

221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“INDUCCION DE ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL EN SEMILLAS DE Stenocereus stellatus Y Brassica napus L. Y SU POSIBLE RELACION CON LA PEROXIDACION DE ACIDOS GRASOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LUIS FREDD LEONARDO VERGARA MONTALVO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D. F.

DIRECTOR DE TESIS: en C. CESAR MENDOZA FLORES ORTIZ



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Inducción de envejecimiento artificial en semillas de Stenocereus stellatus y Brassica napus L. y su posible relación con la peroxidación de ácidos grasos".

realizado por Luis Fredd Leonardo Vergara Montalvo.

con número de cuenta 09226642-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Flores de Cesari.

Director de Tesis M. en C. César Mateo Flores Ortiz.
Propietario

Propietario Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo. *Irma Bernal Lugo*

Propietario Dra. Alma Orozco Segovia. *Alma Orozco Segovia*

Suplente Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco. *Brechú*

Suplente Dra. Clara Esquivel Huesca. *Clara Esquivel Huesca*

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
Dra. Patricia Ramos Morales.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

ÍNDICE

Agradecimientos	4
Índice de figuras	5
Introducción	8
El proceso de envejecimiento de las semillas	8
Radicales libres	8
La formación de radicales libres	9
El mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados	11
Índices de peroxidación en semillas	12
Espectroscopía de reflectancia de infrarrojo cercano (ERIC)	14
Objetivos	16
Materiales y métodos	18
<i>Brassica napus</i> L.	18
<i>Stenocereus stellatus</i> (Pfeiffer) Riccobono	18
Inducción de envejecimiento	19
Cuantificación de MDA en semillas por medio de Vis	20
Cuantificación de ácidos grasos en semillas por medio de CG-EM	21
Registro del espectro de infrarrojo de las semillas	23
Determinación de la germinabilidad	24
Resultados	25
<i>B. napus</i>	25
MDA	25
Perfil de ácidos grasos según su naturaleza química	25
Perfil de ácidos grasos según tratamiento de almacenamiento	27
Índice de saturación	27
Perfil de ácidos grasos en la muestra control	27
ERIC	27
Germinabilidad	30
<i>S. stellatus</i>	31
MDA	31
Perfil de ácidos grasos según su naturaleza química	32

Perfil de ácidos grasos según tratamiento de almacenamiento	32
Índice de saturación	32
Perfil de ácidos grasos en la muestra control	32
ERIC	36
Germinabilidad	36
Discusión	37
Conclusiones	41
Referencias	43
Lista de Abreviaturas	47

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi padres, Miguel e Irma, y a mi hermana, Aide, pues sin su apoyo no habría podido llegar hasta este punto.

También deseo agradecer a mi maestro, César Flores, pues su ayuda y guía fueron fundamentales en mi devenir profesional.

Quiero agradecer a Josefina Vázquez y Luis Barbo, sus consejos y auxilio siempre fueron oportunos para mí. A Patricia Dávila quiero agradecer el apoyo e impulso que siempre mostró para que este trabajo llegara a buen fin.

Una mención especial merece Ismael Ledesma, excelente historiador de la ciencia cuya charla es siempre un placer.

Finalmente, deseo agradecer la amistad que me brindaron todos mis compañeros durante la carrera, a los cuales no deseo enumerar con el afán de no olvidar a alguno de ellos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras

1. Secuencia de eventos en la pérdida de viabilidad. **10**
2. Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados. **11**
3. Espectro de reflectancia de infrarrojo cercano y medio de una muestra de semillas de *S. stellatus*. **15**
4. Cámara para almacenamiento de semillas bajo condiciones de humedad relativa y temperatura controladas. **20**
5. Espectro de luz visible de extracto de semillas de *S. stellatus* para cuantificar MDA. **21**
6. Cromatograma de derivados de ácidos grasos y patrón de fragmentación de masas para el ácido linoleico en una muestra de semillas de *S. stellatus*. **22**
7. Espectros de reflectancia de infrarrojo cercano y medio de dos muestras de semillas de *S. stellatus* con diferentes periodos de almacenamiento. **23**
8. Concentración de MDA en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **25**
9. Disminución en la abundancia de ácido linoleico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **26**
10. Disminución en la abundancia de ácido oleico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **26**
11. Disminución en la abundancia de ácido esteárico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **26**
12. Disminución en la abundancia de ácido palmítico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **26**
13. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 25°C. **28**
14. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 40°C. **28**

15. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 25°C. **28**
16. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 40°C. **28**
17. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 25°C. **29**
18. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 40°C. **29**
19. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 25°C. **29**
20. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 40°C. **29**
21. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a HR y T ambientes (control). **27**
22. Grado de correlación entre la abundancia de ácidos grasos y los espectros de ERIC correspondientes en semillas de *B. napus*. **30**
23. Efecto de las condiciones de almacenamiento tras 161 días sobre la germinación a 15°C de semillas de *B. napus*. **31**
24. Concentración de MDA en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **31**
25. Disminución en la abundancia de ácido linoleico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **33**
26. Disminución en la abundancia de ácido oleico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **33**
27. Disminución en la abundancia de ácido esteárico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **33**
28. Disminución en la abundancia de ácido palmítico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento. **33**
29. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 25°C. **34**
30. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 40°C. **34**

31. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 25°C. **34**
32. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 40°C. **34**
33. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 25°C. **35**
34. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 25°C. **35**
35. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 25°C. **35**
36. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 40°C. **35**
37. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a HR y T ambientes (control). **32**
38. Grado de correlación entre la abundancia de ácidos grasos y los espectros de ERIC correspondientes en semillas de *S. stellatus*. **36**

EL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO DE LAS SEMILLAS

De manera natural toda semilla experimenta un proceso de deterioro de sus actividades biológicas relacionado con el tiempo transcurrido desde su producción por la planta madre, lo que eventualmente lleva a la muerte de la misma. La capacidad de germinar, o germinabilidad, es la más obvia (y la más informativa desde el punto de vista científico) de dichas actividades. A la disminución de la germinabilidad en una población de semillas con respecto del tiempo, medida como un porcentaje, se le llama envejecimiento. Se ha referido a la temperatura, el contenido de agua (CA) y la atmósfera²⁶ además de la condición genética y la calidad inicial de las semillas²² como los factores que influyen más profundamente en la longevidad de las semillas; sin embargo, los mecanismos que llevan a dicho envejecimiento aún no son bien entendidos, si bien la degeneración a nivel del ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos han sido explicaciones planteadas para las causas y consecuencias de dicho evento. Uno de estos enfoques trata de explicar el deterioro de las semillas como una consecuencia de la formación de radicales libres en sus células. Existe una bibliografía vasta acerca del tema¹² en la cual los mecanismos moleculares de la pérdida de la viabilidad (la potencialidad de germinar) en semillas han sido ligados a cambios relacionados con la edad de la semilla o eventos estresantes y la conformación del ADN, del ARNr, la estructura de lípidos y la funcionalidad de las membranas, junto con la capacidad de reparar ADN alterado o daño en lípidos¹³. Una contribución importante a este debate ha sido ubicar a los radicales libres como responsables del mecanismo causal de la pérdida de vigor (capacidad de desarrollo) o de viabilidad (potencialidad para germinar) de las semillas.

RADICALES LIBRES

Un radical libre es una especie química que tiene la característica de poseer electrones de la capa de valencia desapareados, pudiendo estar cargadas (formas iónicas) o no. Esta característica confiere una gran reactividad a dichas especies químicas por lo que pueden reaccionar con un gran número de moléculas en la célula, dando comúnmente como resultado la pérdida de la actividad biológica de estas últimas.

En semillas recalcitrantes (aquellas que no pueden ser deshidratadas por debajo de un CA relativamente alto sin que experimenten pérdida de viabilidad²⁶) las cuales tienen tasas de respiración significativas los radicales libres son producidos en los ejes embrionarios después de su deshidratación¹⁴. Sin embargo, en las semillas ortodoxas (aquellas que pueden ser deshidratadas a porcentajes bajos de CA sin ser dañadas²⁶) con sus bajas tasas de respiración, el papel de los radicales libres en la inducción de la mortandad está muy lejos de estar resuelto.

LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

Ahora bien, ¿cómo se forman los radicales libres responsables del inicio del proceso de peroxidación de ácidos grasos insaturados? Si el tejido en estudio no fuera la semilla, sería relativamente fácil relacionar las observaciones de daño en ADN o lípidos con el daño causado por radicales libres. Por ejemplo, la relación entre la degradación de lípidos de productos vegetales y especies de Oxígeno activadas ha sido establecida claramente, pero las semillas son diferentes.

En tejidos que no sean semillas es ampliamente aceptado que existen varias formas de generar especies de Oxígeno activadas: (1) a través de catálisis enzimática de peroxidasas, oxidasas y oxigenasas, (2) mediante la fuga de electrones en el transcurso de la cadena de transferencia electrónica (o cadena respiratoria), (3) por la ausencia o disminución de mecanismos de protección debidos a antioxidantes constitutivos o la actividad de algunas enzimas y, finalmente, (4) por reacciones de autooxidación donde el Oxígeno oxida moléculas biológicas y se reduce a formas reducidas más reactivas. Ejemplos de estas reacciones las tenemos en la oxidación de formas reducidas de flavinas, aminoácidos tiólicos y aldehídos. Existe evidencia suficiente que sugiere que todas estas rutas están activas como fuente de radicales libres en plántulas, en los últimos estadios de la germinación después de la imbibición y en la mayoría de las semillas recalcitrantes, pero no es claro si estas rutas están presentes y activas en las semillas ortodoxas¹³. Además existe un debate sobre si la peroxidación es una de las causas principales de pérdida de viabilidad en las semillas o si esta ocurre sólo después de su muerte, como parte de un proceso de deterioro general de las mismas²³. El esquema siguiente ha sido planteado para ilustrar el problema anterior¹⁰.

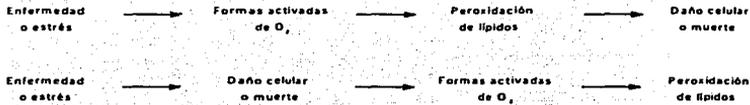


Figura 1. Secuencia de eventos en la pérdida de viabilidad.

De manera particular el Oxígeno ha sido señalado como la fuente molecular principal de estos perniciosos radicales libres (Hendry 93), particularmente el radical superóxido (O_2^-) y el anión peróxido (O_2^{2-}), para lo cual se requiere de una fuente de electrones, un oxidante, un metal como el Hierro, por ejemplo. Si el radical superóxido se combina con peróxido de hidrógeno se obtiene el radical hidroxilo ($HO \cdot$) de particular importancia en Biología debido a que reacciona con la mayoría de las moléculas presentes en los seres vivos, tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El radical hidroxilo puede ser obtenido también de manera directa por la reducción de peróxido de hidrógeno por Hierro.

En presencia de Oxígeno las cadenas alifáticas de los ácidos grasos insaturados se oxidan espontáneamente produciendo radicales libres altamente reactivos llamados hidroperóxidos y una variedad de productos secundarios a partir de la descomposición de este último³⁹. Sistemas de modelos membranosos empleando monocapas de ácidos grasos polinsaturados o bicapas fosfolipídicas insaturadas han demostrado que producen epóxidos e hidroperóxidos, más que simples hidroperóxidos como productos principales²⁰. Más aún, hidroperóxidos y otros ácidos grasos oxigenados son suficientemente estables para ser aislados y han sido detectados en tejidos² por RPE, lo que ha sido esgrimido como un argumento a favor de la hipótesis de peroxidación lipídica. Las biomembranas representan un sitio clave para el daño directo a partir de peroxidación lipídica, ya que poseen una gran superficie y son usualmente más insaturadas que los lípidos de reserva²¹. Esto trae como consecuencia cambios en la permeabilidad de la membrana y, eventualmente, la pérdida de su fluidez e integridad⁴. La peroxidación lipídica es por lo tanto potencialmente dañina para las semillas en tres formas: (1) por la destrucción de los lípidos membranales, (2) por cooxidación de radicales libres y (3) por la formación de aldehídos citotóxicos (los cuales pueden inactivar proteínas).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

EL MECANISMO DE PEROXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

La susceptibilidad de los ácidos grasos insaturados al ataque por radicales libres sería resultado de su naturaleza química, pues los hidrógenos unidos a los carbonos que forman el enlace doble podrían ser extraídos por un radical libre, generando como producto otro radical libre basado en el ácido graso, al cual se denomina hidroperóxido, según el esquema siguiente.

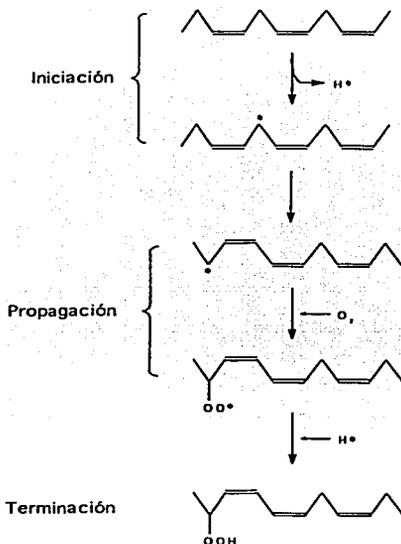


Figura 2. Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados.

Resulta evidente a partir del esquema anterior porque los ácidos grasos insaturados serían tan susceptibles de peroxidarse, pues podrían estabilizarse tras la sustracción de sus hidrógenos mediante la resonancia de sus enlaces dobles.

Los tres pasos en los que ha sido dividido el proceso anterior (iniciación, propagación y terminación) podrían tener sus variantes. El radical libre que sus- trae al hidrógeno del ácido graso insaturado en la iniciación podría ser de naturaleza variada (el radical superóxido, el ión peróxido, el radical hidroxilo u otros), el radical libre orgánico formado durante la propagación podría formar otro compuesto antes de reaccionar con otra molécula o reaccionar el mismo con esta última y, finalmente en el proceso de terminación la naturaleza del radical implicado podría ser, otra vez, variada, dando como resultado una gran variedad de productos residuales.

ÍNDICES DE PEROXIDACIÓN EN SEMILLAS

Se han desarrollado diferentes técnicas para intentar seguir el proceso de peroxidación de ácidos grasos en función del tiempo, ya sea con el proceso de envejecimiento natural o con la inducción de envejecimiento acelerado, de acuerdo con tres principales enfoques del fenómeno: (1) determinar la abundancia de ácidos grasos insaturados y saturados y calcular la relación entre ellos (índice de saturación), (2) determinar la presencia y abundancia *in situ* de productos de dicho proceso y (3) detectar la presencia de radicales libres *in situ*. Adicionalmente se pueden analizar otros procesos asociados con la peroxidación de ácidos grasos y la consecuente pérdida de viabilidad, tales como el seguimiento de compuestos volátiles producto de dicho proceso liberados por la semilla, la medición de la conductividad eléctrica, esperando un aumento en su valor como resultado de un aumento en la permeabilidad de la membrana y el escape de compuestos iónicos, también se pueden realizar estudios a nivel morfológico por medio del empleo de microscopía. A continuación se hace una descripción básica de los principios de cada una de estas técnicas.

- Detección por precipitación de productos secundarios de la peroxidación: Esta prueba está basada en cuantificación por medio de la espectroscopía de luz visible (Vis) del aducto formado entre el ácido tiobarbitúrico (ATB) y el malondialdehído (MDA), uno de los productos de la peroxidación de ácidos grasos^{25, 30}.

- Detección de radicales libres *in situ*: La prueba de *spin* por resonancia paramagnética electrónica (RPE) es utilizada ampliamente en investigaciones con membranas, y ha demostrado ser útil para determinar la integridad de la membrana plasmática, encontrándose diferencias estructurales entre membranas de semillas viables e inviables por medio de pruebas de *spin* a membrana apolares⁷. Una ventaja adicional es que la técnica puede ser utilizada en semillas individuales como una prueba de viabilidad que además no es destructiva¹⁵.
- Seguimiento de la abundancia de ácidos grasos: Esta es la aproximación experimental más ampliamente utilizada para seguir la peroxidación de ácidos grasos contando con numerosos trabajos que reportan la disminución de ácidos grasos insaturados relacionada con el tiempo de almacenamiento en una gran variedad de especies vegetales, empleando desde pruebas que involucran agentes oxidantes como el yodo hasta el uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)^{6, 9, 11, 24, 30}.
- Seguimiento de la conductividad eléctrica: Como resultado del envejecimiento se observará un aumento en la filtración de disolutos debido al daño experimentado por la membrana plasmática¹⁸.
- Detección de compuestos volátiles productos de la peroxidación de ácidos grasos por CG-EM: Se ha propuesto la existencia de una huella digital de compuestos volátiles característica resultado de productos secundarios de la peroxidación de ácidos grasos³⁹, siendo el metanol, el acetaldehído, el etanol y el acetona, los compuestos liberados más comúnmente⁴⁰.

De manera general se puede observar en la bibliografía el empleo de más de una técnica para el establecimiento del proceso de peroxidación de ácidos grasos en experimentos de envejecimiento, tanto natural como acelerado. Esto está en función principalmente de la sensibilidad y costo de la técnica y sólo las técnicas basadas en procesos espectroscópicos tienen la capacidad de analizar semillas sin dañar a las mismas, pues no requieren la extracción de compuestos de las semillas o incluso la germinación de las mismas; de analizar semillas individualmente y de tener límites de detección altos, lo cual resulta muy atractivo desde la perspectiva de la conservación de semillas en condiciones artificiales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DE INFRARROJO CERCANO (ERIC)

En el intervalo del infrarrojo cercano (entre los 13 000 a 4 000 cm^{-1} o 750 a 2 500 nm) pueden ser observados sobretonos y bandas combinadas (C-H, N-H y O-H) de vibraciones normales fuertes del área del infrarrojo medio. Estas bandas son mucho menos intensas que sus vibraciones basales correspondientes. Sin embargo, lo atractivo del infrarrojo cercano es el nulo solapamiento de vibraciones normales, además, la ley de Beer Lambert es obedecida por los sobretonos débiles, permitiendo, por ejemplo, el análisis rutinario de los componentes principales de alimentos, tales como proteínas, almidón, grasa o humedad sin preparaciones tediosas de la muestra. Las muestras, usualmente finamente pulverizadas, son investigadas por medio de una técnica especial de reflexión, la reflexión difusa, la cual registra la reflectancia producida por superficies opacas (aquellas que dispersan la luz) permitiendo una mayor precisión en la lectura para el caso de muestras como las semillas. Los límites de detección son del orden de 0.1% y valores de precisión de 1 a 2% han sido reportados.

Esta técnica espectroscópica resulta ser rápida y no destructiva y es usada ampliamente para analizar un número cada vez mayor de características relacionadas con la calidad de las semillas en productos agrícolas y alimentarios²⁹. Existen suficientes referencias que ponen de manifiesto la utilidad de la ERIC como un método no destructivo para evaluar la calidad de las semillas, pudiendo determinarse por esta técnica con niveles de confiabilidad tan altos como 90% o más, la abundancia de compuestos tales como agua²⁷, glucosinolatos³⁷, ésteres del ácido sinápico^{34,35} y la composición de ácidos grasos^{32,33,36}.

Debido a que la peroxidación de ácidos grasos insaturados daría como resultado una disminución en la abundancia de los mismos, el seguimiento de los cambios de dicha abundancia por medio de la técnica de ERIC nos puede ofrecer un índice para correlacionar dicha disminución en las semillas y la germinabilidad residual de las mismas, ofreciéndonos un método no destructivo de estimación de la viabilidad en una población de semillas.

Una vez obtenidos los espectros de cada muestra se puede generar por medio del programa denominado QUANT+ (Perkin Elmer) un modelo para predecir a partir del espectro de infrarrojo el valor de alguna variable como la concen-

tración de algún compuesto o, en este caso, la germinabilidad residual de una población de semillas. Para esto, el espectro de cada muestra debe hacerse corresponder con un valor específico de la variable cuyo valor en cuestión se desea predecir, en este caso, el valor de la germinabilidad porcentual de cada muestra analizada.

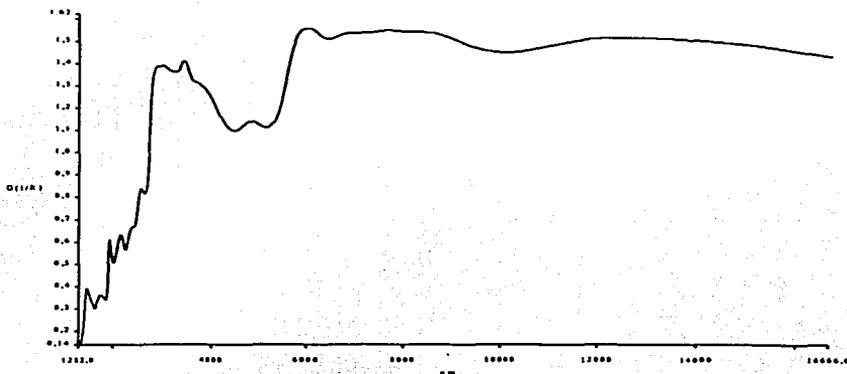


Figura 3. Espectro de reflectancia de infrarrojo cercano y medio de una muestra de semillas de *S. stellatus*.

OBJETIVOS

El costo elevado que implica conservar semillas en condiciones controladas de almacenamiento y la baja disponibilidad de semillas con la que se cuenta en algunas ocasiones (como en el caso de especies en peligro de extinción o de baja producción de semillas o cuya colección sea difícil como resultado de su ubicación geográfica, ciclos de producción de semillas no estacionales o muy largos entre un evento y el siguiente o hasta incluso cuestiones económicas y políticas) hacen que el desarrollo de técnicas de seguimiento de viabilidad no destructivas resulte sumamente atractivo, no sólo en términos económicos, sino también desde el punto de vista de estrategias de conservación, pues una de las actividades rutinarias de las colecciones de semillas es la realización de pruebas de viabilidad mediante la germinación de las mismas, lo cual merma las colecciones¹⁹.

Debido a esto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la implementación eficaz de la técnica de ERIC como una alternativa para seguir la germinabilidad de una manera no destructiva en una colección de semillas bajo condiciones de envejecimiento acelerado. Para ello se perseguirán los objetivos particulares siguientes:

- Almacenar semillas bajo condiciones diferentes de humedad relativa (HR) y temperatura tratando de inducir un gradiente de longevidad.
- Obtener la concentración del aducto MDA-ATB por medio de espectroscopía de luz visible a lo largo del periodo de estudio en los diferentes tratamientos de almacenamiento.
- Obtener la abundancia de ácidos grasos por medio de CG-EM a largo del periodo de estudio en los diferentes tratamientos de almacenamiento.
- Calcular el índice de saturación a partir de los datos obtenidos del inciso anterior.
- Obtener los espectros de ERIC a lo largo del periodo de estudio en los diferentes tratamientos de almacenamiento.
- Obtener la germinabilidad a lo largo del periodo de almacenamiento en los diferentes tratamientos de envejecimiento.
- Correlacionar los espectros de ERIC con los resultados obtenidos de la concentración de MDA y abundancia de ácidos grasos para construir un modelo que permita predecir el grado de peroxidación .

- **Correlacionar los espectros de ERIC con los resultados obtenidos de los experimentos de germinación para construir un modelo que permita predecir la viabilidad o grado de envejecimiento de las semillas.**

***Brassica napus* L (Cruciferae)**

N. V.: "Nabo". Planta anual o bianual, glaucosa; tallos erectos, de hasta 1.5 m de altura, frondosos; hojas inferiores pinnatifidas en forma de lira, glabroscentes o raramente pubescentes (las formas bianuales tienen rosetas y hojas grandes); hojas caulinas medias semiamplexicaules, hojas superiores enteras, sésiles; inflorescencia en racimos (en la floración, las flores abiertas están por debajo de las yemas); pétalos dorados a amarillos, ramas ovaladas, gradualmente ahusándose hacia una uña pequeña más diminuta que el limbo o cáliz; silicuas largas, de 5 a 10 cm, planas o ligeramente torulosas, pedicelos fructificantes de 1 a 3 cm de largo, ascendentes u horizontales; valvas con nervaduras laterales oscuras; pico delgado, cónico, de 7 a 11 cm de largo, raramente 1 ó 2 semillas, 1 a 15 semillas dependiendo del largo de la valva; semillas globulares, café oscuro, ligeramente alveoladas, tan grandes como 1.8 mm en diámetro; $n = 19$, $2n = 38^{28}$.

Las semillas de esta especie fueron compradas en un mercado de la Ciudad de México, desconociéndose su condición genética o fisiológica.

***Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Riccobono (Cactaceae)**

N. V.: "Pitayo" o "xoconostle". Planta arborescente, de mediana altura, como de 2 a 3 m, ramoso desde la base; los ejemplares bien desarrollados suelen tener tronco bien definido aunque corto, y llegan a medir más de 4 m de altura. Ramas erectas. Costillas 8 a 12, obtusas, como de 2 cm de alto, algo onduladas. Areolas distantes entre sí 1 a 2 cm. Espinas radiales 9 a 13, cortas, algo subuladas, grisáceas con la punta oscura, radiadas. Espinas centrales generalmente 3; 2 divergentes hacia arriba y una dirigida hacia abajo, algo más gruesas y largas que las radiales, a veces hasta de más de 5 cm de largo, grisáceas; en las aréolas floríferas suele haber además algunas espinas setosas. Flores en el ápice de las ramas, a veces en corona, diurnas, color rosa pálido; tubular campanuladas, de 5 a 6 cm de largo; pericarpelo con podarios prominentes provistos de escamas pequeñas que llevan dos cerdas con o sin lana; después de la antesis el número de espinas setosas aumenta, produciendo un fruto espinoso; podarios del tubo receptacular gradualmente más grandes, provistos de escamas pequeñas, como de 2 a 3 mm, que a veces suelen producir algunas cerdas; pared del tubo receptacular gruesa; los estambres primarios

numerosos, con funículos ramificados; segmentos exteriores e interiores color rosa claro, con ápice algo ciliado; filamentos blancos, anteras color crema; estilo de la misma longitud que el tubo, blanco, lóbulos del estigma como 9, de 1 cm de largo, delgados. Fruto globoso, de 3 cm de diámetro, rojo con espinas setosas caducas. Semillas pequeñas, con testa negra, verrucosas; además son permeables y no presentan indicios de dormancia innata.

Distribución: Estados de Morelos, Puebla y Oaxaca. Crece en Tehuacán, Tomellín, Izúcar de Matamoros y se extiende por las mixtecas hasta cerca de Tehuantepec. Habita en selvas bajas caducifolias, y también es cultivada, pues los frutos son comestibles y de sabor ligeramente ácido; son llamados vulgarmente xoconostles. Maduran en agosto; aunque se encuentran silvestres, se les cultiva no sólo por sus frutos sino para formar setos vivos³.

Las semillas de esta especie fueron colectadas de un total de veinte individuos aproximadamente y permanecieron almacenadas a temperatura y humedad relativa ambiente en condiciones de cerrado hermético por un periodo de seis meses antes del inicio del experimento.

INDUCCIÓN DE ENVEJECIMIENTO

Previo a su almacenamiento, una muestra de las semillas fue calentada a 90°C por 48 horas para determinar su CA, obteniendo alrededor 12% CA para el caso de *B. napus* y alrededor de 10% CA para el caso de *S. stellatus*.

Para el almacenamiento de las semillas se construyeron unas cámaras empleando una caja de plástico con tapa hermética a la cual se le adhirió un recipiente en el fondo en donde se depositaron las semillas y se llenó el fondo de la cámara con una disolución saturada evitando que el líquido alcanzaría una altura que le permitiera entrar al recipiente de las semillas (figura 3). Las disoluciones saturadas fueron de LiBr y NaBr, las cuales permiten crear una atmósfera con una humedad relativa de 7% y 58% aproximadamente³⁸. Un total de treinta y dos cámaras fueron construidas, a la mitad de ellas se les adicionó disolución saturada de LiBr y a la otra mitad disolución saturada de NaBr. Ocho cámaras de cada grupo fueron colocadas dentro de una cámara de germinación a 25°C y otras ocho en una estufa a 40°C evitando la exposición a la luz. De esta forma se obtuvieron cuatro diferentes condiciones de almacenamiento: 7% de HR a 25°C y 40°C y 58% de HR a 25°C y 40°C.

sobre el fondo del recipiente. La muestra control fue mantenida en un frasco con tapón hermético a temperatura ambiente (entre 15 y 30°C).

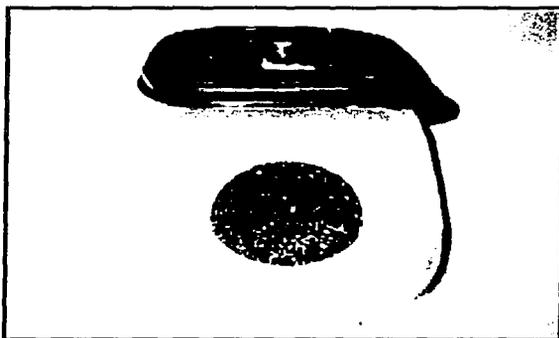


Figura 4. Cámara para almacenamiento de semillas bajo condiciones de humedad relativa y temperatura controladas.

CUANTIFICACIÓN DE MDA EN SEMILLAS POR MEDIO DE Vis

Se pesaron 100 mg de semillas y se maceraron en un mortero adicionando 1.5 mL de ácido tricloroacético (ATC) 5% p/v. A continuación se centrifugó la mezcla por 15 minutos a 14,000 rpm y se recuperó el sobrenadante para adicionarle 100 μ L de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.5 % p/v y 200 μ L de ATC 20 % p/v. La mezcla así obtenida fue hecha ebulir en baño María por 30 minutos en tubos con la tapa semicerrada. Después de este tiempo los tubos fueron colocados en agua helada de tres a cinco minutos. El contenido de los tubos fue centrifugado por 5 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana hidrofílica. La absorbencia del filtrado fue registrada a una longitud de onda de 532 y 600 nm. Las condiciones del espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 2S) fueron las siguientes: Intervalo de 600 a 400 nm, número de barridos 1, distancia de paso 1 nm, velocidad de barrido 960 nm min^{-1} , suavizado 2.

La cantidad de MDA presente en la muestra fue calculada a partir de un coeficiente de extinción molar⁵ de 152 000 $\text{M}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ de la manera siguiente:

$$\text{MDA} [\text{nmol mg semilla}^{-1}] = \left(\frac{A_{532} - A_{600}}{152\,000} \right) \times 10^6 \times 0.018$$

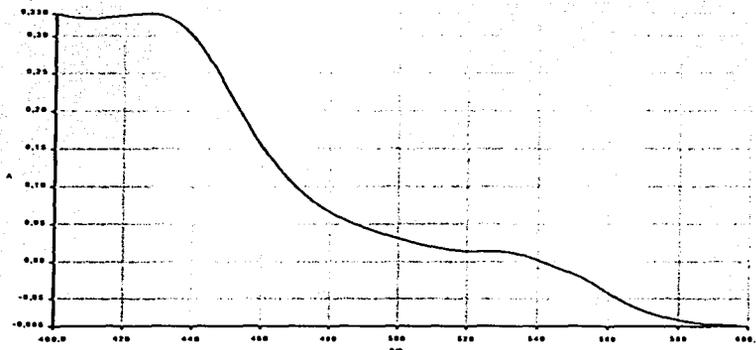


Figura 5. Espectro de luz visible de extracto de semillas de *S. stellatus* para cuantificar MDA.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN SEMILLAS POR MEDIO DE CG-EM

Se pesaron 20 mg de semillas y se maceraron en un mortero adicionando 1 mL de Metóxido de Sodio (MeONa) 0.5% p/v. La mezcla resultante fue agitada en un vórtex por 5 minutos y posteriormente se le adicionaron 0.7 mL de Cloruro de Hidrógeno disuelto en metanol, la mezcla así obtenida fue agitada una vez más en un vórtex por 30 minutos. Después de esto se tomaron 1.5 mL de la mezcla y se centrifugaron por 10 minutos a 14,000 rpm, al sobrenadante se le adicionaron 2 mL de Hexano y una cantidad suficiente de Na_2SO_4 para remover el exceso de agua y se agitó en el vórtex. Finalmente se tomó una alícuota de 1 μL y se inyectó al cromatógrafo (Finnigan MAT). Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes: 250°C de temperatura del inyector, una rampa de temperatura del horno iniciando en 100°C por 3 minutos para luego aumentar hasta 250°C a una tasa de 5°C por minutos manteniéndola así por 4

minutos. Se utilizó Helio como gas acarreador a una velocidad de 35 cm s⁻¹. Las condiciones del detector de masas fueron: Intervalo de 20 a 600 D, polaridad positiva, temperatura de la línea de transferencia de 250°C y temperatura de la fuente de iones de 200°C.

Con el procedimiento anterior es posible el estudio por medio de CG-EM del linoleato, oleiato, palmitato y esteareato de metilo; es decir, de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en estudio. La identificación de cada uno de estos ésteres se realizó mediante su comparación con bases de espectros de masas.

Por no contar con un patrón interno para calcular la concentración de los ácidos grasos se utilizó como una medida de abundancia a la riqueza, una medida de la intensidad de la señal que el programa del cromatógrafo asigna a cada punto del cromatograma en función de su altura. Se puede observar que la riqueza es una medida claramente relativa pero que permite comparar la intensidad de las señales de las diferentes muestras.

Debe resaltarse el hecho de que esta técnica sólo permite el estudio de los ácidos grasos que se encuentran formando parte de los gliceroles membranales y no se consideran los ácidos grasos libres por no derivatizarse por esta técnica.

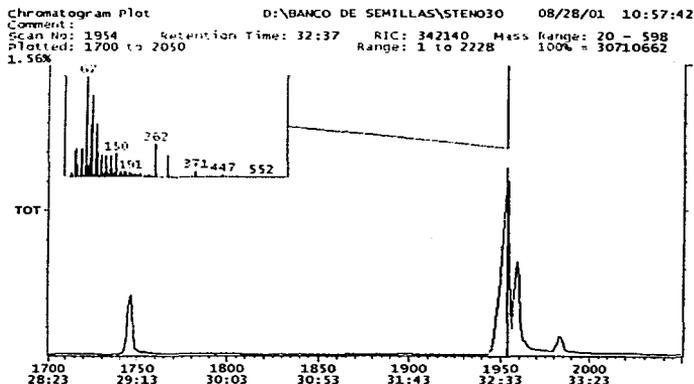


Figura 6. Cromatograma de derivados de ácidos grasos y patrón de fragmentación de masas para el ácido linoleico en una muestra de semillas de *S. stellatus*.

REGISTRO DEL ESPECTRO DE INFRARROJO DE LAS SEMILLAS

Se colocó una cantidad suficiente de semillas en la macrocopia portamuestra del accesorio de reflectancia difusa (Spectra Tech) como para cubrir toda la superficie de la misma y se leyó en el espectrofotómetro de Infrarrojo (Perkin Elmer Spectrum 2000) con las condiciones siguientes: Intervalo de lectura de 7,800 a 600 cm^{-1} , 14 barridos, resolución de 4 cm^{-1} y una distancia de paso de 1 cm^{-1} . Se leyó cada muestra en dos unidades diferentes, porcentaje de Transmitancia (%T) y logaritmo del inverso de la reflectancia ($\log 1/R$).

Con estos espectros se alimentó el programa QUANT+ para análisis quimiométrico para generar un modelo de predicción de los valores MDA, ácidos grasos y germinabilidad mediante los espectros de infrarrojo correspondientes para cada muestra de semillas, procedimiento que realiza mediante un análisis de regresión múltiple.

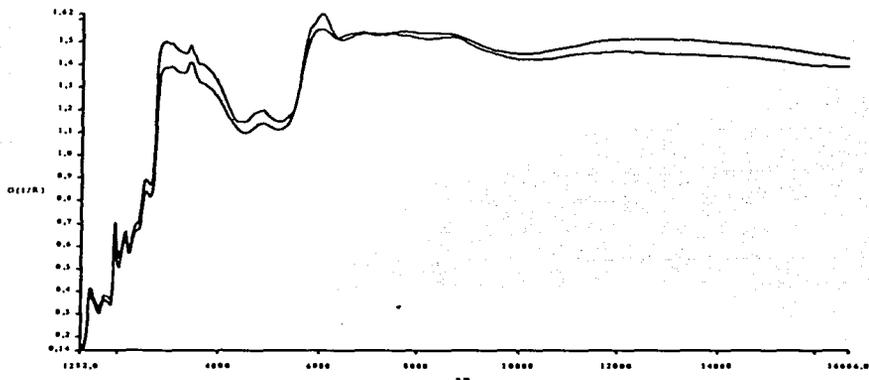


Figura 7. Espectros de reflectancia de infrarrojo cercano y medio de dos muestras de semillas de *S. stellatus* con diferentes periodos de almacenamiento.

DETERMINACIÓN DE LA GERMINABILIDAD

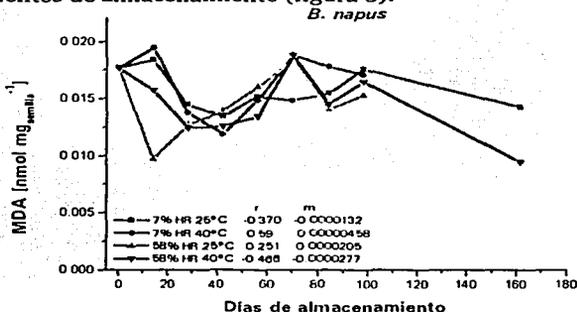
Se tomaron 30 semillas de cada muestra y se colocaron en cajas Petri que contenían papel higiénico húmedo en el fondo y se introdujeron en una cámara de germinación (Growth Chambers) a 25°C con un fotoperiodo de 12 hrs. El porcentaje de germinación se determinó a los cinco días para el caso de *B. napus* y a los treinta días para el caso de *S. stellatus* tomando como parámetro de germinabilidad la emergencia de la radícula.

RESULTADOS

B. napus

MDA

La concentración de MDA no mostró ninguna tendencia clara en ninguno de los tratamientos de almacenamiento (figura 8).



8. Concentración de MDA en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

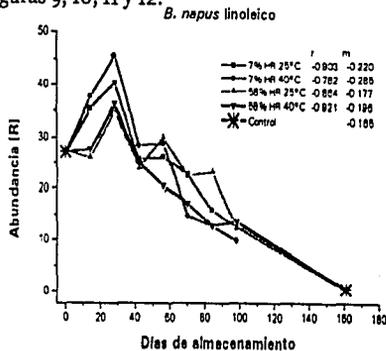
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SEGÚN SU NATURALEZA QUÍMICA

Respecto a la abundancia de ácidos grasos se observó una tendencia final constante a la baja en la abundancia en todos los ácidos grasos que no dependió del tratamiento de almacenamiento al cual fueron sometidas las semillas y que además en todos los casos el valor correspondiente a la muestra control a los ciento sesenta y un días fue prácticamente el mismo que aquellos de los tratamientos de almacenamiento tras el mismo periodo, lo cual indica que no existió un efecto de la temperatura o de la humedad relativa dentro del intervalo aquí estudiado sobre el mecanismo que induce dicha disminución (figuras 9, 10, 11 y 12).

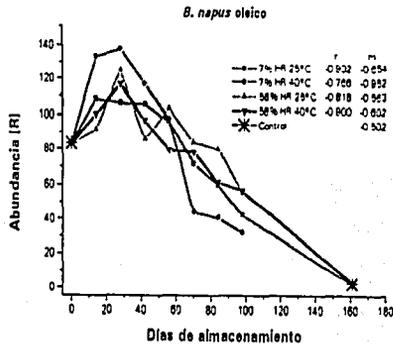
En dichas gráficas también puede observarse un comportamiento llamativo debido a un aumento inicial en la abundancia que alcanzó su máximo alrededor de los veintiocho primeros días para después decaer rápidamente, siendo el aumento más considerable en el caso los ácidos grasos insaturados.

Además, el nivel máximo de ácidos grasos alcanzado por el tratamiento más drástico (58% HR, 40°C) fue ligeramente menor que en el resto de los casos.

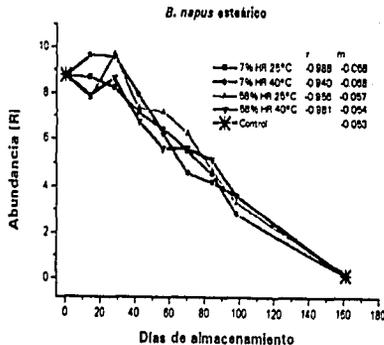
Figuras 9, 10, 11 y 12.



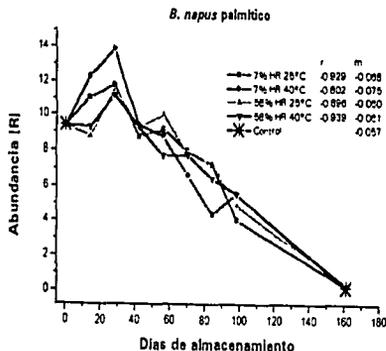
9. Disminución en la abundancia de ácido linoleico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.



10. Disminución en la abundancia de ácido oleico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.



11. Disminución en la abundancia de ácido esteárico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.



12. Disminución en la abundancia de ácido palmítico en semillas de *B. napus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SEGÚN TRATAMIENTO DE ALMACENAMIENTO

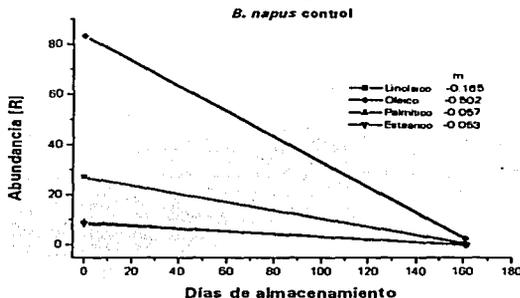
La disminución en la abundancia de ácidos grasos fue mayor para el caso de los ácidos grasos insaturados respecto de los saturados en todos los tratamientos de almacenamiento (figuras 13, 14, 15 y 16).

ÍNDICE DE SATURACIÓN

El índice de saturación, definido aquí como el cociente resultante de dividir la abundancia de ácidos grasos insaturados sobre la abundancia de los ácidos grasos saturados, mostró una tendencia a aumentar su valor hacia el final del periodo de experimentación para el caso de las relaciones oleico / esteárico y oleico / palmítico, mientras que las otras relaciones permanecieron sin cambio significativo (figuras 17, 18, 19 y 20).

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LA MUESTRA CONTROL

Los valores de las dos determinaciones de la abundancia de ácidos grasos para la muestra control al inicio y al final del experimento observaron un patrón similar al de las muestras envejecidas (figura 21).

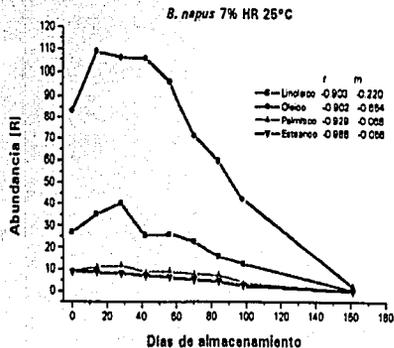


21. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a HR y T ambientes (control).

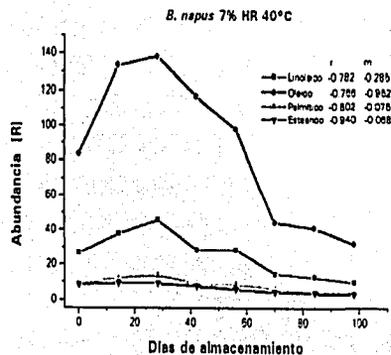
ERIC

El análisis quimiométrico producido por el programa QUANT+ para la abundancia de cada uno de los ácidos grasos estudiados así como para la abundancia de MDA, ambas respecto de los espectros de infrarrojo arrojó que los valo-

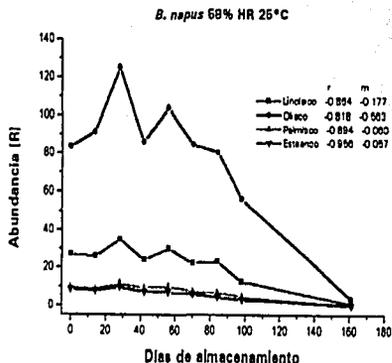
Figuras 13, 14, 15 y 16.



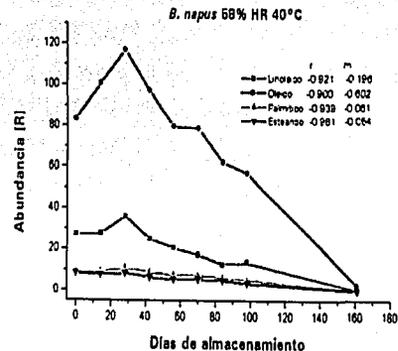
13. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 25°C.



14. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 40°C.

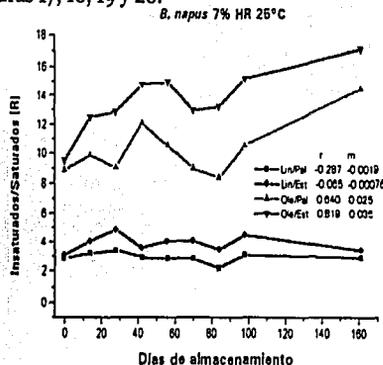


15. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 25°C.

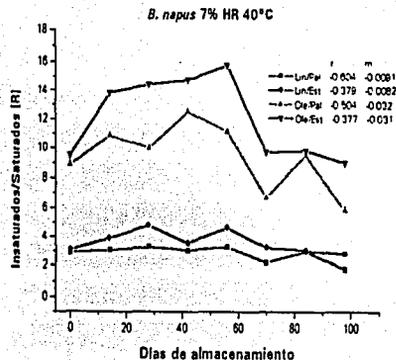


16. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 40°C.

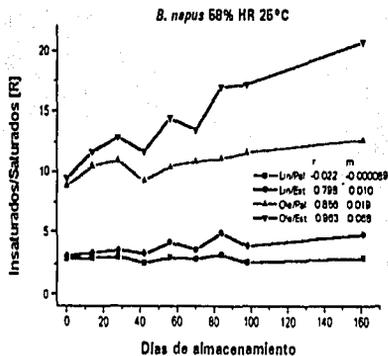
Figuras 17, 18, 19 y 20.



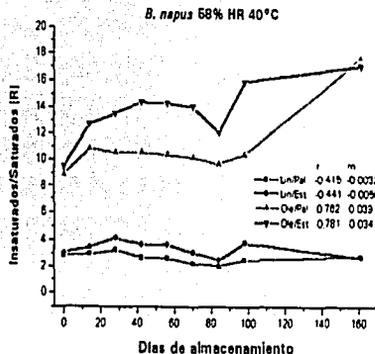
17. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus*



18. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 40°C.

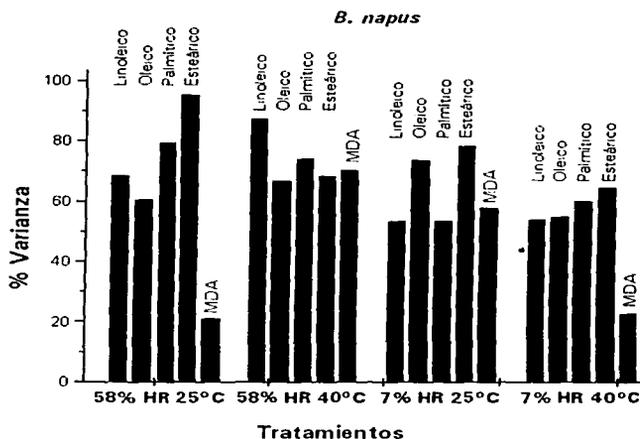


19. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 25°C.



20. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 58% HR y 40°C.

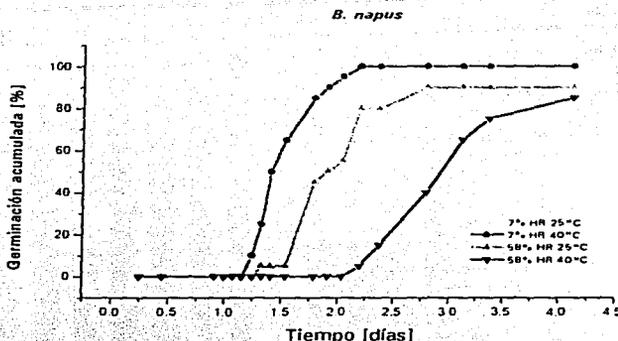
res de predicción quimiométrica (% Varianza) más altos fueron alcanzados por el ácido esteárico en tres de los cuatro tratamientos y que los valores más bajos fueron asignados para el MDA. En general se puede considerar que los valores de predicción de la abundancia de los ácidos grasos por este medio fueron de regulares a buenos y sólo el valor de predicción de la abundancia de MDA resultó ser malo (figura 22).



22. Grado de correlación entre la abundancia de ácidos grasos y los espectros de ERIC correspondientes en semillas de *B. napus*.

GERMINABILIDAD

La germinabilidad no fue alterada significativamente por los tratamientos de almacenamiento, manteniéndose en valores arriba del 95% a lo largo de todo el experimento (valor comparable con el de la muestra control). Sin embargo, el vigor de las semillas luego de ciento sesenta y un días de almacenamiento sí fue afectado, pudiéndose apreciar como las semillas sometidas al tratamiento de 58% HR y 40°C mostraron una germinación acumulada notablemente menor que en el resto de los tratamientos al germinar a una temperatura de 15°C, lo cual se puede apreciar en los valores distintos del tiempo de reposo o tiempo al inicio de la germinación para cada tratamiento (figura 23).

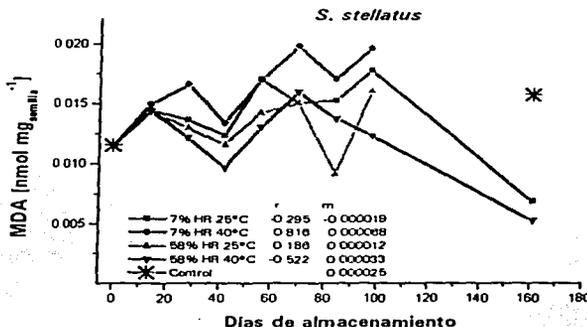


23. Efecto de las condiciones de almacenamiento tras 161 días sobre la germinación a 15°C de semillas de *B. napus*.

S. stellatus

MDA

La concentración de MDA no mostró una tendencia bien definida en ninguno de los tratamientos de almacenamiento. Es interesante resaltar el hecho de que la muestra control a ciento sesenta y un días de iniciado el experimento presentó un valor dentro del intervalo de variación de la abundancia de las muestras almacenadas bajo condiciones experimentales. (figura 24).



24. Concentración de MDA en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SEGÚN SU NATURALEZA QUÍMICA

La tasa de disminución de la abundancia de ácidos grasos mostró una tendencia a disminuir y fue prácticamente la misma en todos los tratamientos de almacenamiento (figuras 25, 26, 27 y 28).

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SEGÚN TRATAMIENTO DE ALMACENAMIENTO

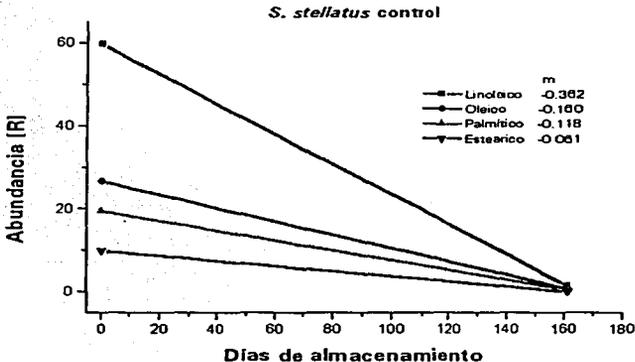
La disminución en la abundancia de ácidos grasos fue mayor para el caso de los insaturados respecto de los saturados (figuras 29, 30, 31 y 32).

ÍNDICE DE SATURACIÓN

El índice de saturación mostró una tendencia a aumentar su valor hacia el final del periodo de experimentación, siendo la relación linoleico / esteárico la que arrojó los valores más altos (figuras 33, 34, 35 y 36).

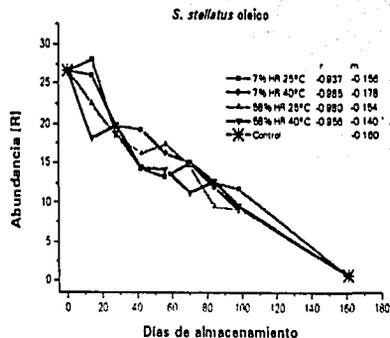
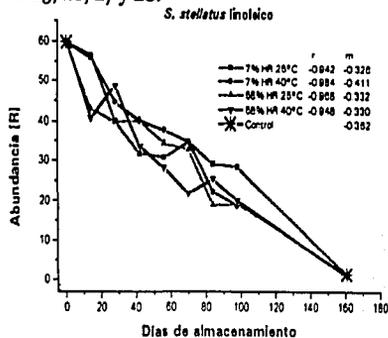
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LA MUESTRA CONTROL

Los valores de las dos determinaciones de la abundancia de ácidos grasos para la muestra control al inicio y al final del experimento arrojaron un patrón similar al observado para las muestras envejecidas (figura 37).



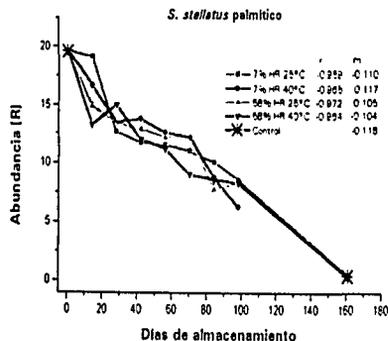
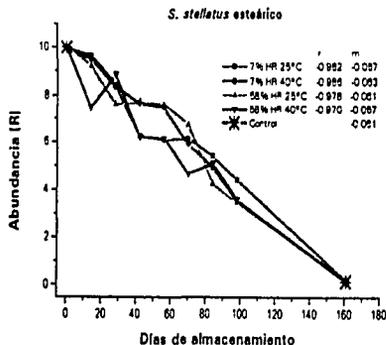
37. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a HR y T ambientes (control).

Figuras 25, 26, 27 y 28.



25. Disminución en la abundancia de ácido linoleico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

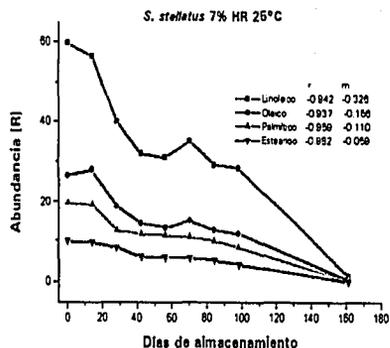
26. Disminución en la abundancia de ácido oleico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.



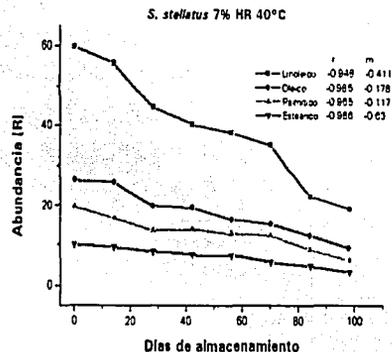
27. Disminución en la abundancia de ácido esteárico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

28. Disminución en la abundancia de ácido palmítico en semillas de *S. stellatus* bajo cuatro diferentes condiciones de almacenamiento.

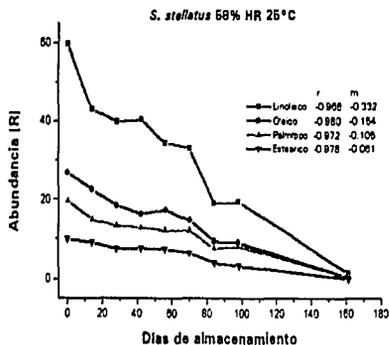
Figuras 29, 30, 31 y 32.



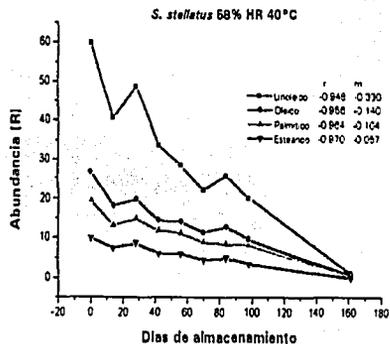
29. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 25°C.



30. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 40°C.

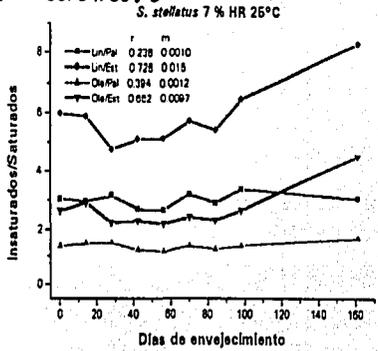


31. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 25°C.

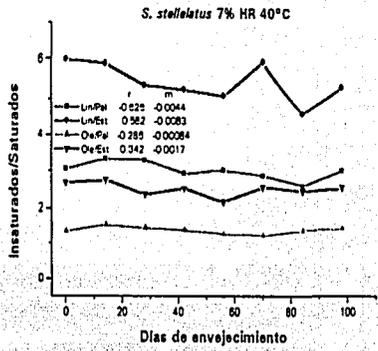


32. Disminución en la abundancia de ácidos grasos en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 40°C.

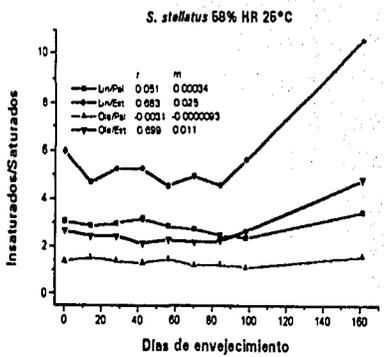
Figuras 33, 34, 35 y 36.



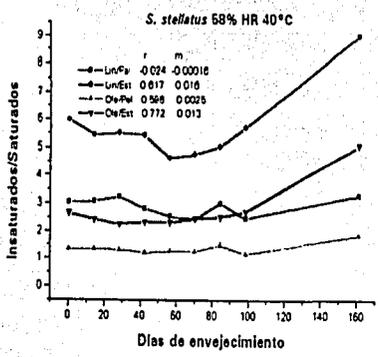
33. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *B. napus* almacenadas a 7% HR y 25°C.



34. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 7% HR y 25°C.



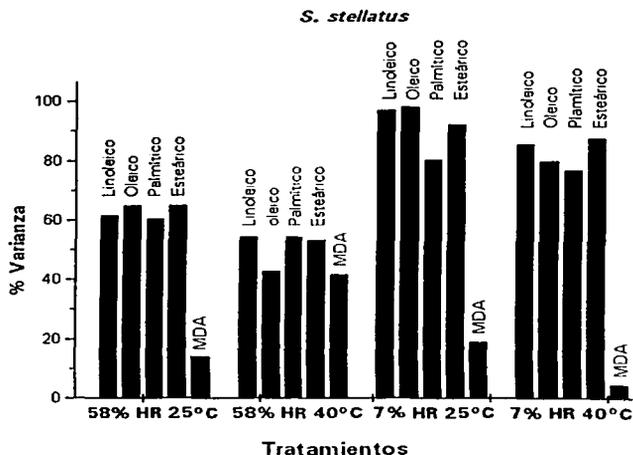
35. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 25°C.



36. Variación en el valor del índice de saturación en semillas de *S. stellatus* almacenadas a 58% HR y 40°C.

ERIC

El análisis realizado por el programa QUANT+ arrojó valores de predicción quimiométrica (% Varianza) buenos para la abundancia de cada uno de los ácidos grasos estudiados cuando la HR fue baja (7%) y regulares cuando la HR fue alta (58%), mientras que para el caso de la concentración de MDA el valor fue malo en todos los casos (figura 38).



38. Grado de correlación entre la abundancia de ácidos grasos y los espectros de ERIC correspondientes en semillas de *S. stellatus*.

GERMINABILIDAD

La germinabilidad nunca se vio alterada significativamente por los tratamientos de envejecimiento, manteniéndose en valores arriba del 75% a lo largo de todo el experimento (valor comparable con el de la muestra control). En este caso la germinación acumulada no fue obtenida.

DISCUSIÓN

La concentración de MDA mostró un patrón errático en función del tiempo en todos de los tratamientos de almacenamiento para las dos especies estudiadas. Además, el valor de la concentración de MDA en la muestra control a los ciento sesenta y un días en *S. stellatus* se halló dentro del intervalo de variación de los tratamientos experimentales. Bajo condiciones similares de temperatura de alrededor de 45°C se encuentra un aumento del 25% en la concentración de MDA en semillas de *Arachis hypogaea* L. almacenadas a 79% de HR por seis días y una disminución de entre el 75 y el 45% en la germinación¹⁶, las semillas de *Atriplex cordobensis* almacenadas a 100% de HR presentan un incremento del 300% en la concentración de MDA y una disminución del 100% en la germinación por setenta y dos horas y semillas de la especie *Cajanus cajan* almacenadas a 100% de HR por ocho días muestran una disminución en la concentración de MDA de 50% pero al mismo tiempo un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa de más del 300% con una disminución de más del 90% en la germinación¹⁷.

Resulta evidente que las condiciones de almacenamiento utilizadas no fueron lo suficientemente severas como para inducir daños suficientes como para afectar la capacidad germinativa de las semillas estudiadas ni tampoco para elevar los niveles de MDA presentes en las células. Sin embargo, en experimentos posteriores en donde semillas de *B. napus* fueron sometidas a condiciones de almacenamiento de 50% de HR y 50°C la germinación disminuía hasta un cuarenta por ciento luego de siete días y para 76% de HR y 60°C y en veinticuatro horas se obtuvo una disminución del cien por ciento en la germinación. En ninguno de los casos anteriores se efectuaron mediciones de abundancia de MDA o ácidos grasos. Sin embargo, condiciones de almacenamiento tan severas podrían no reflejar procesos de deterioro natural en las semillas y más bien podría pensarse que el efecto sinérgico de humedad relativa y temperatura elevadas traería como consecuencia eventos de desnaturalización de proteínas o ADN y no eventos de peroxidación como los que se trata de estudiar. De esta forma, tal vez la mejor opción sería aumentar sólo la humedad relativa a la cual se deben almacenar las semillas de las especies estudiadas, pues como se ha referido, parece ser que bajo esas condiciones el fenómeno de la peroxidación de ácidos grasos ocurre normalmente. Otra posibilidad sería que no se hubiera detectado un incremento en la con-

centración de MDA no porque bajo las condiciones de almacenamiento en estudio no se hubieran formado radicales libres, sino porque las semillas hubieran sido capaces de desactivarlos antes de que produjeran un daño severo. De esta manera puede considerarse que el hecho de encontrar un patrón errático en la concentración de MDA en las especies estudiadas pudo obedecer a factores de eliminación de radicales libres eficientes como una concentración elevada de antioxidantes o una actividad enzimática exótica capaz de funcionar bajo condiciones de mínima concentración de agua intracelular o incluso presentar barreras físicas que impidan la formación de radicales libres.

En el primer caso se reportan disminuciones en la concentración de antioxidantes en función del tiempo tanto en semillas de *Acer platanoides* almacenadas a 10% CA y -3°C por 7 años²⁴ como en semillas de *A. hypogaea* almacenadas a 79% HR y 45°C por 9 días¹⁶. Dichas disminuciones son relacionadas a un consumo de los mismos como resultado de un aumento en la concentración de radicales libres en las células de las semillas.

Por lo que respecta a la actividad enzimática desintoxicante, en semillas de *C. cajan* la actividad de la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa muestra un aumento tras ser almacenadas a 100% HR y 40°C por ocho días¹⁷ pero en semillas de *A. hypogaea* almacenadas a 79% HR y 45°C por 9 días las mismas enzimas presentan disminución en su actividad luego de ser envejecidas¹⁶. Sin embargo estos resultados son cuestionables, pues en semillas de *G. max* se encuentra que la actividad de la superóxido dismutasa aumenta hasta un máximo y luego decae rápidamente en función del tiempo de imbibición tanto en semillas almacenadas a 100% HR y 45°C como en semillas almacenadas a 45°C en una atmósfera anhidra por siete días³⁰, es decir, pudiera ser que la actividad enzimática registrada dependa del grado de desnaturalización presente en las enzimas de las semillas en envejecimiento y su capacidad para renaturalizarse tras la imbibición y no tanto de la concentración de radicales libres. De esta manera, el problema es determinar si las enzimas *in situ* están activas o lo que se está registrando es sólo su actividad luego de ser diluidas para realizar las pruebas de actividad.

Finalmente, tal vez la función de ciertas estructuras anatómicas sobre la formación y acumulación de radicales libres sea determinante en la fisiología de las semillas. Como las mediciones fueron efectuadas en semillas completas no se puede discriminar el aporte diferencial de estructuras como la testa, los

cotiledones o el eje embrionario sobre la posible formación y acumulación de radicales libres en alguna de ellas, de esta forma si dichos eventos hubieran ocurrido a una intensidad baja de manera específica en un tejido podrían haber sido enmascarados al considerar a la semilla entera. En este sentido se han encontrado diferencias en las amplitudes de la señal de RPE que se encuentran en testas y cotiledones de semillas de *G. max* almacenadas a 1% HR y 35°C por setenta días, en donde el aumento en la amplitud de la señal en las testas es del 100%, mientras que en los cotiledones sólo aumenta 10% cuando son expuestas a la luz; sin embargo, ambas estructuras bajo la oscuridad presentan un aumento del 10%; asimismo, el aumento en la concentración de MDA mostró el mismo comportamiento, teniendo el aumento máximo en las testas iluminadas; la germinación disminuyó un veinte por ciento a la luz y sólo un diez por ciento en la oscuridad¹⁸. Si bien en este trabajo es evidente que la formación de radicales libres obedece una catálisis fotónica, proceso que no podría ser posible de ocurrir en las semillas en estudio por haber sido almacenadas en oscuridad, lo importante es resaltar las diferencias en los resultados en mediciones que implican presencia de radicales libres en una concentración dependiente del tipo de tejido. De la misma manera en semillas de *A. hypogaea* almacenadas a 79% HR y 45°C la concentración de MDA es mayor en los ejes que en los cotiledones de semillas envejecidas¹⁶.

Por otro lado, la disminución en la abundancia de ácidos grasos mostró una mayor intensidad para el caso de los ácidos grasos insaturados, mostró un comportamiento diferente al que muestran las semillas de *G. max* almacenadas a 100% de HR y 45°C por siete días³⁰ ya que en este caso la cantidad de ácido palmítico y esteárico aumenta, pero el comportamiento fue similar en el caso del ácido oleico, el cual aumenta su abundancia hasta un máximo y luego comienza a decaer, por último el ácido linoleico muestra una clara tendencia a la baja en su abundancia durante todo el periodo de envejecimiento. Sin embargo, semillas de *Lypopersicon esculentum*⁶ muestran el mismo comportamiento que las semillas de *S. stellatus*, ya que la abundancia de los ácidos palmítico, esteárico y oleico disminuye alrededor de un cuarenta por ciento, pero la abundancia del ácido linoleico disminuye casi un cien por ciento, mostrando también un incremento de su valor hacia un máximo al final del primer séptimo del tiempo de almacenamiento, tal y como ocurrió en las semillas de *B. napus*.

Los resultados anteriores son obtenidos para la fracción polar de los ácidos grasos presentes en las semillas, por lo que son comparables a los resultados que se obtuvieron en este estudio, pues como se menciona arriba, la técnica empleada sólo permite analizar los ácidos grasos que forman parte de fosfolípidos (fracción polar), los lípidos que constituyen las membranas celulares. De esta manera, cuando se discriminan los ácidos grasos de la fracción polar de los ácidos grasos de reserva en semillas de *Helianthus annuus* L. almacenadas a 100% de HR y 42°C por ocho días, son precisamente estos últimos los que presentan una disminución de mayor magnitud; dichas semillas presentan una disminución de veinticinco por ciento en la germinación⁸. Las semillas de esta especie tienen un contenido de aceite elevado al igual que las semillas de *B. napus*³¹, por lo que sólo por una cuestión de probabilidad es más posible que los ácidos grasos que se peroxiden sean los de reserva, a pesar de que el modelo de peroxidación establece que los ácidos grasos de las biomembranas son más susceptibles de peroxidarse como consecuencia de su mayor superficie de exposición y su mayor grado de insaturación con respecto de los ácidos grasos de reserva (Wilson 86). En semillas de *A. hypogaea* almacenadas a 79% y 45°C de HR por seis días la abundancia de ácidos grasos de la fracción polar se mantiene constante para el caso del ácido palmítico, aumenta para el oleico y disminuye para el caso del linoleico¹⁶.

En todos los casos anteriores se consideran los valores obtenidos para semillas enteras, pero cuando se considera la abundancia de ácido linoleico y linolenico en ejes embrionarios de semillas de *Pisum sativum* L. almacenadas a 92% de HR y 30°C por 70 días se tiene que la mayor disminución de ambos se da proporcionalmente en los ejes y que en este caso en particular es la abundancia del ácido linolenico la que disminuye mayormente¹¹.

De acuerdo con estas evidencias y considerando que la disminución del valor de la abundancia de ácidos grasos no presentó diferencia entre los tratamientos experimentales y el control podría suponerse que dicha disminución corresponde más bien a un proceso natural en el metabolismo de las semillas bajo estudio y no a un resultado de eventos de peroxidación lipídica.

Por lo que toca al análisis quimiométrico utilizando los espectros de infrarrojo de las semillas el objetivo principal de construir un modelo para predecir la germinabilidad residual de las mismas no se pudo cumplir, pues al no dismi-

nunca el porcentaje de germinación no fue posible construir la curva de calibración, pues la significancia sería nula. Sin embargo, si se considera que la óptica de los aparatos utilizados no fue desarrollada para muestras con superficies tan irregulares como lo fueron las semillas cuando se utilizaron estos mismos espectros de infrarrojo de las semillas para calibrar curvas de abundancia de ácidos grasos los resultados son aceptables, es decir, la técnica es lo suficientemente sensible como para hallar diferencias en la composición de las semillas. Por lo tanto, si se considera esta limitación instrumental y se logran inducir daños tales en las semillas que impliquen una disminución en su germinabilidad y que dicha disminución este asociada a cambios en la composición de las semillas detectables por la ERIC resulta prometedor el empleo de esta técnica como una prueba de viabilidad no destructiva en colecciones de semillas.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de HR y T de almacenamiento no fueron lo suficientemente drásticas como para inducir una disminución de la germinabilidad durante el tiempo de experimentación, imposibilitando explorar la efectividad del uso de la ERIC como un método no destructivo de evaluación del envejecimiento de semillas, pero si afectaron negativamente el vigor de las mismas, al menos en las condiciones de almacenamiento más drásticas en *B. napus* (58% HR y 40°C).
- La abundancia de ácidos grasos mostró una tendencia clara a la disminución hacia el final del experimento en todos los tratamientos de almacenamiento, siendo más intensa para el caso de los ácidos grasos insaturados, permitiendo que, dependiendo del tratamiento de almacenamiento y la especie empleados, el nivel de confiabilidad en la predicción de la abundancia de ácidos grasos por medio del uso de la ERIC sea bueno.
- La concentración de MDA no mostró ninguna tendencia clara a aumentar en ningún caso, impidiendo establecer la ocurrencia de la peroxidación de ácidos grasos en las semillas estudiadas.
- La ERIC mostró suficiente sensibilidad como para detectar cambios en los espectros de infrarrojo de las semillas y pudo correlacionar dichos cambios de manera aceptable con la abundancia de los ácidos grasos estudiados determinada por CG-EM.
- Se sugiere realizar experimentos que impliquen periodos de experimentación más largos utilizando las mismas condiciones empleadas en este estudio o bien emplear condiciones de almacenamiento más drásticas (temperatura y humedad relativa más altas) así como efectuar mediciones por separado de las diferentes estructuras anatómicas con el fin de generar una imagen más clara del proceso de envejecimiento acelerado de semillas en *B. napus* y *S. stellatus* y la posible predicción de su germinabilidad residual por medio del uso de la ERIC como un método no destructivo de estudio.

REFERENCIAS

- ¹ Aiazzi M., Argüello J., Pérez A., Di Rienzo J., Guzmán C. 1996. Deterioration in *Atriplex cordobensis* (Gandoger et Stuckert) seeds: Natural and accelerated ageing. *Seed Science and Technology*, **25**: 147-155.
- ² Asakawa T., Matsushita S. 1980. Coloring conditions of the thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, **15**: 137-140.
- ³ Bravo H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol I. UNAM. México. 743 pp.
- ⁴ Dell'Aquila A. 1994. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science and Research*, **4**: 293-298.
- ⁵ Esterbauer H., Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hidroxy-nonenal. En: Packer L., Glazer A. (Eds.). 1990. Methods in enzymology. Vol. 186. Academic Press. USA. pp: 407-421.
- ⁶ Francis A., Coolbear P. 1988. Changes in the fatty acid content of the polar lipid fraction of tomato seeds induced by ageing and/or subsequent low temperature pre-sowing treatment. *Seed Science and Technology*, **16**: 87-95.
- ⁷ Golovina E., Tikhonov A., Hoekstra F. 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiology*, **114**: 383-389.
- ⁸ Gidrol X., Serghini H., Noubhani A., Mocouot B., Mazaliak P. 1989. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum*, **76**: 591-597.
- ⁹ Hailstones M., Smith M. 1988. Lipid peroxidation in relation to decline vigor in seeds of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*, **133**: 452-456.
- ¹⁰ Halliwell B., Gutteridge J. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, **23**: 1396-1397.
- ¹¹ Harman G., Mattick L. 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Science*, **260**: 323-324.
- ¹² Hendry G. 1993. Oxygen, free radical process and seed longevity. *Seed Science Research*, **3**: 141-153.

- ¹³ Hendry G. 1997. Free radical in seeds-Moving the debate forward. En: Ellis R., Black M., Murdoch A., Hong T. (Eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publishers. GB. 657-663 pp.
- ¹⁴ Hendry G., Finch-Savage W., Thorpe P., Atherton N., Buckland S., Nilsson K., Seel W. 1992. Free radical process and loss of seed viability during the desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytologist*, **122**: 273-279.
- ¹⁵ Hepburn H., Goodman B., McPhail D., Matthews S., Powell A. 1986. An evaluation of RPE measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany*, **37**: 1675-1684.
- ¹⁶ Jeng T., Sung J. 1994. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*, **91**: 51-55.
- ¹⁷ Kalpana R., Madhava Rao K. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of sedes of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. *Seed Science and Technology*, **22**: 253-260.
- ¹⁸ Khan M., Hendry G., Atherton N., Vertucci-Walters C. 1996. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: A light-promoted process. *Seed Science Research*, **6**: 101-107.
- ¹⁹ Linington S., Pritchard H. 2001. Gene banks. En: *Encyclopedia of Biodiversity*. Vol III. Academic Press. 165-181.
- ²⁰ Mead J. 1980. Membrane lipid peroxidation and its prevention. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **57**: 393-397.
- ²¹ Ohlrogge J., Kernan T. 1982. Oxygen-dependent aging of seeds. *Plant Physiology*, **70**: 791-794.
- ²² Powell A., Harman G. 1985. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. *Seed Science and Technology*, **13**: 659-667.
- ²³ Priestley D. 1986. Seed ageing. Cornell University Press. USA. 39-75.
- ²⁴ Pukacka S. 1991. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of seeds of *Acer platanoides*. *Physiologia Plantarum*, **82**: 306-310.
- ²⁵ Robert H., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**: 189-198.

- ²⁶ Roberts E., Ellis R. 1989. Water and seed survival. *Annals of Botany*, **63**: 39-52.
- ²⁷ Robertson J., Barton F. 1984. Oil and water analysis of sunflower seed by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **61**: 543-547.
- ²⁸ Rollins R. 1993. The Cruciferae of continental North America. Stanford University Press. USA. 223-227.
- ²⁹ Shenk J., Westerhaus M. 1993. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Infracsoft International. Port Matilda. 116pp.
- ³⁰ Stewart R., Bewley J. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, **65**: 245-248.
- ³¹ Vaugahn J., MacLeod A., Jones B. 1976. The biology and chemistry of the Criceferae. Academic Press. GB. 355 pp.
- ³² Velasco L., Fernández-Martínez J., De Haro A. 1997. Determination of the fatty acid composition of the oil in intact-seed mustard by near-infrared reflectance spectroscopy. *American Oil Chemists' Society*, **74**: 1595-1602.
- ³³ Velasco L., Becker H. 1998. Estimating the fatty acid composition of the oil intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, **101**: 221-230.
- ³⁴ Velasco L., Matthäus B., Möllers C. 1998. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: I. Analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, **38**: 1645-1650.
- ³⁵ Velasco L., Möllers C. 1998. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: II. Evaluation of germoplasm and identification of phenotypes with reduced levels. *Crop Science*, **38**: 1650-1654.
- ³⁶ Velasco L., Möllers C., Becker H. 1999. Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, **106**: 79-85.
- ³⁷ Velasco L., Becker C. 2000. Variability for seed glucosinolates in germoplasm collection of the genus *Brassica*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **47**: 231-238.

- ³⁸Vertucci W., Roos E. 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*, **3**: 201-213.
- ³⁹Wilson D. Jr., McDonald M. Jr. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology*, **14**: 269-300.
- ⁴⁰Zhang M., Maeda Y., Furihata Y., Nakamaru Y., Esashi Y. 1994. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. *Seed Science Research*, **4**: 49-56.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATB: Ácido tiobarbitúrico.

ATC: Ácido tricloroacético.

CA: Contenido de agua.

CG-EM: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

ERIC: Espectroscopía de Reflectancia de Infrarrojo Cercano.

HR: Humedad relativa.

MDA: Malón dialdehído.

Vis: Espectroscopía de luz Visible.

RPE: Resonancia Paramagnética Electrónica.