y HR propician este tipo de reacciones. Sin embargo, el factor más importante para que ocurra la lipoperoxidación es el tiempo; el almacenamiento somete a los lípidos de las semillas a un lento pero constante ataque por O_2 , lo que conduce a la formación de hidroperóxidos, ácidos grasos oxigenados y ERO que pueden reaccionar con macromoléculas cercanas. Las semillas contienen poca agua como para reparar el daño, por lo tanto, en ausencia de actividad enzimática los ácidos grasos oxigenados se acumulan y no es sino hasta la imbibición que los daños se manifiestan. Cuando las semillas se embeben, las reacciones de peroxidación se detienen conforme éstas se hidratan y se reorganizan sus membranas, además de que la hidroperóxido-licasa se activa y descompone los ácidos grasos oxidados presentes; sin embargo, esta reacción también puede dañar a las semillas, pues se producen más ERO y productos secundarios tóxicos (e.g. aldehídos). Los citocromos también pueden reactivar hidroperóxidos, catalizando nuevos ciclos de lipoperoxidación y contribuyendo así a la muerte de las células (Wilson y Mc. Donald, 1986).

Los productos de la lipoperoxidación tienen diversos efectos en las células: (1) dañan el ADN e impiden la síntesis de proteínas; (2) provocan la oxidación de aminoácidos; (3) pueden causar entrecruzamientos entre proteínas; (4) inhiben

diversos eventos metabólicos (e.g. respiración); (5) inactivan enzimas, y causan otros efectos dañinos (Priestley, 1986).

Pese a lo anterior, las semillas poseen mecanismos de defensa innatos que pueden limitar o detener la lipoperoxidación, o eliminar las ERO producidas en ellas; incluso se piensa que en cierta medida, estos mecanismos de defensa están asociados con la sensibilidad que presentan cada especie, variedad y cultivar de semillas.

1.3.3 Mecanismos de Defensa Contra el Estrés Oxidativo.

Evolutivamente los seres vivos han desarrollado numerosos mecanismos para protegerse del estrés oxidativo. Las plantas, al igual que los animales superiores, sintetizan, además de enzimas, un complemento de defensas moleculares que incluye agentes reductores hidrofílicos y vitaminas liposolubles (Hendry, 1993). Así, los mecanismos en contra del estrés oxidativo quedan divididos en dos categorías: los no enzimáticos y los enzimáticos.

1.3.3.1 Mecanismos No Enzimáticos.

Estos incluyen agentes reductores hidrofílicos como cisteína, glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), uratos, catecolaminas (epinefrina) y otros, junto con vitaminas liposolubles entre las que encontramos tocoferoles (Vitamina E) y

carotenos (provitamina A; Larson, 1988). Sus estructuras químicas se ilustran en la Figura 5.

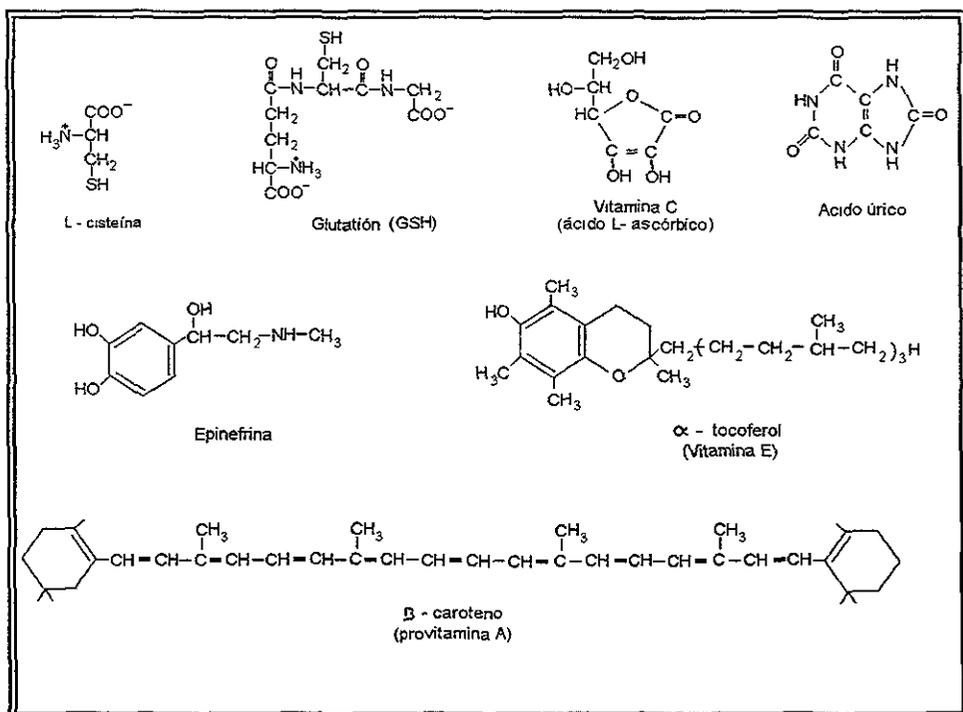


Figura 5. Estructura química de algunos antioxidantes no enzimáticos.

Aunque los agentes reductores hidrofílicos también pueden ser susceptibles a autooxidarse y funcionar como oxidantes bajo ciertas condiciones, su papel de antioxidantes está bien comprobado; como tales, se propone que poseen diversos mecanismos de acción. El ácido ascórbico detoxifica directamente radicales $\cdot\text{O}_2^-$ y $^1\text{O}_2$, se propone que al ser un compuesto hidrofílico tiene la capacidad de prevenir la lipoperoxidación de las membranas eliminando a las ERO del citoplasma de las células antes de que se pongan en contacto con aquéllas, además de su

reconocida capacidad para sufrir reacciones de dismutación con más rapidez que muchos otros compuestos. La actividad del GSH es multifacética, pues se piensa que previene la propagación de las reacciones de peroxidación eliminando radicales alquilo o lipoxilo, además de que impide la inactivación de las enzimas por oxidación de sulfhidrilos) al permitir su oxidación (Kunert y Ederer, 1985).

El α -tocoferol es probablemente el antioxidante más importante que se encuentra incorporado en el interior hidrofóbico de las membranas celulares; éste no sólo protege a la célula detoxificando directamente las ERO, sino que puede evitar la propagación de la peroxidación al donar un electrón a los peroxirradicales formados, rompiendo así la secuencia de reacciones en cadena. El β -caroteno es un pigmento exclusivo de las plantas que las protege de la toxicidad del 1O_2 generado por las reacciones de la fotosíntesis; además, está demostrado que este compuesto es efectivo limitando las reacciones de peroxidación de lípidos por eliminar hidroperóxidos (Newton y Pennock, 1971); sin embargo, estos compuestos dependen a su vez de las enzimas como la glutatión peroxidasa que extrae los radicales libres de la membrana y los transfiere al ascorbato.

1.3.3.2 Mecanismos Enzimáticos.

La existencia de antioxidantes enzimáticos es una de las evidencias más fuertes de que se producen ERO *in vivo*. Representan una línea de defensa crítica, pues en su mayoría impiden que se inicien las reacciones en cadena al eliminar

intermediarios de O_2 parcialmente reducidos como $\cdot O_2^-$ y H_2O_2 . Existe evidencia experimental que indica que la longevidad de las semillas se acorta si se inhibe la actividad de sus enzimas supresoras de ERO (ES-ERO; Sung y Chiu, 1995).

Estas defensas antioxidantes constan de enzimas capaces de eliminar, neutralizar o detoxificar ERO; ejemplos de ellas incluyen superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), peroxidasas (POX) y otras (Winston, 1990).

1. Superóxido Dismutasas.

La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1; SOD) fue aislada por primera vez en 1938 a partir de sangre bovina como una proteína cuya función se pensaba era el almacenar cobre. Ha recibido diferentes nombres, como eritrocupreína, indofenol-oxidasa y tetrazolio-oxidasa. Su función catalítica fue descubierta hasta 1969 por Mc. Cord y Fridovich (Bowler *et al.*, 1992).

Esta enzima es ubicua dentro de las células y está ampliamente distribuida entre los organismos aerobios, anaerobios facultativos y algunos anaerobios estrictos.

La SOD cataliza la dismutación de $\cdot O_2^-$ para producir H_2O_2 y O_2 (Ec. 1).



Todas sus isoenzimas, sin importar su origen o fuente son metaloproteínas multiméricas altamente eficientes en la detoxificación de $\cdot O_2^-$. Se conocen tres

tipos de SOD dependiendo del metal asociado a su sitio activo: cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD) o hierro (Fe-SOD). Con contadas excepciones, las Cu/Zn-SOD se localizan en el citosol de eucariotes y en los cloroplastos; las Mn-SOD se encuentran en la matriz mitocondrial de organismos eucariotes, y las Fe-SOD las podemos encontrar en algunas plantas y diversos procariones. No se conocen SOD extracelulares en plantas (Bowler *et al.*, 1992). Las tres isoenzimas pueden diferenciarse por su sensibilidad a ser inhibidas por cianuro (CN⁻) y H₂O₂ (tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad al cianuro y al peróxido de hidrógeno de las diferentes isoenzimas de SOD.

Isoenzima	Inhibición	
	CN ⁻	H ₂ O ₂
Cu/Zn-SOD	+	+
Fe-SOD	-	+
Mn-SOD	-	-

(+)Sensible, (-)No sensible.

Estructuralmente, se sabe que las Cu/Zn-SOD y la mayoría de las Mn-SOD y Fe-SOD de procariones son dímeros, mientras que las Mn-SOD mitocondriales y de algunas bacterias termofílicas son tetraméricas. Su mecanismo de catálisis emplea la reducción-oxidación alternada del metal asociado a su sitio activo (Scandalios, 1993).

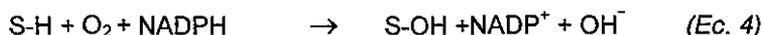
La acción combinada de SOD y CAT evita la formación de radicales ·OH y aunque no se conocen detoxificadores directos de ¹O₂ y ·OH, se piensa que la SOD puede hacerlo al reaccionar químicamente con ellos.

2. Peroxidasas.

El término peroxidasa (POX) incluye a un grupo de enzimas específicas como NAD-POX, NADP-POX, citocromo-POX, GSH-POX, etc., además de un conjunto de enzimas no tan específicas que se denominan simplemente POX (donador: H₂O₂-óxido reductasa, EC 1.11.1.7; Pütter, 1974).

Se sabe que estas enzimas están presentes tanto en procariones como en eucariotes y, que en su mayoría, se trata de hemoproteínas que emplean H₂O₂ para oxidar diversos sustratos orgánicos e inorgánicos. Entre los compuestos orgánicos que pueden oxidar se encuentran fenoles, aminas aromáticas, hidroquinonas y derivados de bencidina como: *o*-cresol, *o*-toluidina, guaiacol, pirogalol, *p*-feniléndiamina, etc. (Pütter, 1974).

Aunque la reacción típica que catalizan es la transferencia de un protón del donador (AH₂) al H₂O₂ para reducirlo a H₂O (Ec. 2), se tiene evidencia de algunas POX actuando como oxidasas (Ec. 3) y mono-oxigenasas (Ec. 4).



En las reacciones clásicas de POX la especificidad por el donador de hidrógenos es muy baja, mientras que la especificidad por el H₂O₂ es mucho mayor; aparentemente, aparte del H₂O₂, sólo compuestos que posean el grupo -O-OH

Como los hidroperóxidos orgánicos (ROOH), pueden actuar como aceptores (Pütter, 1974).

Dependiendo de sus funciones, se conocen dos grupos de peroxidases vegetales:

- a) POX que participan en la lignificación y entrecruzamiento de los polímeros de la pared celular, en la degradación del ácido indolacético (IAA), en la biosíntesis de etileno, en la defensa contra agentes patógenos y en el restablecimiento después de sufrir heridas. Todas estas isoenzimas emplean al guaiacol como donador de electrones *in vitro* y se sabe que los productos de las reacciones que llevan a cabo tienen una función fisiológica dentro de las células (Prasad *et al.*, 1995).
- b) POX que emplean glutatión, citocromo c o nucleótidos de piridina o ascorbato como donadores de electrones *in vivo* y cuya función dentro de la célula es detoxificar H_2O_2 (Prasad *et al.*, 1995).

Ambos grupos son diferentes en términos de su estructura molecular, localización dentro de la célula y función. Por ejemplo, las ascorbato-POX no están glicosiladas y se encuentran en cloroplastos y citoplasma, mientras que las guaiacol-POX son glicoproteínas y se localizan en citoplasma, vacuolas, pared celular y espacio extracelular. Recientemente, se demostró la presencia de dos POX en mitocondrias de maíz, una que emplea guaiacol y otra que emplea citocromo c como donadores de electrones respectivamente; a diferencia de otras POX, la guaiacol-POX mitocondrial no está glicosilada. Puesto que durante la germinación la mitocondria genera estrés oxidativo, se ha sugerido que el papel

intracelular de estas enzimas sea la defensa contra el estrés oxidativo por detoxificación de H_2O_2 (Prasad *et al.*, 1995).

3. Catalasas.

La catalasa (H_2O_2 -óxido reductasa, EC 1.11.1.6; CAT) es una hemoproteína tetramérica que fue aislada y cristalizada por primera vez de tejido hepático por Sumner y Dounce (1937). Esta enzima está presente dentro de los peroxisomas de cualquier célula que posea un sistema de citocromos. Con muy contadas excepciones sólo las bacterias anaerobias estrictas carecen de ella y aunque está presente en las plantas, su concentración en ellas es muy pequeña, razón por la cual se aísla principalmente de tejidos animales y cultivos bacterianos (Aebi, 1974).

Esta enzima tiene un PM de 225 000 a 251 000 daltones (dependiendo de que sistema se trate), y es sensible a O_3 y $\cdot\text{O}_2^-$. Es inhibida por $\cdot\text{O}_2^-$, pues éste es lo suficientemente pequeño como para tener acceso a los grupos hemo, cambiando el estado Redox de la enzima a una forma inactiva denominada ferroxi-CAT (Kono y Fridovich, 1982).

La CAT cataliza la descomposición de peróxidos (H_2O_2 y ROOH) funcionando ya sea como peroxidasa en presencia de donadores de protones (*Ec. 5*) o

HIPÓTESIS.

La diferente sensibilidad al envejecimiento que muestran las semillas de diversas especies está asociada a la eficiencia con que inactivan las especies reactivas de oxígeno, por lo que, la actividad de las enzimas supresoras de éstas será mayor en las especies de semillas menos sensibles al envejecimiento.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar la actividad de las enzimas supresoras de especies reactivas de oxígeno SOD, POX y CAT en tres especies de semillas que presentan diferente sensibilidad al envejecimiento: maíz, chícharo y frijol soya.

Objetivos Particulares.

- Verificar la sensibilidad al envejecimiento de las semillas bajo condiciones de almacenamiento subóptimo.
- Determinar los efectos del almacenamiento subóptimo sobre la viabilidad y el vigor de las semillas.
- Medir las actividades enzimáticas de SOD, POX y CAT tanto en semillas como en plántulas a diferentes tiempos de almacenamiento.
- Determinar los efectos del almacenamiento subóptimo sobre la actividad de las enzimas supresoras de especies reactivas de oxígeno.

MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Material Biológico.

Los experimentos se llevaron a cabo con semillas de maíz (*Zea mays*, híbrido HS1), chícharo (*Pisum sativum*, var. Perfección) y frijol soya (*Glycine max*, var. Cajeme), las cuales se almacenaron a 4°C con sílica gel como agente desecante.

2.2 Envejecimiento Acelerado.

Las semillas se sometieron a un proceso de envejecimiento acelerado almacenándolas, durante diferentes periodos (entre 2 y 10 semanas), en cajas de plástico herméticamente selladas bajo condiciones subóptimas de humedad relativa (HR) y temperatura (75 % y 30 °C, respectivamente); el 75 % de HR se obtuvo introduciendo una solución saturada de cloruro de sodio (39.2 g NaCl en 100 mL de agua) en las cajas. Las semillas fueron previamente tratadas con captán para evitar la infección por hongos.

2.3 Germinación y Viabilidad.

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo a 30°C en la oscuridad, utilizando tanto semillas almacenadas como no almacenadas (controles). En ambos casos, se tomaron cinco muestras de quince semillas cada una, se colocaron entre dos toallas de papel húmedas, se enrollaron y se envolvieron con bolsas de plástico color negro para evitar la entrada de luz. La germinación se monitoreó diariamente durante siete días, considerando una semilla germinada cuando la longitud de su radícula alcanzaba los 2 mm. La viabilidad se estimó tomando en cuenta el porcentaje máximo de germinación alcanzado al cabo de los siete días.

2.4 Vigor.

Para establecer el vigor de las semillas, se emplearon las mismas muestras de los ensayos de germinación y viabilidad, tomándose en cuenta el tiempo en que el 50% de las semillas en cada muestra había germinado (TG_{50}), sin importar la viabilidad obtenida; y la longitud máxima alcanzada por las radículas a los tres días después de iniciado el ensayo de germinación. En ambos casos, las plántulas se midieron manualmente con una escala métrica.

2.5 Obtención de los Extractos Enzimáticos.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en embriones y en plántulas obtenidos por disección manual. Las plántulas se colectaron 35 ± 1 h. después de que las curvas de germinación, tanto de los controles como de los materiales almacenados, habían alcanzado su meseta o máximo.

Los extractos enzimáticos, se obtuvieron de embriones de maíz, ejes embrionarios de chícharo, ejes de frijol soya, y de la radícula y coleóptilo de plántulas. Se tomó diferente número de embriones para preparar los extractos de cada una de las especies: 30 embriones de maíz y frijol soya y 50 embriones de chícharo; en el caso de las plántulas, el número de individuos empleados para los extractos dependió de la viabilidad alcanzada al momento de colectar las muestras.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración (a 4°C los embriones [secos] y a -70°C las plántulas) hasta el momento en que se prepararon los extractos (no más de 48h. después de obtenidas), para lo cual se congeló el tejido con nitrógeno líquido y se trituró en mortero hasta obtener una harina fina que se homogeneizó con 4 mL por gramo de peso fresco de solución amortiguadora 0.1 M de fosfatos, pH 7.8, con 0.1 mM EDTA. Cuando el peso del tejido fue menor de 0.5 g se emplearon 2 mL de solución amortiguadora. El extracto se centrifugó a 3000 r.p.m. (en una centrífuga Beckman GPR) durante 10 min a 4°C ; se desechó la pastilla y el sobrenadante se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El

extracto obtenido se congeló y se almacenó a -70°C hasta llevar a cabo los ensayos de actividad enzimática; este tiempo nunca excedió de 24 h.

2.6 Ensayos de Actividad Enzimática.

Las actividades de las ES-ERO se determinaron a diferentes periodos de almacenamiento subóptimo, los cuales se escogieron cuidando de abarcar toda la curva de sobrevivencia estudiada. Así, para el caso de maíz y chícharo, se eligieron 0, 4 y 7 semanas de almacenamiento, mientras que para el frijol soya se tomaron las semanas 0, 2, 3 y 4 respectivamente; todos los experimentos se iniciaron en cinco preparaciones diferentes y cada determinación por triplicado.

a) Peroxidasa (Chance y Maehly, 1955).

El medio de reacción contenía 500 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 6.7), 200 μL de guayacol 10 mM (donador de hidrógeno), 200 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 10 mM y 100 μL del extracto a ensayar, lo que corresponde a un volumen final de reacción de 1 mL. La actividad se determinó espectrofotométricamente por la formación de tetraguayacol, registrando los cambios de absorbencia a 470 nm durante 5 min a intervalos de 15 seg. Se reporta referido al número de individuos muestreados (ind^{-1}) como: $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$.

b) Superóxido dismutasa (Misra y Fridovich, 1972).

El medio de reacción constaba de 650 μL de solución amortiguadora de carbonatos 50 mM (pH 10.2), 200 μL de EDTA 0.5 mM, 100 μL de extracto y 50 μL de epinefrina 10 mg/mL (disuelta en HCl 10 mM, pH 2) para iniciar la reacción. El pH de la reacción no cambió significativamente con la adición de la epinefrina (Misra y Fridovich, 1972). La actividad se determinó espectrofotométricamente registrando la protección ejercida por el extracto sobre la autooxidación de la epinefrina (o formación del adrenocromo) por las variaciones de absorbencia a 480 nm durante 3 min a intervalos de 10 seg, tomando en cuenta únicamente las lecturas posteriores a la fase *lag* (que tiene una duración de 2 a 3 min) y anteriores a la pérdida de color del adrenocromo. Se reporta como: μmol adrenocromo $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$.

c) Catalasa (Beers y Sizer, 1952).

El medio de reacción se componía de 700 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 200 μL de H_2O_2 50 mM y 100 μL de extracto. La actividad se midió como desaparición de H_2O_2 , registrando el cambio de absorbencia a 240 nm durante 3 min, a intervalos de 20 seg y en celdas de cuarzo. Se reporta como: $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$.

RESULTADOS.

3.1 Viabilidad, Velocidad de Germinación y Vigor de las Semillas Control.

En la figura 6 se muestra la cinética de germinación de las semillas control de maíz, chícharo y frijol soya. Se observa que el maíz y el frijol soya presentan comportamientos muy similares: ambas alcanzan su máximo de germinación a las 40 horas con viabilidades de 99 y 96 % respectivamente, mientras que el chícharo presenta una germinación más lenta, alcanzando su máximo a las 60 horas, con una viabilidad del 91 %. A partir de estos valores, se calcularon la viabilidad (porcentaje máximo de germinación) y el TG_{50} (tiempo al cual el 50 % de las semillas germina) para cada lote de semillas. Adicionalmente, se empleó la longitud radicular como indicador del vigor de las semillas.

Las cinéticas de germinación de las tres especies de semillas fueron diferentes. Esto se reflejó en el TG_{50} (Tabla 4); los parámetros fueron similares para los lotes de maíz y frijol soya, pero el chícharo presentó un TG_{50} mayor que las otras dos especies.

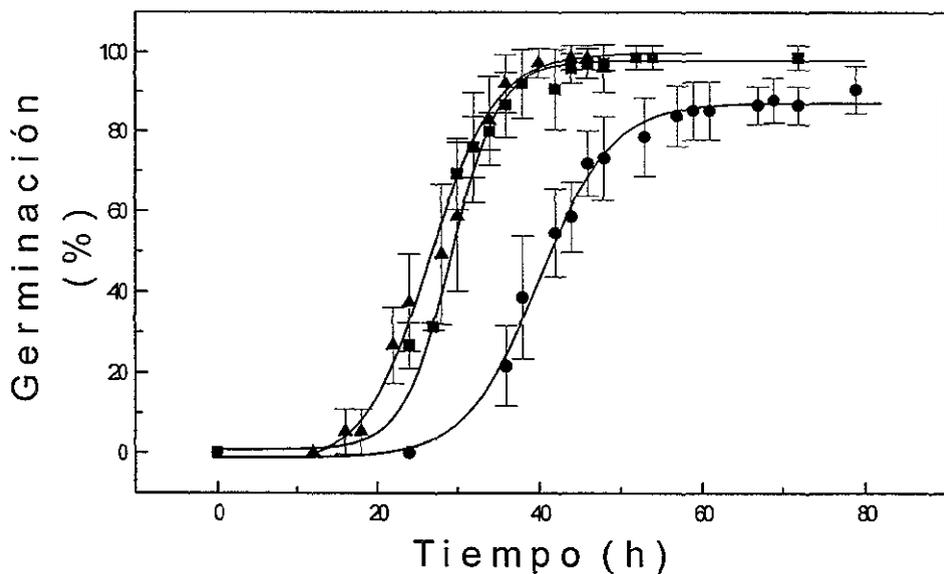


Figura 6. Cinéticas de germinación de las semillas control: (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

Tabla 4. Tiempo para alcanzar el 50% de germinación (TG_{50}). Semillas control de maíz, chícharo y frijol soya.

ESPECIE	TG_{50} (h)
Maíz	29.6
Chícharo	41.5
Frijol soya	26.9

Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

En lo que respecta al desarrollo radicular de las semillas germinadas, a los 3 días de germinación (Tabla 5), se observó que fue mayor en el frijol soya y el maíz que en el

chicharo, lo que concuerda con un mayor tiempo de germinación para esta última especie.

Tabla 5. Longitud de la radícula en semillas control de maíz, chicharo y frijol soya

ESPECIE	Longitud radicular (cm) ^a
Maíz	7.04 ± 0.65
Chicharo	1.65 ± 0.07
Frijol soya	5.67 ± 0.37

Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

^a Medida a los tres días de germinación.

3.2 Actividad de las ES-ERO en Semillas y Plántulas Control.

Para determinar la capacidad de los sistemas detoxificadores de $O_2^{\cdot -}$ y de H_2O_2 en semillas y plántulas control, se cuantificaron las actividades de SOD, POX y CAT. En todos los casos, las actividades de las enzimas por individuo fueron mayores en las plántulas que en las semillas (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX) y catalasa (CAT) en semillas y plántulas control.

ESPECIE	SOD		POX		CAT	
	$(\mu\text{mol a min}^{-1} \text{ ind}^{-1})$		$(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ind}^{-1})$		$(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ind}^{-1})$	
	s	p	s	p	s	p
Maíz	0.66 ± 0.09	2.24 ± 0.21	1.11 ± 0.04	11.63 ± 0.11	0.08 ± 0.006	0.45 ± 0.007
Chicharo	0.07 ± 0.003	5.34 ± 0.47	0.02 ± 0.001	46.51 ± 1.83	0.002 ± 0.00002	0.03 ± 0.002
Soya	0.14 ± 0.008	1.37 ± 0.16	0.10 ± 0.005	6.96 ± 0.15	0.0022 ± 0.00008	0.02 ± 0.0002

a = adrenocromo; ind = individuo (semilla o plántula); s = semillas; p = plántulas.

Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

En las semillas de maíz, las actividades de todas las enzimas fueron mayores que en las otras dos especies, siendo el chícharo el que presenta las actividades enzimáticas más bajas. En las plántulas, las actividades de SOD y POX fueron mayores en el chícharo, seguidas por el maíz y el frijol soya. Además, la CAT es la enzima que presenta la actividad más baja de las tres ES-ERO ensayadas y su mayor valor se encontró en las plántulas de maíz, mientras que la menor se encontró en el frijol soya.

Al comparar las actividades de las ES-ERO en las plántulas con respecto a las semillas, se encontró que las enzimas incrementaron su actividad durante la germinación. Se observó que SOD aumentó 3 veces en maíz, 75 en chícharo y 10 en frijol soya; POX 10, 1900 y 69 veces, respectivamente y CAT 6, 14 y 8 veces en las mismas semillas.

3.3 Sensibilidad al Envejecimiento de las Semillas de Maíz, Chícharo y Frijol Soya.

La sensibilidad al envejecimiento de las tres especies se determinó observando los efectos producidos por el almacenamiento subóptimo (75 % HR y 30 °C) sobre la viabilidad, el TG_{50} y la elongación radicular de las semillas de cada lote.

En las curvas de supervivencia (Figura 7), se observa que cada especie disminuye su viabilidad con diferente velocidad, siendo el frijol soya quien la pierde con mayor rapidez, ya que después de 4 semanas su viabilidad cae al 68 %; aunque este parece un porcentaje de viabilidad elevado, su longitud radicular disminuye un 70% y su TG_{50} aumenta un 95 % con respecto al control. Aunque, a las 4 semanas la viabilidad del chícharo y el maíz permanece sin cambios, a las 7 semanas de almacenamiento la viabilidad del chícharo disminuye a 55 %, mientras que la del maíz se conserva por encima del 90 % aún después de la 10^a semana.

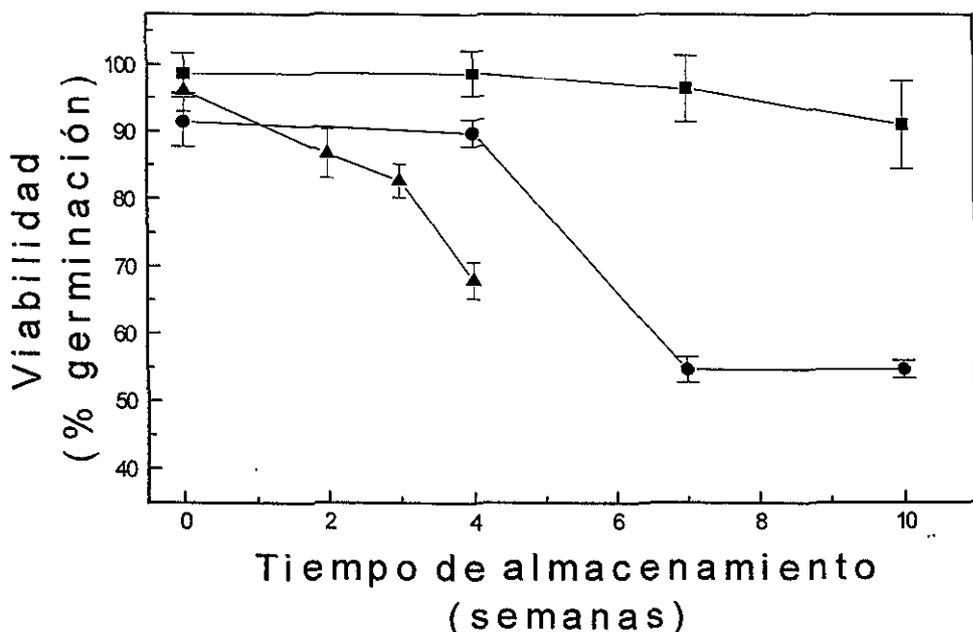


Figura 7. Cinética de supervivencia de las semillas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

El almacenamiento subóptimo también afectó al resto de los parámetros examinados. En la Tabla 7 se observa que el TG_{50} de las tres especies se incrementa con el almacenamiento. El maíz sufrió incrementos en el TG_{50} a 28 % en la 7ª semana y, a la 10ª semana, se incrementó al 75 % del valor control. En cuanto al chícharo, el TG_{50} se incrementó 23 % en la 4ª semana y 174 % a la 7ª semana con respecto al control (a este tiempo, la viabilidad era del 54 %) por último, el TG_{50} del frijol soya aumentó gradualmente de 4 a 20 % entre la 2ª y 3ª semana, para incrementarse hasta el 96 % en la 4ª semana.

Tabla 7. Incremento del TG_{50} en semillas deterioradas.

ESPECIE	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (semanas)					
	0	2	3	4	7	10
	TG_{50} (h)					
Maíz	29.6	ND	ND	27.6	37.9	51.9
				(0.0%)	(28.0%)	(75.3%)
Chícharo	41.5	ND	ND	50.9	113.7	ND
				(22.6%)	(174%)	
Frijol soya	26.9	27.9	32.3	52.6	ND	ND
		(3.7%)	(20.1%)	(95.5%)		

Los números entre paréntesis expresan el valor como porcentaje de aumento del TG_{50} respecto al control. ND = no determinado. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

En lo concerniente a la elongación radicular (Tabla 8), se observa un menor crecimiento; el tamaño de las radículas de maíz a las 4 semanas es 13 % menos que el del control y 77 % menor en la 10ª semana. Mientras que las semillas de chícharo presentan una elongación radicular de 29 a 70 % menos (con respecto al control) entre las semanas 4 y 7 y se mantienen así, hasta la 10ª semana de

almacenamiento. El frijol soya la elongación es 31 % menos (con respecto al control) en la 2ª semana y en la 4ª 55 % menos.

Tabla 8. Efecto del almacenamiento subóptimo en la elongación radicular

ESPECIE	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (semanas)					
	0	2	3	4	7	10
	Longitud (cm)^a					
Maíz	7.04	ND	ND	6.11	3.64	1.6
				(13.2%)	(48.3%)	(77.4%)
Chícharo	1.65	ND	ND	1.17	0.47	0.5
				(29.1%)	(71.5%)	(69.7%)
Frijol soya	5.67	3.9	3.78	2.56	ND	ND
		(31%)	(33.3%)	(54.8%)		

Los números entre paréntesis expresan el valor como porcentaje de disminución de la elongación radicular con respecto al control. ^a Medida a los tres días de germinación. ND = no determinado. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

4 Efecto del Almacenamiento Subóptimo en los Niveles de ES-ERO de las semillas de Maíz, Chícharo y Frijol Soya.

En las semillas de las tres especies, la actividad de SOD disminuyó con el almacenamiento (Figura 8). En el maíz (panel A) la actividad disminuye un 24 % a las 2 semanas para, finalmente, en la 7ª semana caer hasta 70 %. En el chícharo (panel B), la actividad inicial fue 9 veces menor que en el maíz y el almacenamiento subóptimo produjo una disminución en la actividad enzimática de SOD de un 24 % a las 4 semanas mientras que, en la 7ª semana esta disminución llegó a ser del 54 %. En el frijol soya (panel C) la actividad disminuye 18 % en 2 semanas y, posteriormente, baja un 24 y 42 % en la 3ª y 4ª semanas, respectivamente.

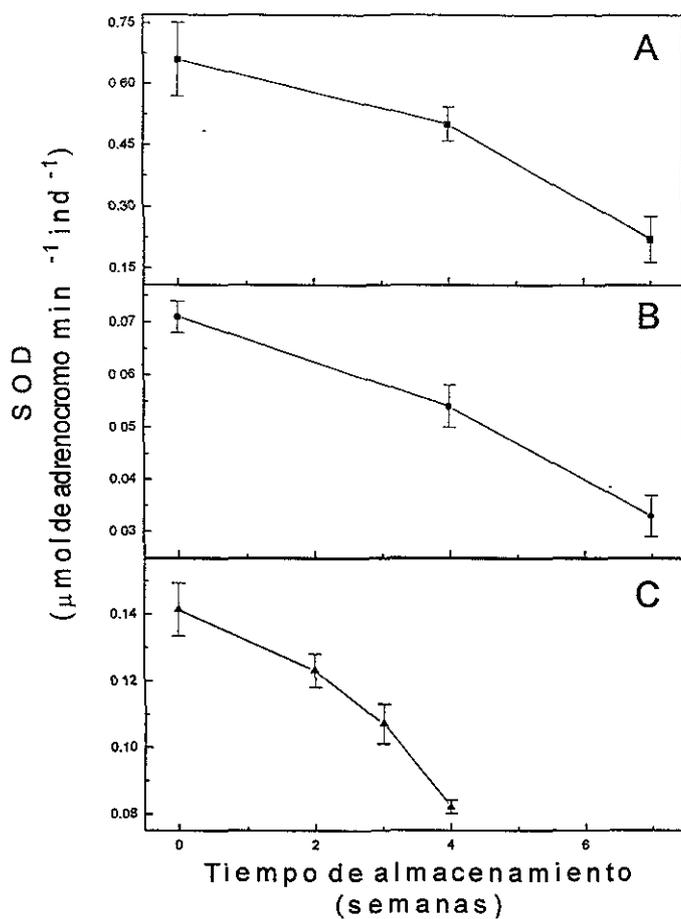


Figura 8. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de SOD en las semillas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

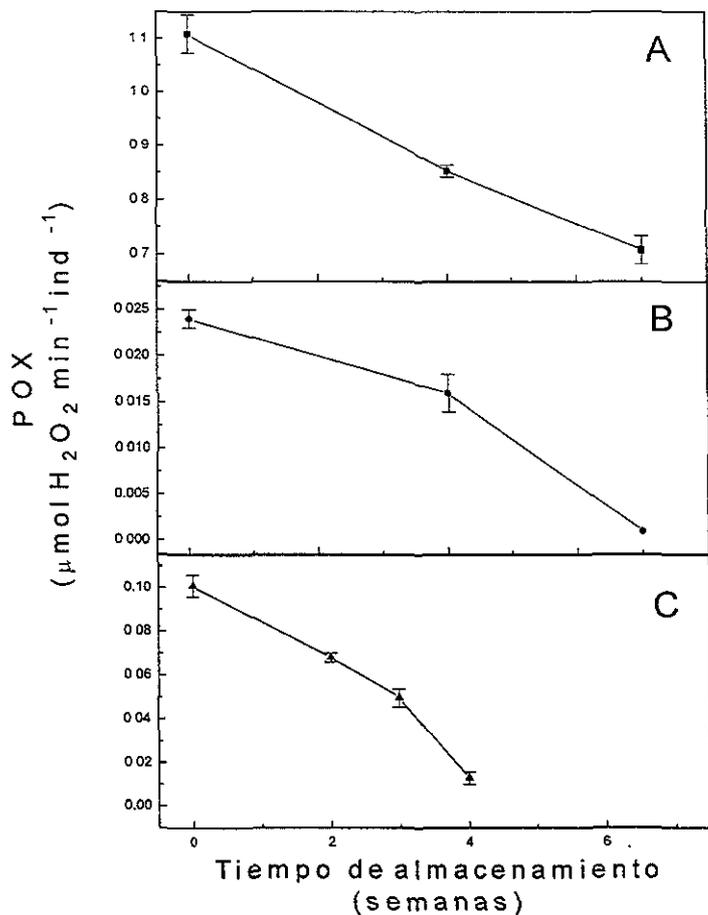


Figura 9. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de POX en las semillas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

Por otro lado, se observó que la actividad de POX en las semillas también disminuye por efecto del almacenamiento subóptimo. Tal como lo muestra la Figura 9, la actividad de la enzima en el maíz (panel A) baja de 23 a 36 % en la 4ª y 7ª semanas, mientras que en el chícharo (panel B) las variaciones fueron de 33 y 96 %. Finalmente, en las semillas de frijol soya (panel C), la actividad disminuyó 33, 51 y 87 % en 2, 3 y 4 semanas, respectivamente.

Finalmente, la actividad de CAT presentó la misma tendencia que las otras dos enzimas. Como se muestra en la Figura 10, las actividades de CAT encontradas en las semillas de maíz fueron en todo momento mayores a las observadas en las otras dos especies. Así, en el maíz (panel A) se observaron disminuciones de la actividad de 64 a 75 % respecto al control, mientras que en el chícharo (panel B) las variaciones fueron del 6 al 78 %; por último, en las semillas de frijol soya (panel C) se registraron variaciones de 9, 36 y 68 %, respectivamente. Se observó que en frijol soya las actividades de las tres enzimas son en todo momento mayores que las observadas en chícharo.

Por tanto, como se muestra en las Figuras 9, 10 y 11, las actividades de las tres enzimas determinadas en las semillas de maíz fueron en todo momento mayores a las observadas en las otras dos especies. También, se observó que en el frijol soya las actividades las mismas tres enzimas son en todo momento mayores que las observadas en chícharo.

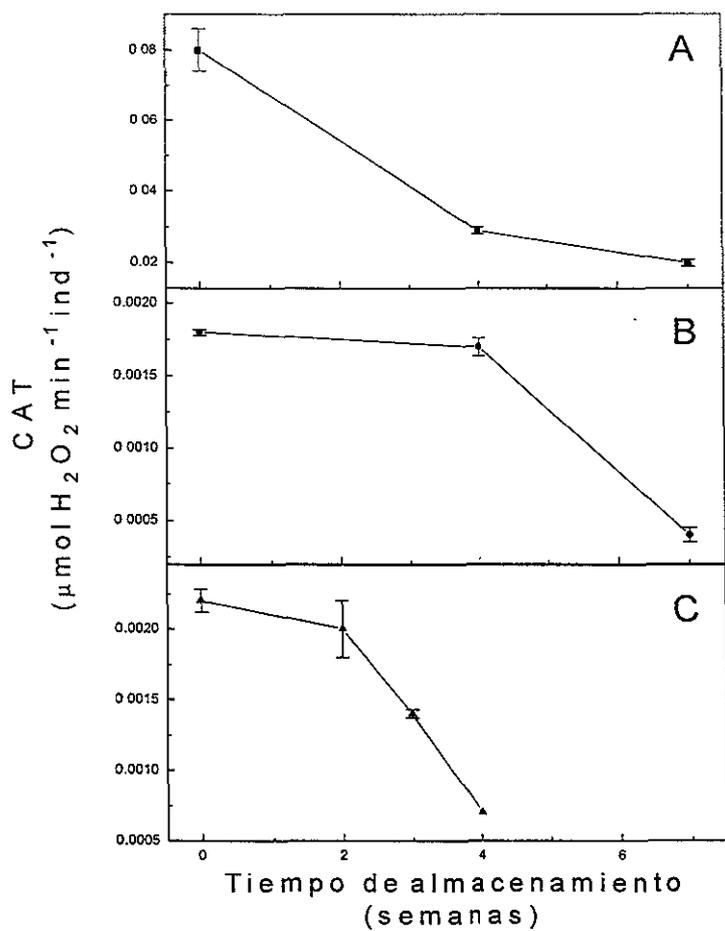


Figura 10. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de CAT en las semillas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

3.5 Aumento de la actividad enzimática de las ES-ERO en las Plántulas de las Semillas Almacenadas.

Las actividades de las ES-ERO de las tres especies ensayadas fueron mayores en las plántulas que en las semillas, al igual que lo encontrado en los controles (Tabla 6). Al transcurrir el tiempo en almacenamiento subóptimo, se encontró que las curvas de actividad de las ES-ERO en las plántulas, al igual que en las semillas, presentaron una tendencia a disminuir.

La Figura 11 muestra las actividades de SOD de las plántulas de chícharo, maíz y frijol soya. A diferencia de lo observado en las semillas secas, se encontró que las plántulas de chícharo presentaron la mayor actividad de esta enzima que las demás, mientras que las de frijol soya presentaron la menor.

Como se aprecia en la figura, las variaciones de la actividad de SOD en las plántulas de maíz (panel A) fueron del 40 al 52 % respecto al control en el tiempo de almacenamiento considerado. En las plántulas de chícharo (panel B) a su vez, la disminución fue de 18 y 49 %, mientras que en las de frijol soya (panel C), la actividad disminuyó 32, 62 y 84 % en 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento.

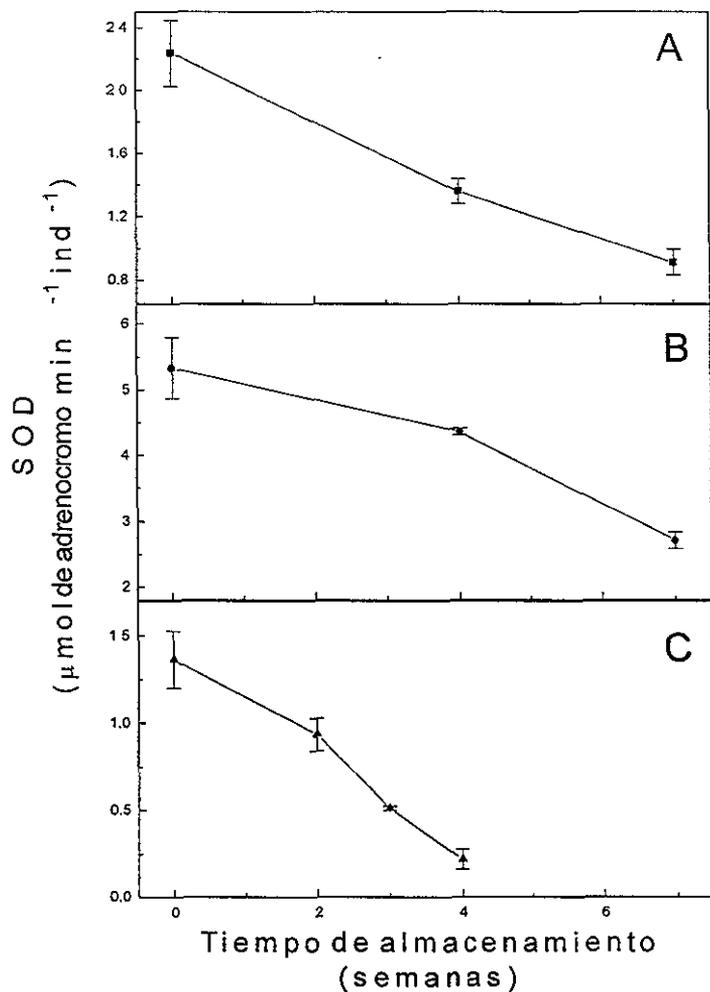


Figura 11. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de SOD en las plántulas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

En cuanto a la actividad enzimática de POX en las plántulas (Figura 12), se encontró que en las plántulas de chícharo (panel B) fue 4 veces mayor que en las plántulas de maíz (panel A) y 7 veces mayor que en las de frijol soya (panel C).

Según lo muestra la figura, la actividad de POX en las plántulas de chícharo disminuyó entre el 40 a 46 % con respecto al control en el periodo comprendido de la 4ª a la 7ª semana de almacenamiento subóptimo. Por su parte, la actividad de la enzima en las plántulas de maíz disminuyó 20 y 41 % en el mismo tiempo, mientras que en las de frijol soya varía 14, 31 y 51 % durante el almacenamiento.

Asimismo, se observó que la actividad de CAT en las plántulas de maíz (Figura 13) siempre resultó ser mayor que en las otras dos especies y que la actividad enzimática en las plántulas de las tres especies disminuye con el almacenamiento subóptimo de las semillas.

Se observa que la actividad de CAT en las plántulas de maíz (panel A) disminuye 29 y 50 % respecto al control, mientras que en las plántulas de chícharo (panel B) baja del 18 al 31 %. Asimismo, en las plántulas de frijol soya (panel C), cuya actividad de CAT es la menor, se observa una disminución del 25 al 49 y 89 % del control en el periodo de almacenamiento subóptimo ensayado.

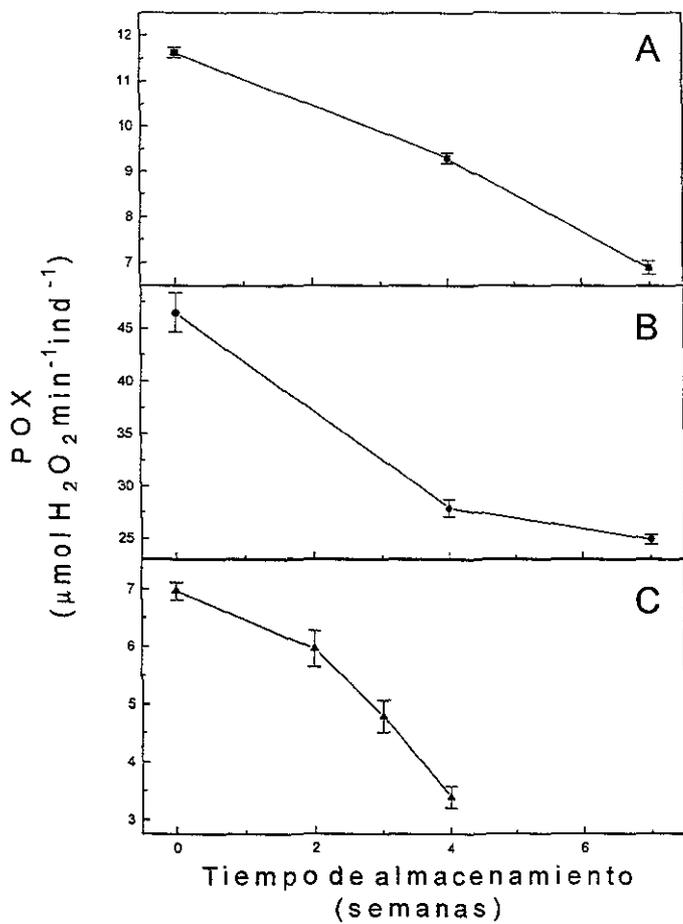


Figura 12. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de POX en las plántulas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

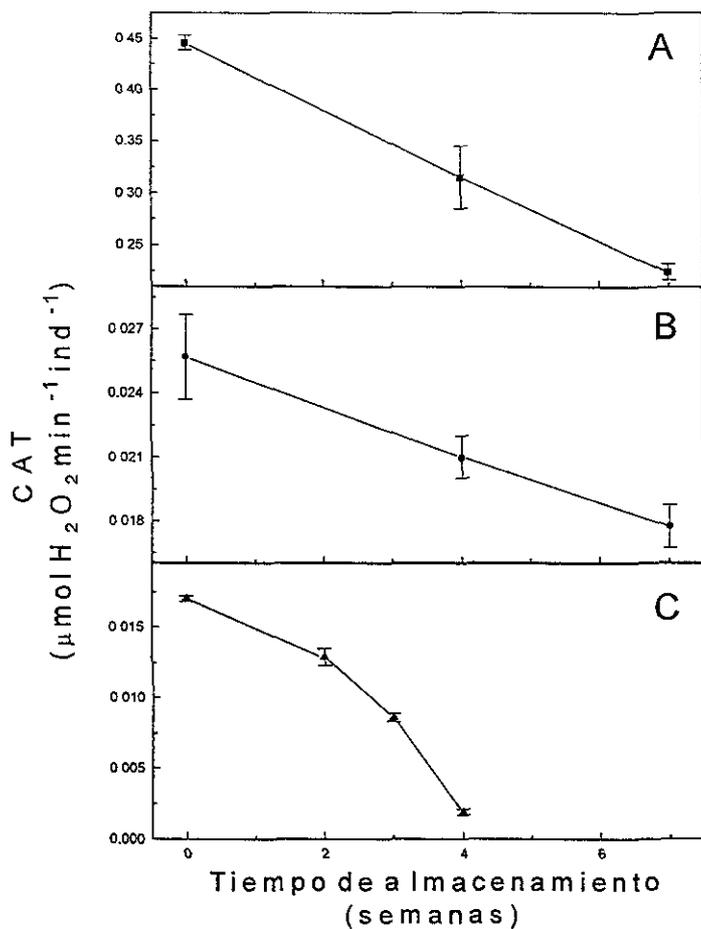


Figura 13. Efecto del almacenamiento subóptimo sobre la actividad enzimática de CAT en las plántulas de (■) maíz, (●) chícharo y (▲) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

Finalmente, se comparó la actividad de cada enzima en las semillas de cada tiempo de almacenamiento con sus equivalentes en las plántulas. Se calculó el número de veces que la actividad enzimática se había incrementado en las plántulas con respecto a las semillas en cada tiempo de almacenamiento, y se obtuvo el logaritmo en base diez de estos valores. Posteriormente, los resultados fueron expresados en una gráfica (Figura 14).

Se observó que la relación de las actividades de SOD (panel A), POX (panel B) y CAT (panel C) en las plántulas de chícharo siempre fueron mayores que en las otras dos especies, mientras que las plántulas de maíz presentaron los menores incrementos de actividad de SOD y POX de las tres especies. Finalmente, se observó que, en general, el incremento de actividad de CAT en frijol soya fue menor que el de las otras dos especies.

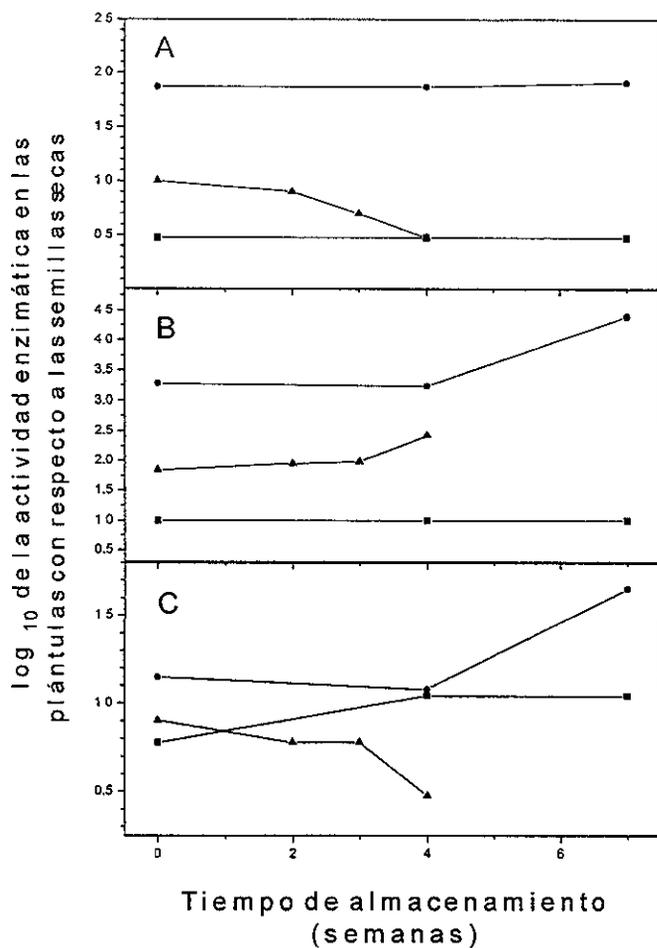


Figura 14. Incremento de la actividad enzimática (SOD, panel A; POX, panel B; CAT, panel C) en las plántulas con respecto a las semillas de (-■-) maíz, (-●-) chícharo y (-▲-) frijol soya. Los resultados son el promedio de 5 experimentos.

DISCUSIÓN.

4.1 Viabilidad de las Semillas.

Priestley *et al.* (1985) reportaron que en condiciones óptimas de almacenamiento (4° C, 50 % HR) la sensibilidad al envejecimiento de las semillas es diferente para cada especie; mencionan que el frijol soya tiene una longevidad en almacén de 3 a 4 años, el maíz de 9 a 10 años y el chícharo -la más resistente de las tres ensayadas en este trabajo- de 15 a 16 años.

Por otro lado, Sung (1996) reportó que los efectos del envejecimiento acelerado (inducido por el almacenamiento bajo condiciones extremas) sobre la viabilidad y otros parámetros que evalúan el vigor de las semillas (como la Velocidad Media de Germinación, dada en este trabajo como TG_{50}) son similares a los que produce el envejecimiento natural. Según Sung (1996) y Bailly *et al.* (1996) la relación especie-sensibilidad se mantiene cuando el almacenamiento se lleva a cabo en condiciones no ideales, pues de acuerdo con lo reportado por Priestley (1985), la longevidad en almacén del girasol (5 a 6 años) es mayor a la del frijol soya y, bajo las condiciones extremas de almacenamiento (45° C y 100 % HR) empleadas por

ellos para envejecer las semillas, se observa que el frijol soya pierde su viabilidad en 6 días, mientras el girasol aún la conserva en 50 %.

A diferencia de los trabajos citados, en el presente se decidió emplear condiciones de almacenamiento parecidas a las prevalecientes en el Sureste de México, en donde la temperatura promedio es de 30° C y la humedad relativa (HR) de 75%; estas condiciones de almacenamiento se consideran subóptimas. Bailly *et al.* (1996), al emplear 45° C y 76 % HR, no detectaron disminución en el porcentaje de germinación de las semillas que en condiciones extremas perdían su viabilidad a los 7 días. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo durante el almacenamiento en condiciones subóptimas de las semillas de maíz, chícharo y frijol soya, pues se encontró que se requerían semanas o meses para observar cambios en la viabilidad de las mismas. Sin embargo, los resultados muestran que las semillas de maíz son menos sensibles al envejecimiento que las de chícharo, mientras que el frijol soya resulta ser la especie más sensible (Figura 7, Tablas 7 y 8). Así, los datos aquí generados, aún cuando no se realizaron bajo las mismas condiciones que en el experimento de Bailly *et al.*, no apoyan la propuesta de que la relación especie-sensibilidad se mantiene cuando las semillas son almacenadas bajo condiciones subóptimas.

No obstante, existen otros factores que pueden magnificar la sensibilidad al envejecimiento de las semillas almacenadas, como la presencia de microorganismos patógenos (Saugakkara, 1988; Sung y Chiu, 1995), los cuales aumentan la susceptibilidad de las semillas al deterioro, estableciéndose un

sinergismo entre el estrés abiótico (almacenamiento) y el biótico (patógenos). Durante el desarrollo de este trabajo, se observó la presencia de hongos (aun cuando se emplearon fungicidas) en las semillas germinadas de chícharo, las cuales al contrario de las otras dos especies empleadas en este trabajo parecen ser muy susceptibles a contaminarse, pues no obstante que todas fueron almacenadas bajo las mismas condiciones únicamente las primeras presentaron este problema.

4.2 Actividades Enzimáticas.

El descenso en la actividad enzimática de SOD, POX y CAT en las semillas deterioradas fue evidente y concomitante a su disminución de viabilidad con el almacenamiento. Experimentos como los de Sung (1996) y Bailly *et al.* (1996) muestran que al mismo tiempo que las actividades enzimáticas disminuyen, la formación y acumulación de malondialdehído (MDA) y H_2O_2 se incrementan; por lo tanto, la disminución de la actividad enzimática puede ser resultado de la alteración de las enzimas inducido por las especies reactivas de oxígeno formadas durante el envejecimiento o viceversa.

En este trabajo se observó que las especies más y menos sensibles al envejecimiento mantienen la correlación: "mayor actividad enzimática = menor sensibilidad". Aunque el chícharo parece no entrar en esta definición, esto podría deberse a la composición química de las semillas y/o al daño causado por agentes patógenos.

De acuerdo con diversos autores, un mayor contenido de lípidos de las semillas puede ser asociado con una mayor sensibilidad a la lipoperoxidación. Ponquett *et al.* (1992) reportó un contenido de ácido linolénico 12.6 veces mayor en el frijol soya que en el chícharo, mientras que Bewley y Black (1994) indicaron que hay un mayor porcentaje de lípidos (17 %) en frijol soya que en chícharo y maíz (6 y 5 %, respectivamente); de manera que las semillas de frijol soya deben ser más sensibles a la lipoperoxidación que las de chícharo; los datos de viabilidad muestran que efectivamente el frijol soya envejece con mayor rapidez que el chícharo.

Así, sería de esperarse que las actividades de SOD, POX y CAT en el chícharo fueran mayores que las encontradas en el frijol soya; los resultados muestran que la actividad de las tres enzimas fue en todo momento mayor en las semillas de frijol soya que en las de chícharo, probablemente debido a que su defensa contra el estrés oxidativo no se base únicamente en las ES-ERO, sino también en antioxidantes no enzimáticos como los tocoferoles, de los cuales Ponquett *et al.* (1992) reportó un mayor contenido en chícharo (3309 p.p.m) que en frijol soya (1196 p.p.m). Sin embargo, como se mencionó antes, las semillas de chícharo del lote utilizado en este trabajo son más susceptibles de contaminarse por hongos que las de las otras especies y, por tanto, también es probable que las semillas control de este lote presenten cierto grado de deterioro o cambios fisiológicos (debido a los hongos) que puedan manifestarse como un menor nivel de las actividades de ES-ERO con respecto a los de frijol soya.

4.3 Aumento de la Actividad Enzimática en la Germinación.

El aumento en la actividad de las enzimas durante la germinación fue evidente tanto en los extractos enzimáticos de las plántulas control como en los de deterioradas. Este aumento en la actividad de las ES-ERO se ha asociado con el incremento de las ERO (Puntarulo *et.al.*, 1991), ya que el H_2O_2 producido en las mitocondrias durante la germinación es la principal fuente citosólica de este agente y, puesto que las membranas celulares son altamente permeables a él, su concentración citosólica podría incrementarse con un consecuente aumento de la actividad de POX, CAT y otras enzimas que lo detoxifiquen. Asimismo, se ha reportado que la inducción de CAT durante la germinación puede ser resultado de la acumulación del H_2O_2 generado por la actividad de SOD (Gidrol y Lin, 1994).

Cakmak *et al.* (1993) relacionaron el incremento en la generación de H_2O_2 durante la imbibición y germinación de las semillas con un elevado consumo de O_2 . Ellos concluyeron que al acelerarse el transporte mitocondrial de electrones en una membrana lipídica dañada, la pérdida de los mismos hacia el O_2 se incrementa, con la concomitante producción de O_2^- y H_2O_2 . Puntarulo *et al.* (1988) reportaron que aproximadamente entre 1 y 1.5 % del O_2 captado durante este proceso, se desvía hacia la formación de ERO.

Ahora bien, en este trabajo se observó que, dependiendo de la especie de que se trate, la respuesta al deterioro se manifiesta de manera diferente en las

actividades de las ES-ERO. Para el caso del maíz, el aumento de actividad de SOD y POX entre semillas y plántulas (Figura14, paneles A y B), fue el mismo a pesar del tiempo que fueron deterioradas las semillas; en cambio la CAT, además de ser la primera enzima que aumenta su actividad ante el almacenamiento subóptimo de las semillas (Figura14, panel C), presenta incrementos de actividad mayores en el tiempo de almacenamiento considerado; por ello, puede sugerirse que las semillas de maíz dependen de esta enzima para su defensa.

El caso del chícharo es complejo, ya que los incrementos de actividad enzimática en las plántulas respecto de las semillas fueron diversos: a) en el caso de SOD (Figura14, panel A), se observó un incremento mayor al del control en la 4^a semana de almacenamiento y que fue el mismo para la 7^a semana; b) los incrementos de actividad de POX (Figura14, panel B) con respecto a los observados en el control, fueron del mismo orden de magnitud en la 4^a semana y un orden de magnitud mayor que ambos en la 7^a semana de almacenamiento y c), el incremento de actividad de CAT (Figura14, panel C) es considerablemente mayor respecto al control en la 7^a semana de almacenamiento. Aparentemente, en esta especie las tres enzimas colaboran en conjunto para tratar de detoxificar a la semilla.

Finalmente, en el frijol soya los incrementos en la actividad de SOD y CAT en las plántulas respecto de las semillas (Figura14, paneles A y C) son menores conforme avanza el tiempo de almacenamiento, comportamiento opuesto al de POX, cuyos incrementos son cada vez mayores (Figura14, panel B); estos hechos probablemente indican que las semillas de frijol soya en germinación se defienden

del estrés oxidativo apoyándose en la SOD. Sin embargo, se ha visto que CAT es la principal enzima detoxificadora de H_2O_2 y aunque otras ES-ERO como POX y glutatión-POX también lo detoxifican, su actividad puede explicar la eliminación de cuando mucho 35 % del H_2O_2 total producido (Puntarulo *et al.*, 1988), por lo cual, las actividades detectadas no cubren las necesidades de la semilla para combatir eficientemente el estrés oxidativo causado por esta ERO. Además, según los resultados de Gidrol y Lin (1994), aunque CAT posea mayor actividad detoxificadora de H_2O_2 que otras ES-ERO, en semillas de baja viabilidad ni se induce ni se detectan elevados niveles de ella y, adicionalmente, diversas isoformas de las peroxidasas se inhiben o se dejan de expresar impidiendo la compensación por la ausencia de CAT.

De lo anterior, podemos sugerir que las semillas de maíz sufren un estrés oxidativo por el deterioro que no las afecta en su mecanismo de defensa contra las ERO adicionales que se producen durante la germinación. Por el contrario, las semillas de chícharo y las de frijol soya sí sufren estrés oxidativo por efecto del almacenamiento subóptimo y sus efectos se observan tanto en las semillas, como en las plántulas. Aunque el mecanismo exacto no se conoce, se piensa que daños a nivel membrana mitocondrial pueden ser los causantes, al menos parcialmente, de una sobreproducción de $\cdot O_2^-$ (Gidrol y Lin, 1994). Una vez más, es posible que el alto contenido de lípidos de las semillas de frijol soya las haga más susceptibles al daño, pues al existir mayor cantidad de lípidos que puedan ser atacados es factible que no pueda dismutarse todo el $\cdot O_2^-$ formado, aún si la enzima aumenta

su actividad durante la germinación. También, es posible que las semillas de chícharo se defiendan mejor, ya que las tres enzimas estudiadas incrementan su actividad durante la germinación aparentemente colaborando en conjunto para detoxificar a la semilla. Sin embargo, es probable que la falta de coordinación entre las actividades SOD y CAT en las semillas deterioradas pueda llevar a la acumulación de H_2O_2 (Gidrol y Lin, 1994).

CONCLUSIONES.

- Puesto que la sensibilidad al envejecimiento se manifiesta como un mayor efecto adverso del almacenamiento sobre la viabilidad y el vigor de las semillas, podemos afirmar que en orden creciente de sensibilidad el comportamiento de las especies empleadas en este trabajo es: Maíz menor que Chicharo menor que Frijol Soya.
- Posiblemente, el chícharo envejece con menor rapidez que el frijol soya porque el primero posee una mayor cantidad de antioxidantes no enzimáticos y menos lípidos que el segundo, de tal forma que la defensa contra las ERO de estas semillas no depende únicamente de enzimas.
- Durante la germinación, la activación y aumento de las enzimas parece estar asociada al incremento de las ERO tanto en plántulas control como en deterioradas.
- Los datos muestran que las semillas de maíz no presentan un cambio fisiológico importante después de haber sido almacenadas en condiciones subóptimas, lo cual se refleja en una actividad estable de SOD, POX y CAT. Por el contrario, las

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

semillas de chícharo y frijol soya sufren alteraciones, que se manifiestan en una disminución de la viabilidad en las semillas y en un menor crecimiento de las plántulas. Esto podría ser el resultado de un daño oxidativo debido a las alteraciones que sufren las actividades de sus ES-ERO.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aebi, H. **Catalase**. En: Bergmayer H. U. (Ed.). Methods of enzymatic analysis. 3ª edición. Londres. Academic Press Inc. 1974, Vol. 2, pág 673-684.
- Abdul-Baki, A. A. y Anderson, J. D. **Physiological and biochemical deterioration of seeds**. En: Kozlowski T. T. (ed.) Seed Biology. Londres. Academic Press. 1972, Vol. 2, pág 283-309.
- Bailly, C., 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.* 97: 104-110.
- Beers, R. F. y Sizer, I. W. 1952. **A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase**. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140
- Bewley, J. D. y Black, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Heidelberg. Springer Verlag. 1982. Vol. 2.
- Bewley, J. D. y Black, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2ª edición. Nueva York. Plenum Press. 1994, pp 445.
- Bowler, C, Van Montagu, M y Inzé, D. 1992. **Superoxide dismutase and stress tolerance**. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43: 83-116.

- Cakmak, I., Strbac, D. y Marschner, H. 1993. **Activities of Hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds.** J. Exp. Bot. (44) 258:127-132.
- Chance, B. y Maehly, A. C. **Assays of catalase and peroxidase.** En: Colowick, S. P y Kaplan, N. O (Eds.) Methods in Enzymology. New York. Academic Press. 1955, Vol. 2, pág 764-775.
- Ching, T. M. y Schoolcraft, I. 1968. **Physiological and chemical differences in aged seeds.** Crop Science 8: 407-409.
- Esau, K. **La semilla.** En: Esau, K (Ed.) Anatomía Vegetal. 2ª edición. Barcelona. Ediciones Omega. 1972, pp 779.
- Gidrol, X. y Lin, W. S. 1994. **Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds.** Eur. J. Biochem. 224: 21-28.
- Harman, G. E. y Mattick, L. R. 1976. **Association of lipid oxidation with seed ageing and death.** Nature 260: 323-324.
- Harrington, J. F.. **Seed storage and longevity.** En: Kozlowski T. T. (ed.) Seed Biology. Londres. Academic Press. 1972. Vol. 3, pp 430.
- Hendry, G. A. 1993. **Oxygen, free radical processes and seed longevity.** Seed Sci. Res. 3: 141-153.
- Kono, Y. y Fridovich, I. 1982. **Superoxide radical inhibits catalase.** J. Biol. Chem. 257: 5751-5754.
- Kunert, K. J. y Ederer, M. 1985. **Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the antioxidants vitamin C and E.** Physiol. Plant. 65: 85-88.

- Larson, R. A. 1988. **The antioxidants of higher plants**. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- Misra, H. P. 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.
- Newton, R. P. y Pennock, J. F. 1971. **The intracellular distribution of tocopherols in plants**. *Phytochemistry* 10: 2323-2328.
- Niembro, A. **Semillas de árboles y arbustos. Ontogenia y estructura**. México. Editorial Limusa. 1988, pp 285.
- Noodén, L. D. **The phenomena of senescence and aging**. En: Noodén L.D. y Leopold A.C. (Eds.). Senescence and aging in plants. Londres y San Diego. Academic Press. 1988, pág 2-5.
- Ponquett, R. T, 1992. **Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability**. *Seed Sci. Res.* 2: 51-54.
- Prasad, T. K, Anderson, M. D y Stewart, C. R. 1995. **Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings**. *Plant. Physiol.* 108: 1597-1605.
- Priestley, D. A. **Seed aging**. Ithaca y Londres. Comstock Publishing Associates. 1986, pp 1125.
- Priestley, D.A., Cullinan, V.I. y Wolfe, J. 1985. **Differences in seed longevity at the species level**. *Plant Cell and Environment* 8: 557-562.

- Puntarulo, S., Sánchez, R.A. y Boveris, A. 1988. **Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at onset of germination.** Plant Physiol. 86: 626-630.
- Puntarulo, S., Galleano, M., Sánchez, R.A. y Boveris, A. 1991. **Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination.** Biochim. Biophys. Acta 1074: 277-283.
- Pütter, J. **Peroxidases.** En: Bergmayer, H.U. (Ed.) Methods of enzymatic analysis. 3ª edición. Londres. Academic Press. 1974, pág 685-690.
- Redinbaugh, M. G, Sabre, M y Scandalios, J.G. 1990. **The distribution of catalase activity, isozyme protein, and transcript in the tissues of the developing maize seedlings.** Plant. Physiol. 92: 375-380.
- Reiter, R. J. 1995. **Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain.** The FASEB Journal 9:526-533.
- Saugakkara, V. R. 1988. **Threshing method, drying temperature and storage condition on microbial deterioration of soybean seeds.** J. Appl. Seed Prod. 6. 1-5.
- Scandalios, J. G. 1993. **Oxygen stress and superoxide dismutases.** Plant Physiol. 101:7-12.
- Smith, M. T. y Berjak, P. **Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds.** En: Kigel J. y Gallli G. (Eds.) Seed development and germination. New York. Marcel Dekker Inc. 1995, pág 701-747.

- Sung, J. M. y Chiu, C. C. 1995. **Lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes of naturally aged soybean seeds**. Plant Science 110: 45-52.
- Sung, J. M. 1996. **Lipid peroxidation and peroxide scavenging in soybean seeds during aging**. Physiol. Plant. 97: 85-89.
- Villiers, T. A. **Seed dormancy**. En: En: Kozłowski T. T. (Ed.) Seed Biology. Londres. Academic Press. 1978, Vol. 2, pág 220-281.
- Wilson, D. O y Mc. Donald, M. B. 1986. **The lipid peroxidation model of seed ageing**. Seed Sci. & Technol. 14: 269-300.
- Winston, G. W. **Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses**. En: Alscher, R. G y Cumming, J. R. (Eds.) Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms. New York. Wiley-Liss Inc. 1990, pp 407.