



10  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ZES

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

EFFECTOS DEL DETERIORO EN LA VIABILIDAD DE  
SEMILLAS DE MAIZ: ALTERACIONES EN EL  
PROCESO DE LA TRADUCCION

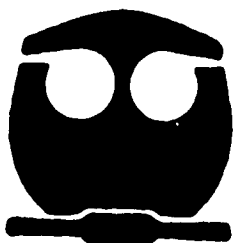
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

SERGIO CAMACHO CRUZ



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

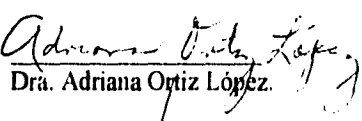
Presidente: Prof. Estela Sánchez de Jiménez.  
Vocal: Prof. Zoila Nieto Villalobos.  
Secretario: Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos.  
1er Suplente Prof. Rogelio Rodríguez Sotres.  
2do Suplente Prof. Amelia María de Guadalupe Farres González Saravia.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 105 del Departamento de Bioquímica Vegetal, División de Estudios de Posgrado, Conjunto E. Facultad de Química. UNAM, con el apoyo de DGAPA, en el proyecto denominado: "REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EMBRIONES DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION" IN200793.

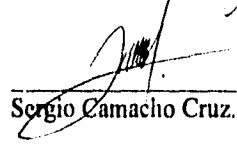
Asesor del tema:

  
Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Supervisor Técnico:

  
Dra. Adriana Ortiz López.

Sustentante:

  
Sergio Camacho Cruz.

# C O N T E N I D O

	página:
Resumen.	1
Introducción.	3
1.0.- Antecedentes.	8
1.1 Estructura de la semilla de maíz.	8
1.2 El proceso de la germinación.	9
1.3 Bases bioquímicas de la germinación y del deterioro de ésta. Repercusión en el vigor.	10
1.4 Alteraciones en el DNA asociadas con detrimentos en la viabilidad de semillas.	15
1.5 Alteraciones en la maquinaria traduccional.	18
2.0.- Materiales y métodos.	22
2.1 Curvas de germinación.	22
2.2 Preparación de material biológico.	22
2.3 Preparación de polisomas.	23
2.4 Análisis de distribución de polisomas sobre gradientes de densidad de sacarosa.	24
2.5 Aislamiento de RNA total y análisis de Northern blot.	25
3.0.- Resultados.	27
4.0.- Discusión.	42
5.0.- Conclusiones.	48
6.0.- Bibliografía.	49

***Agradezco ante todo a mi madre, a quien debo el haber realizado y concluído estos estudios.***

***A mi hermano Jorge.***

***Y por supuesto a la UNAM.***

***No puedo omitir un agradecimiento especial a las Dras. Estela Sánchez y Adriana Ortiz López por sus valiosísimas asesorías.***

***A mis amigas, amigos y demás seres queridos: Enrique Marroquín, Juan (el F.), Alejandra, Miguel Ríos (de M.), David (a) Morales, Rebeca, Sandra, Gladys, Fabiola, Panchillo, Mario, Lorna, Alberto, Simón, Alicia, Sofía, Edgar, Toño, Edna, Carlos etc.***

## RESUMEN

El trabajo de tesis realizado se hizo con la finalidad de contestar a la pregunta de si la movilización de mensajes almacenados en embriones de semilla de maíz, se veía afectada por estrés (almacenamiento a temperatura de 40°C y humedad de saturación), durante la germinación. Se eligió como marcador para el desarrollo de los experimentos, un mensaje que codifica para una glicoproteína de pared celular rica en hidroxiprolina (HRGP), el cual fue monitoreado con el cDNA de la misma HRGP de maíz, usado como sonda radiactiva, durante los ensayos de hibridación. El material biológico de experimentación lo constituyeron embriones de maíz (Zea mays L.), de la variedad criolla Chalqueño. Se compararon embriones de maíz deteriorado y de maíz normal (control), los cuales se obtuvieron por desecación normal.

Se hicieron curvas de germinación y se determinaron porcentajes de germinación, mismos que fueron menores en las semillas estresadas respecto a los controles.

A partir de los embriones germinados, por 6 ó 24 horas, se obtuvieron homogenados de los cuales, luego de ser centrifugados, se separaron los sobrenadantes, mismos que se cargaron directamente sobre gradientes de densidad de sacarosa de 15 a 55% que, *a posteriori*, fueron ultracentrifugados. De esta forma se logró separar a lo largo de los gradientes, a las fracciones polisomal y no polisomal. Después, mediante la determinación del área bajo la curva de los perfiles de absorbancia vs número de fracción de los gradientes, se calcularon las razones de dichas áreas : (1) área de la fracción polisomal / área de la fracción polisomal + área de la fracción no polisomal y (2) área de la fracción polisomal / área de la fracción no polisomal. Los resultados mostraron que para el caso de los perfiles de semilla deteriorada las razones eran menores respecto al control lo cual sugiere que la cantidad de los mensajes

almacenados que estaban siendo movilizados se veía disminuida por efecto del estrés en este tipo de semilla.

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a hacer análisis de Northern blot. Para este efecto se obtuvieron por precipitación muestras de RNA total de los gradientes de densidad de sacarosa, y se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes, después se transfirieron las muestras desde el gel a un soporte sólido (una membrana de nylon), y a continuación se hibridó con la sonda molecular radiactiva ( inserto del gen que codifica para la glicoproteína). El objeto de este experimento era saber si este mensaje sería representativo de los mRNAs cuya movilización se había visto afectada por el estrés, como lo sugerían los resultados de los perfiles de gradientes de sacarosa. Los resultados derivados del Northern blot mostraron que a un momento temprano de la germinación (6 horas), la cantidad del mensaje movilizado desde la fracción no polisomal a la fracción polisomal, disminuyó en los embriones de semillas deterioradas respecto al control, y en un momento tardío de la germinación (24 horas), casi todo el mensaje en las semillas deterioradas quedaba en la zona no polisomal, esto es, prácticamente nada de mensaje se movilizó en las muestras de semillas deterioradas y en el caso del control, sí hubo una movilización notable. Lo implica que éste fue uno de los aspectos de la síntesis de proteínas que se vio afectado por efecto del estrés que, además, también influyó en la germinabilidad de las semillas estresadas.

## INTRODUCCION

De toda la producción agrícola que se genera en nuestro país, la del maíz es quizá la más importante y sin duda es la que mayor aportación tiene en el aspecto de la alimentación nacional.

La aplicación de procesos artificiales de secado a diversos granos y semillas, entre ellos el propio maíz, con el objeto de acelerar la maduración de la semilla, así como las condiciones climatológicas de ciertas regiones, temperaturas y humedades relativas altas, etc, ocasionalmente propician daños en los granos, de entre los cuales podemos citar a los siguientes:

- decoloración
- pérdida parcial o total del poder germinativo,
- diminución de su calidad nutricional,
- susceptibilidad a la infestación, etc.

que pueden transformar a los granos en productos no aptos para consumo y a las semillas en productos no viables (Hoseney 1991).

Las plantas que económicamente son de mayor relevancia son crecidas u obtenidas a partir de semillas y esto lleva a la necesidad de tener conocimiento sobre su fisiología de germinación, así como de los mecanismos moleculares que se ven involucrados en ésta. Esto desde luego implica saber cómo afectan a la germinación tanto factores físicos como químicos: temperatura, agua, luz, inhibidores, etc. pero no sólo en el momento mismo en que se pone a germinar a la semilla, sino también durante el tiempo en que ésta se almacena.

El éxito en la germinación de una semilla, se basa en dos aspectos primordiales:

-Su viabilidad, entendida como su capacidad para germinar, y su vigor o resistencia, entendida como su capacidad para emerger de la tierra, de ahí la relevancia del



conocimiento de la relación entre factores como temperatura y humedad con viabilidad y longevidad (Black, 1989).

El tiempo durante el cual las semillas pueden permanecer viables está determinado genéticamente; sin embargo, los factores ambientales así como las condiciones de almacenamiento tienen un efecto decisivo en su viabilidad, y en general ésta es mayormente retenida bajo condiciones en las cuales la actividad metabólica de la semilla es muy reducida, *v. gr* bajas temperaturas y concentración alta de CO<sub>2</sub>.

Es conocido que la síntesis de proteínas es uno de los procesos bioquímicos más importantes que ocurren durante la germinación. Hay tres evidencias que confirman el acaecimiento de este evento durante la misma y son:

- (1) La aparición de actividad enzimática o su incremento durante la germinación,
- (2) El decremento de la actividad enzimática en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, y
- (3) Varios estudios basados en la incorporación de precursores radiactivos en proteínas nuevas o preexistentes, usando técnicas de electroforesis bidimensional combinadas con fluororadiografías (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989).

Se ha encontrado que embriones no viables de cereales y legumbres no pueden llevar a cabo la síntesis de proteínas después de que éstos son embebidos. Sin embargo, embriones de cereales viables, pero que han sido expuestos bastante tiempo a condiciones inadecuadas de almacenamiento, exhiben reducción en su capacidad para sintetizar proteínas. Por ejemplo, embriones de arroz de una población que posee el 86% de viabilidad (la cual muestra un crecimiento reducido en la raíz después de la germinación, además de pérdida de vigor) tiene sólo un 20% de la capacidad de síntesis de proteínas (medida por incorporación de aminoácidos radiactivos) de otra población de estas semillas que posee un 95% de viabilidad (la

cual, por cierto, no muestra pérdida de vigor). La disminución de la capacidad de síntesis de proteínas de algunas especies de semillas está correlacionada, por tanto, con una declinación en la actividad de varios componentes citoplásmicos incluyendo factores de iniciación y elongación del proceso de la traducción (Bewley, 1986).

El proceso traduccional o de síntesis de proteínas como también se conoce, se compone de cinco etapas principales y sigue, aunque con algunos aspectos diferenciales, el mismo patrón tanto en procariotas como en eucariotas. La primera de estas etapas, la cual se desarrolla en el citosol, comprende una serie de uniones covalentes entre cada uno de los 20 aminoácidos y sus respectivos ácidos ribonucleicos de transferencia (tRNAs), uniones catalizadas por enzimas dependientes de  $Mg^{2+}$  específicas tanto para el aminoácido como para su tRNA. Inmediatamente después de que el ácido ribonucleico mensajero (mRNA), portador del código que especifica al polipéptido (proteína) que habrá de ser sintetizado, se une a la subunidad menor del ribosoma, lo hace el aminoácido iniciador unido a su tRNA, dando como resultado la formación de un complejo de iniciación (aminoácido-tRNA-ribosoma-mRNA). Mediante la participación de algunas proteínas del citosol (factores de iniciación) y la hidrólisis de trifosfato de guanosa (GTP), se realiza un apareo entre el tRNA del aminoácido iniciador y el triplete del nucleótido (codón) ubicado en la estructura del mRNA; dicho triplete señala el inicio del polipéptido (etapa 2).

La tercera etapa, conocida como *prolongación*, consiste en la unión covalente y sucesiva de restos aminoácido, mismos que son transportados al ribosoma y colocados por sus tRNAs respectivos, por medio del apareo de éstos con codones específicos en el mRNA. Todo lo anterior, amén del desplazamiento del ribosoma a lo largo del mRNA, se apoya en la participación de varios factores de elongación además del requerimiento insoslayable de energía, la cual es obtenida a partir de la hidrólisis de 2 moléculas de GTP por cada residuo añadido al polipéptido. Cabe

mencionar que durante esta etapa se unen varias ribosomas a un mismo mRNA y al complejo resultante se le conoce como polisoma.

Existe un codón de terminación que es la señal en el mRNA para dar fin al polipéptido, al tiempo que ciertas proteínas denominadas como factores de liberación, liberan (valga la tautología), al mRNA del ribosoma (etapa 4).

Finalmente, en la etapa 5, el polipéptido experimenta un plegamiento que le permite adoptar una conformación tridimensional al mismo tiempo que adquiere su estructura funcional. Antes o después del evento apenas descrito, el polipéptido puede sufrir una o varias modificaciones, como eliminación del aminoácido iniciador, introducción de grupos fosfato, metilo, etc. (Lenhinger, 1993), denominadas *modificaciones postraduccionales*.

Para llevar a cabo el proceso de traducción del mRNA, los organismos eucariotes requieren un proceso de maduración del transcrito primario que no ocurre en procariotes. Este proceso sucede en el núcleo y el mRNA es posteriormente transportado al citoplasma en asociación con ciertas proteínas formando *complejos ribonucleoproteicos*. Ya en el citoplasma los mRNAs se unen al complejo ribosoma-tRNA-aminoácido formando monosomas, disomas cuando son dos los ribosomas con sus respectivos tRNAs y aminoácidos unidos a un mismo mRNA, trisomas cuando son tres, y polisomas cuando hablamos, por ejemplo de 5 ó 6 ribosomas en adelante. En estas condiciones el mRNA se transfiere de los complejos ribonucleoproteicos a los polisomas en un proceso que se llama *movilización*. Es decir, se trata de una transición desde una forma en que el mRNA está almacenado, hasta una en la que es partícipe activo del proceso traduccional. Como se mencionó antes, el proceso transcripcional, que es el proceso que provee del mRNA necesario para la síntesis de proteínas, difiere en organismos procariotes en el sentido de que mientras que en estos últimos organismos al mismo tiempo en que se está sintetizando mRNA, éste es también traducido. Se trata de dos eventos que ocurren

al mismo tiempo y en el mismo espacio. Por el contrario, en eucariotes, luego que tiene lugar la transcripción, el mRNA se ve sujeto a una serie de *modificaciones postranscripcionales*, para adquirir su estructura funcional, amén de ser transportado desde el núcleo hasta el citosol, que es el lugar en donde se lleva a cabo su traducción.

Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que las proteínas unidas a los mRNAs pudieran tener funciones como las de preservar la integridad y conformación del mRNA, protegerlo contra la acción de nucleasas, también la aparente participación en la regulación traduccional de los mismos, así como el probable papel de factores de iniciación y elongación (Larson and Sells, 1987).

El objetivo del presente trabajo de investigación es saber si la movilización traduccional de los mensajes almacenados se ve afectada durante la germinación, en semillas que han sido estresadas durante su almacenamiento, mediante temperatura y humedad excesivas.

Se ha encontrado que el mRNA que codifica para una glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP), constituyente de la pared celular de maíz, se acumula en tejidos donde hay división celular intensa (Ruiz-Avila *et al.* 1991), así como en tejidos de embriones que han sufrido algún tipo de estrés, *v. gr.* desecación, altas temperaturas, etc. (Ludevid *et al.*, 1990). También se han hallado diferentes patrones de expresión entre los mRNAs y las proteínas para las cuales codifican, dependiendo del tipo de tejido de que se trate así como de el grado de maduración de éste.

Por tanto, para satisfacer el objetivo planteado, se propone obtener embriones de maíz estresados y trabajar simultáneamente con un control (embriones no estresados), y una vez que se cuente con este material biológico, aplicar las técnicas adecuadas (gradientes de densidad de sacarosa, extracción de RNA total, análisis de Northern blot, autoradiografía, etc.), para contestar a la interrogante formulada. Para

este propósito se empleará una sonda homóloga de maíz y se analizará el impacto del estrés en la movilización del mensaje antes citado durante la germinación.

## 1.0 ANTECEDENTES

### 1.1-Estructura de la semilla de maíz.

Las semillas de este cereal constan de tres estructuras básicas, a saber, el embrión que se origina de la fusión de los núcleos de ambos gametos sexuales, la testa, la cual proviene de la planta madre, y finalmente el endospermo, que también, como en el caso de el embrión, se forma a partir de la fusión nuclear de los gametos femenino y masculino (figura 1.1).

Las tres estructuras anteriormente mencionadas cumplen funciones perfectamente identificadas. Por ejemplo, la testa, también llamada pericarpio, es una estructura que sirve de protección contra el ataque de organismos patógenos, el cual bien podría crear un efecto retardador en el desarrollo de la semilla durante la germinación, al ser consumidos los materiales de reserva que ésta posee, por organismos patógenos.

El endospermo es la principal fuente de reserva energética con la que cuenta la semilla, y se compone principalmente de almidón (90%), y minoritariamente de proteínas (7%), además de una pequeña cantidad de aceites, minerales y otros componentes. Lógicamente, la función principal de esta estructura es la de suministrar nutrientes a la planta mientras ésta no posea raíces que estén bien afianzadas, y sus hojas no elaboren carbohidratos en cantidades tales que le permitan satisfacer los requerimientos asociados a su crecimiento.

La tercera estructura, el embrión, está constituida por el eje embrionario y por el escutelo.

El eje embrionario a su vez está constituido por el hipocotilo, la radícula y la plúmula o epicotilo y éstos son los tejidos que propiamente van a dar origen a la nueva planta. El escutelo contiene un alto porcentaje de aceite (35-40%) y sustancias activas, todas ellas importantes en etapas tempranas de la germinación, y

constituye un órgano intermediario, productor de hormonas que conecta al endospermo con el eje embrionario (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989).

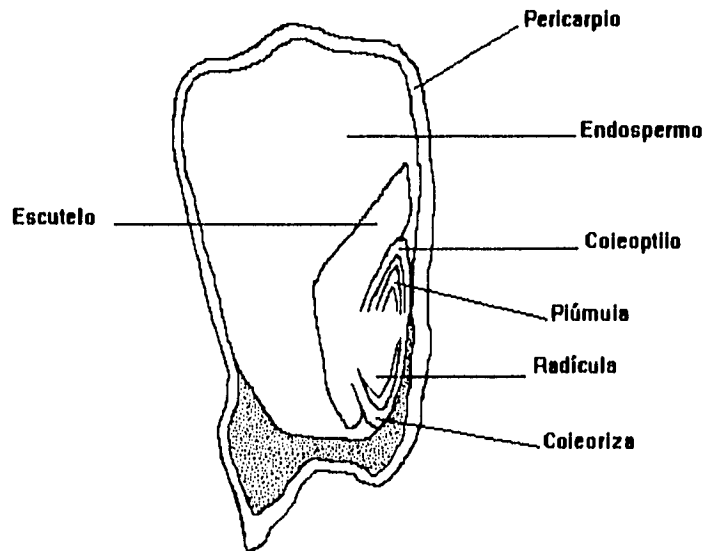


Figura 1.1.-Representación esquemática de una semilla de maíz (*Zea mays* L.).

### 1.2-El proceso de la germinación.

La germinación es un evento que implica la participación de un conjunto de actividades concertadas las cuales propician que la semilla pase de un estado inactivo o de vida latente, con un contenido bajo de agua, a uno en el cual la semilla tiene incrementadas de manera espectacular sus actividades metabólicas para que inicie la formación de una plántula a partir del embrión.

Es difícil acordar en qué momento la germinación termina (Lang, 1965); sin embargo, se ha dado en definir al final de la misma en el momento en que la radícula perfora la cubierta que protege a la semilla, no obstante, se sabe que este suceso es en realidad una consecuencia del crecimiento.

Desde luego que la germinación no ocurre *per se* sino que está sujeta a la ocurrencia insoslayable de cierto tipo de condiciones ambientales como son: la humedad, la temperatura y la composición del suelo y, en algunos casos, la luz. Todos estos requerimientos varían según el tipo de semilla y se encuentran determinados tanto por las condiciones prevalecientes en torno a la formación de la semilla como por factores hereditarios (Kozlowski, 1972).

### **1.3-Bases bioquímicas de la germinación y del deterioro de semillas. Repercusión en el vigor.**

Pese a que el proceso de maduración de una semilla llega a un estado en que ésta posee sólo un 10% de su contenido de humedad respecto al momento previo al inicio de su maduración, todas las células tanto del embrión como de la aleurona permanecen perfectamente funcionales, aunque quiescentes, si es que no se les ha inferido algún daño mayor. El único requerimiento para poder reanudar la actividad de síntesis y empezar el crecimiento del embrión así como su desarrollo, es la presencia de agua. La germinación se pone en marcha cuando la semilla es embebida en agua, y finaliza con la elongación del eje embrionario, usualmente llamado *radícula*. El proceso de la germinación incluye la participación de numerosos eventos, tales como la hidratación de proteínas, cambios estructurales a nivel subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular, ninguno de los cuales es por sí solo, clave o vital para la germinación, pero sus efectos combinados convierten a un embrión que posee un metabolismo apenas detectable, a uno en que la presencia de un metabolismo muy vigoroso promueve la formación y desarrollo de una nueva planta (Bewley, 1986).

De particular importancia, para los acontecimientos apenas descritos, es la síntesis de proteínas. Eventos como la elongación y diferenciación celular, como ya se mencionó, son muy importantes durante la germinación. Por supuesto que estos procesos requieren del aporte de proteínas. Es de gran relevancia la síntesis



diferencial de ciertos grupos de proteínas, condicionada por los diversos estadios por los que pasa la semilla durante la germinación (Datta, 1983).

En embriones de trigo se ha observado que el proceso traduccional se realiza básicamente de la forma en que se explicó ya en la introducción, esto es, la iniciación que comienza con la unión de la subunidad ribosomal pequeña (40S), y el complejo metionil-tRNA, al sitio de iniciación en el mRNA (esto en cuanto los embriones entran en contacto con el agua, por que en estado seco, o quiescente, la actividad de la maquinaria traduccional se halla en un estado muy reducido). La síntesis de proteínas en embriones de Phaseolus benalus, Phaseolus vulgaris y embriones de centeno, arroz y trigo empieza entre los 30 y 40 minutos después de la imbibición, etapa en la que se ha detectado la formación de polisomas acompañada de una disminución de los ribosomas libres. En estado seco, como en el caso del maíz, trigo y otros cereales, no se encuentran polisomas en la semilla, sólo ribosomas libres (Kozlowski, 1972).

Las fracciones citoplásmica o post-ribosomal obtenidas a partir de semillas secas de cacahuate y trigo pueden efectuar síntesis de proteínas *in vitro* al añadir ribosomas, mRNA y ATP/GTP. Esto significa que los componentes del citoplasma requeridos para la síntesis de proteínas están en la semilla seca en cantidades tales que permiten que la misma al ser embebida, pueda reanudar la traducción (Bewley, 1986).

Con la idea de dilucidar si la síntesis de proteínas en general ocurre antes que la síntesis de RNA, sobre todo de mRNA, diversos investigadores han elaborado estrategias para responder a esta interrogante. Así, se ha obtenido una fracción celular a partir de embriones secos de trigo. Esta fracción tiene la propiedad de estimular la síntesis de proteínas y además posee características de mRNA. Se ha dado en llamar a esta fracción, *fracción mensajera*, y se ha encontrado también que durante los primeros minutos de imbibición hay un aumento en su actividad, misma

que disminuye rápidamente, de tal suerte que en embriones con 3 horas de imbibición, la actividad de la fracción mensajera está completamente ausente. Además, conforme la actividad de esta fracción decrece, la población de polisomas aumenta. Esto indica que el mRNA está presente en la semilla seca, probablemente asociado a proteínas (Larson and Sells, 1987), y que al entrar la semilla en contacto con el agua, rápidamente el mRNA se asocia a los ribosomas formando el complejo polisomal, y es debido a esto que se observan los decrementos en la actividad de la fracción mensajera (Bewley, 1978; Bray and Dasgupta, 1976; Chen, 1968; Dommes and Van de Walle, 1983; Osborne, 1983).

En otros experimentos, pese a haberse inhibido el proceso transcripcional en un 95% con inhibidores químicos ( $\alpha$ -amanitina) durante los primeros minutos de la germinación en embriones de maíz, se ha observado la formación de polisomas, lo cual pone de manifiesto que la síntesis *de novo* de mRNA no es esencial para reiniciar la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación y que ésta básicamente es soportada por la utilización de mRNAs almacenados (Beltrán *et al.*, 1995).

Las semillas por si mismas son muy resistentes a condiciones ambientales extremas, y es debido a ello que pueden mantener su capacidad de germinar (viabilidad) durante largos períodos. Por supuesto que el período durante el cual pueden las semillas conservar su viabilidad es sumamente variable y depende de las condiciones que le rodean así como del tipo de ésta. Se tiene el conocimiento de que la viabilidad de una semilla se mantiene o se conserva más o menos constante, en aquellos casos en los que se reducen de manera significativa las actividades metabólicas de la misma; sin embargo, aún bajo almacenamientos con semejantes características, la viabilidad y el vigor decrecen. El vigor de una semilla se puede definir como la condición en que se encuentra la semilla en el máximo de sus capacidades potenciales para germinar satisfactoriamente en un rango amplio de

que disminuye rápidamente, de tal suerte que en embriones con 3 horas de imbibición, la actividad de la fracción mensajera está completamente ausente. Además, conforme la actividad de esta fracción decrece, la población de polisomas aumenta. Esto indica que el mRNA está presente en la semilla seca, probablemente asociado a proteínas (Larson and Sells, 1987), y que al entrar la semilla en contacto con el agua, rápidamente el mRNA se asocia a los ribosomas formando el complejo polisomal, y es debido a esto que se observan los decrementos en la actividad de la fracción mensajera (Bewley, 1978; Bray and Dasgupta, 1976; Chen, 1968; Dommes and Van de Walle; 1983; Osborne, 1983).

En otros experimentos, pese a haberse inhibido el proceso transcripcional en un 95% con inhibidores químicos ( $\alpha$ -amanitina) durante los primeros minutos de la germinación en embriones de maíz, se ha observado la formación de polisomas, lo cual pone de manifiesto que la síntesis *de novo* de mRNA no es esencial para reiniciar la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación y que ésta básicamente es soportada por la utilización de mRNAs almacenados (Beltrán *et al.*, 1995).

Las semillas por si mismas son muy resistentes a condiciones ambientales extremas, y es debido a ello que pueden mantener su capacidad de germinar (viabilidad) durante largos períodos. Por supuesto que el periodo durante el cual pueden las semillas conservar su viabilidad es sumamente variable y depende de las condiciones que le rodean así como del tipo de ésta. Se tiene el conocimiento de que la viabilidad de una semilla se mantiene o se conserva más o menos constante, en aquellos casos en los que se reducen de manera significativa las actividades metabólicas de la misma; sin embargo, aún bajo almacenamientos con semejantes características, la viabilidad y el vigor decrecen. El vigor de una semilla se puede definir como la condición en que se encuentra la semilla en el máximo de sus capacidades potenciales para germinar satisfactoriamente en un rango amplio de

condiciones ambientales, utilizando sus reservas alimenticias adecuadamente para formar una plántula que crezca normalmente (Kozlowski, 1972).

Lotes de semillas con idénticos porcentajes de germinación pueden variar en su capacidad para producir grano, y tal situación puede estar relacionada con variaciones en el vigor entre estas semillas, lo cual significa que la determinación de la capacidad germinativa podría resultar no del todo suficiente como herramienta de conocimiento sobre el desarrollo fisiológico posterior de la semilla (Stormonth, 1978).

Las diferencias en el vigor de las semillas tienden a ser minimizadas por los métodos convencionales para determinar grados de germinación, ya que éstos están diseñados de tal forma que reúnen condiciones de crecimiento y desarrollo óptimos, y son estos factores los que tienden a atenuar las diferencias en el vigor. Sin embargo, en lugares en que las condiciones ambientales están muy lejos de ser ideales, y que, por el contrario, son en ocasiones muy adversas para la germinación de las semillas y el crecimiento óptimo de plantas (temperatura, humedad, composición del suelo, etc.), existe un efecto negativo en la fisiología de la semilla que en muchos casos la conduce a fenecer o a crecer débil y lentamente (y esto por supuesto, estaría hablando de índices de vigor diferentes en las semillas).

Actualmente se sabe que el vigor no es una simple característica de la semilla, sino que, por el contrario, su complejidad llega a tal grado que viene a ser el resultado de la expresión conjunta de todas las actividades bioquímicas y fisiológicas involucradas en la germinación, misma que a su vez está en función de el rigor o la bondad de las condiciones de su entorno y también, claro está, de la genética de la semilla (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989).

Algunos ejemplos de alteraciones bioquímicas asociadas con mermas en viabilidad y vigor, han sido descubiertos en la mitocondria. En embriones viables, la actividad e integridad de la mitocondria se incrementa conforme transcurre el tiempo, luego

de que éstas son embebidas en agua. La producción de ATP junto con el consumo de oxígeno son dos eventos que se hacen más eficientes. En embriones de centeno y arroz no viables, la mitocondria tiene un aspecto hinchado y sus membranas internas se aprecian deformadas. Mientras que en embriones viables la estructura mitocondrial se organiza más conforme avanza la germinación, en embriones no viables estos organelos tienden a perder organización llegando eventualmente a su lisis (Bewley, 1986).

Embriones de centeno (de semillas largamente almacenadas), que no presentan germinación, también poseen actividades respiratorias bajas. En ciertas especies, parece haber una correlación entre un detrimento en el intercambio de gases y una actividad reducida de enzimas de la respiración. Por ejemplo, en granos no viables de arroz, los niveles de la enzima citocromo oxidasa, succínico, glutámico, málico, y alcohol deshidrogenasas, catalasa y peroxidasa, son más bajos que en granos de arroz viables. El contenido de ATP en semillas no viables es considerablemente menor al de semillas viables y, presumiblemente, es insuficiente para poder proveer a los procesos metabólicos esenciales para la germinación, (Bewley and Black, 1986).

Existen diversas formas bajo las cuales se manifiesta la pérdida de viabilidad en las semillas. Así por ejemplo, porcentajes bajos de viabilidad en semillas, se encuentran correlacionados con fallas en el acoplamiento respiratorio, disminución en la actividad de algunas enzimas tales como las deshidrogenasas (Lakon, 1949) y las transferasas dependientes de GTP (Roberts and Osborne, 1973; Dell'Aquila *et al.*, 1976; Bray and Chow, 1976a), desensamblaje de ribosomas (Bray and Chow, 1976b; Roberts *et al.*, 1973) y pérdida de RNA poli A<sup>+</sup>. También el detrimento en la viabilidad se ve correlacionado con el proceso de la transcripción, ya que por un lado, la síntesis de todas las clases de RNA se ve deteriorada y por el otro, la maduración de precursores de rRNA se demora. Esto se ha reportado para los casos

de cebada (Van Onckelen *et al.* 1974), centeno (Sen and Osborne, 1977), ejes embrionarios de chícharo (Bray and Dasgupta, 1976).

La pérdida de viabilidad se halla también asociada a un descenso drástico en la actividad de síntesis de proteínas, que puede atribuirse a la degradación de mRNA y reducción de la actividad del factor de elongación EF-1 (eukaryotic elongation factor 1) (Peumans and Carlier, 1981).

#### **1.4-Alteraciones en el DNA asociadas con detrimentos en la viabilidad de semillas.**

Las aberraciones cromosómicas, las cuales consisten en modificaciones en el número y disposición de los lugares de los genes, así como en las alteraciones moleculares de los mismos, son dos tipos de eventos que ocurren o están asociados con el envejecimiento de una semilla y son por lo general, cambios que no son reparados posteriormente (Muro, 1986).

Los daños en el DNA pueden ser de dos tipos, bien sea que sucedan en la integridad del mismo o aquellas que son de naturaleza química, sobre las bases que lo componen.

Si bien las aberraciones químicas implican siempre daños en el DNA, lo cierto es que no todos estos daños implican necesariamente algún tipo de aberración cromosómica. Existen evidencias que demuestran que los daños en el material genético ocurren y aumentan durante el almacenamiento y en términos generales se pueden agrupar de la siguiente forma:

- 1)- Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas sobre todo en las primeras mitosis de los meristemos de raíces de semillas A1\* durante la germinación.
- 2)- Determinación de la frecuencia de absorción de polen producida por plantas A1.
- 3)- Determinación de las variaciones fenotípicas en plantas A2 y A3 (Muro, 1986).

\*A1= semillas sometidas a envejecimiento, A2 y A3 son generaciones dos y tres de semillas derivadas de la generación 1 (A1).

De Vries (1901) fue el primero en señalar que los cambios en el material genético estaban correlacionados con porcentajes bajos de germinación, así como a una proporción elevada de plantas morfológicamente anormales obtenidas a partir de semillas de *Ocrot hera lamarekiana* que habían sido almacenadas durante largo tiempo (esto es, semillas de baja viabilidad).

Así mismo, Navashin (1933) encontró aberraciones cromosómicas frecuentes en raíces de plantas provenientes de semillas almacenadas durante un tiempo extenso. Resultados similares han sido publicados por diversos autores (Nichols, 1941; Sax and Sax, 1964).

Muchas investigaciones, llevadas a cabo con chícharo, haba y cebada, aplicando varias combinaciones de temperatura y humedad en el almacenamiento, produjeron diferentes intensidades en cuanto a pérdida de viabilidad, mismas que se veían acompañadas de daños en los cromosomas durante las primeras divisiones de los meristemas de raíces.

Datos experimentales de Villiers (1972) revelaron que embriones de semillas de maíz almacenadas por períodos prolongados germinaron luego de un cierto tiempo y demostraron con ello que embriones con estructuras macromoleculares dañadas podrían recuperar sus funciones metabólicas, pasadas las primeras horas de la germinación.

Osborne y colaboradores (1980; 1981) encontraron que los niveles de RNA, DNA y proteínas de embriones de centeno permanecían constantes durante su almacenamiento, lo cual no significaba necesariamente que la integridad de estas macromoléculas se mantuviese igualmente constante durante el mismo período de estudio, ya que, aun cuando se observó que la cantidad de DNA era la misma,

estimada tanto por métodos de extracción, como por determinación del contenido de éste en núcleos teñidos por la técnica de Feulgen en preparaciones fijas, la baja recuperación de DNA de alto peso molecular usando la técnica de Marmur (1961) indicaba que la ruptura de las moléculas de DNA a fragmentos de bajo peso molecular ocurría sin pérdida total de DNA. Dicha pérdida de la integridad del DNA se piensa que es debida a la acción lenta pero progresiva de endodesoxirribonucleasas, que pudieran estar localizadas en el núcleo.

Tratando de explicar el hecho de que embriones de semillas de trigo de baja viabilidad germinen luego de un cierto tiempo, Mory y colaboradores (1972), propusieron la existencia de una fase larga de activación de procesos bioquímicos asociados a la síntesis de DNA antes de la primera división celular. Estos procesos incluyen la eliminación de inhibidores, síntesis y/o activación de enzimas involucradas directamente con la reparación de DNA y la disponibilidad de un molde activo.

Datos de nuestro y otros laboratorios, concuerdan con estos resultados, ya que se demostró que en ejes embrionarios de maíz, la primera división celular ocurre hasta las 20-24 horas de germinación (Baiza *et. al.*, 1989), y previamente, durante las primeras horas de germinación, se observa síntesis de DNA, primero de tipo reparativo (Vázquez-Ramos *et.al.*, 1988) y posteriormente (aproximadamente a las 16 horas de germinación), de tipo replicativo (Baiza *et.al.*, 1989).

#### **1.5-Alteraciones en la maquinaria traduccional.**

Como se mencionó anteriormente, detrimentos en la viabilidad y vigor en las semillas son en general una consecuencia debida a almacenajes inadecuados (temperaturas y humedades excesivas), y/o almacenamiento prolongado (Dell Aquila, 1987).

Sánchez de Jiménez y colaboradores (1992), analizaron cambios en la síntesis de proteínas durante la germinación de ejes embrionarios provenientes de semillas de



maíz de tres variedades distintas, que habían sido almacenadas durante un período de trece años y encontraron que tanto los índices de germinación, como los porcentajes de la misma, eran bastante menores respecto de los de semillas no almacenadas. Además de lo antes mencionado, los autores realizaron análisis de síntesis de proteínas *in vivo*, para lo cual midieron la cantidad de metionina-<sup>35</sup>S incorporada a proteínas en ejes embrionicos expuestos durante una hora a un pulso de metionina-<sup>35</sup>S, y los resultados de este experimento mostraron una menor incorporación del radioisótopo en los embriones de semillas almacenadas comparadas con las semillas no almacenadas.

Posterior análisis electroforético y de fluorografía de las proteínas radiactivas obtenidas en el experimento apenas descrito, mostraron diferencias cualitativas importantes, ya que varias de las proteínas sintetizadas en ejes de semillas no almacenadas no fueron observadas en ejes de semillas almacenadas. Otras proteínas detectadas en las autorradiografías de ejes no almacenados estuvieron también presentes en las de ejes almacenados, lo cual significa que la ausencia de las manchas de actividad sobre las autorradiografías no había sido debida a una baja resolución de la técnica empleada.

También la incorporación de prolina-<sup>14</sup>C en proteínas citoplásmicas y de pared celular fue medida previa exposición de los ejes de maíz a este precursor radiactivo durante un lapso de seis horas. Aquí, al igual que en el caso de la incorporación de metionina, los ejes de semillas no almacenadas exhibieron mayor incorporación del precursor que los ejes de semillas almacenadas. Las proteínas del experimento anterior fueron hidrolizadas, y los aminoácidos resultantes fueron separados por cromatografía bidimensional en capa fina y los aminoácidos marcados radiactivamente fueron revelados por autorradiografía. Para las proteínas de pared celular se detectaron proteínas conteniendo prolina-<sup>14</sup>C e hidroxiprolina-<sup>14</sup>C mientras que las proteínas citoplásmicas sólo presentaron prolina-<sup>14</sup>C. En ejes

embrionarios de semillas almacenadas sólo fue detectada de manera tenue la presencia de hidroxiprolina sobre la autorradiografía correspondiente, lo cual sugería una disminución en la actividad de la enzima prolinahidroxilasa responsable de este tipo de transformación química (Cooper and Varner, 1983).

A consideración de los autores (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1992), los resultados obtenidos sobre los cambios en la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro* e *in vivo*, en embriones de semillas almacenadas y no almacenadas, parecen sugerir un daño en el proceso de la transcripción o bien un daño en la integridad de los mRNAs almacenados causado por largos años de almacenamiento, aunque todo parece indicar que más bien se trata de la segunda hipótesis dado que la presencia de mRNAs de proteína de pared celular ricas en prolina ha sido recientemente demostrada por medio de técnicas de inmunofluorescencia, en ejes de semillas de maíz seco largamente almacenado (Estanyol *et al.*, 1992).

Otros autores (Helm and Abernethy, 1990), han encontrado daños en la síntesis de grupos específicos de proteínas causados por almacenamientos inadecuados de semillas, lo cual ocurre en etapas tempranas de la germinación. Los resultados respecto a la síntesis diferencial de proteínas en función del tiempo de germinación presentados por estos investigadores indican que proteínas de pared celular (ricas en prolina e hidroxiprolina), están entre las primeras proteínas que son sintetizadas después de la germinación de la semilla. Un almacenamiento durante un tiempo extenso podría alterar este evento mediante el daño en los procesos transcripcional y/o traduccional de los correspondientes mRNAs, y por detrimento en el proceso de la hidroxilación de la prolina para la maduración de las proteínas de pared celular.

Roberts y colaboradores (1973), y Bray y Chow (1976a), han demostrado que la pérdida de la viabilidad se ve acompañada de la degradación de RNA ribosomal (rRNA), en semillas secas de centeno. Broklehurts y Fraser (1980), extrajeron RNA total de semillas de zanahorias de 2 lotes de viabilidad alta, la diferencia entre

ambos era que un lote era de semillas maduras y el otro lo era de inmaduras. Por electroforesis en geles con formamida (esto es, geles desnaturizantes), lograron separar las diferentes especies moleculares (representadas por "picos" de absorbancia de diferentes intensidades), contenidas en el RNA total. Sus resultados mostraron que hubo mayor degradación de los rRNAs 25S y 18S en semillas germinadas (embebidas durante 12 días), que en semillas secas, ya se tratase de que éstas fuesen maduras o inmaduras, lo cual sugiere que si el rRNA de la semilla seca fuese dañado durante la maduración de ésta, o más probablemente, durante su almacenamiento (tiempo excedido, temperaturas y/o humedades altas), el rRNA sería todavía más degradado durante el momento en que la semilla estuviese germinando.

Dos aparentes causas de la disminución de la integridad del rRNA parecen radicar, por un lado, en una actividad incrementada de la enzima ribonucleasa, esto a juzgar por los tamaños de los productos de degradación que fueron consistentes en sus pesos moleculares, situación que podría indicar la existencia de ciertas regiones de acción enzimática sobre la estructura del rRNA. Por otra parte, esta disminución en la integridad del rRNA bien podría estar correlacionado con lesiones en la estructura del DNA (Chea and Osborne, 1978).

Así como se ha observado en lotes de semillas viejas que su velocidad de germinación disminuye antes de cualquier pérdida de viabilidad (Delouche and Baskin, 1973), estos resultados indican que una reducción en la integridad del rRNA ocurre antes de que decline la germinación de las semillas. El conocimiento de que una pérdida de la integridad del rRNA precede a decrementos en la actividad del ribosoma durante la síntesis de proteínas (Bray and Chow, 1976b), también sugiere que la reducción de la integridad del rRNA puede ser iniciada tempranamente en eventos de envejecimiento.

## 2.0 MATERIALES Y METODOS

Los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo con dos lotes distintos de maíz (Zea mays L.), variedad Chalqueño, uno de los cuales tenía ya un tiempo prolongado de almacenamiento, y que fue considerado como deteriorado luego de ser expuesto a una temperatura de 40°C y humedad de saturación durante 16 horas, empleando para ello una estufa de vacío y recipientes con agua para simular las condiciones existentes en lugares de almacenaje de grano de ciertas regiones del país (zonas tropicales y subtropicales).

El otro lote utilizado fue uno de cosecha más reciente que el anterior, y por ende, en mejores condiciones fisiológicas que el anterior. Este lote se tomó como control para ser comparado con el de maíz deteriorado y tuvo un almacenamiento a temperatura y humedad ambientales.

### 2.1-Curvas de germinación.

Para determinar si el deterioro provocado *ex profeso* tenía algún impacto observable en la germinación de las semillas se hicieron curvas de germinación de los dos lotes, deteriorado y control, poniendo sobre algodón mojado 100 semillas, en cada caso, y contando el número de semillas germinadas hora tras hora, pasadas 18 horas después del momento en que éstas fueron embebidas en agua.

## 2.2-Preparación de material biológico.

Para hacer los experimentos que implicaron manipulaciones a nivel molecular, como alteración de RNA total, se emplearon ejes embrionarios de los dos lotes de maíz, los cuales se sometieron a las condiciones mostradas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Condiciones de germinación de semillas control (normal) y deteriorada.

Embriones de semilla:	Tiempo de germinación(h):	$\alpha$ -amanitina:
Deteriorada	6	(-)
Deteriorada	24	(+)
Deteriorada	24	(-)
Control	6	(-)
Control	24	(+)
Control	24	(-)

La germinación de los ejes se hizo en medio Murashige Skoog (Murashige and Skoog, 1962) libre de hormonas, a 37°C, en oscuridad y durante los tiempos que se aprecian en la tabla anterior. Para los casos en que la germinación se hizo en presencia de  $\alpha$ -amanitina, se adicionó una solución de ésta, de concentración= 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en una razón de 300  $\mu\text{l}$  de solución por cada 200 mg de embriones, antes de iniciar el proceso de germinación. Este tratamiento duró una hora, se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente.

Una vez tratados los embriones, fueron lavados y almacenados a -70°C para su uso posterior.

### 2.3-Preparación de polisomas.

Para el aislamiento de los polisomas se pesó 1 g de tejido (embriones), y se molió en presencia de N<sub>2</sub> líquido en un mortero estéril previamente enfriado, al polvo obtenido se le añadió buffer de extracción ( 0.2 M de Tris-Cl pH 9, 0.2 M de KCl, 35 mM de MgCl<sub>2</sub> , 25 mM de Acido Etilen Glicol-bis (β-amino etil éter) H, N, N', N',- Tetra acético (EGTA), 0.2 M de Sacarosa libre de RNAsas, 2% de Polioxietilen, 10 Tridecil Eter (PTE), 0.5 mg/ml de Heparina en una razón de 1:3 de tejido por volumen de Buffer de extracción (Klein et. al., 1988).

El homogenado obtenido se pasó a través de una columna de pelo de ángel estéril contenida en una jeringa, igualmente estéril, y el filtrado se colectó en tubos Eppendorf que fueron incubados durante 15 minutos a 4°C y luego se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 minutos.

Se tomaron alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes y se depositaron sobre gradientes de sacarosa de 15-55 % (p/v\*), \*v se refiere al volumen de buffer para gradientes utilizado (40 mM de Tris-Cl pH 9, 20 mM de KCl y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>).

Los gradientes se ultracentrifugaron a 37,000 rpm por 5.0 horas en un rotor Beckman SW 40 a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL-90 (Beckman Instruments).

#### **2.4-Análisis de distribución de polisomas sobre gradientes de densidad de sacarosa.**

Después de ser centrifugados los gradientes junto con las muestras, fueron analizados haciéndolos pasar a través de una lámpara de luz ultravioleta con monitoreo continuo de la absorción a una longitud de onda de 260 nm al mismo tiempo en que eran fraccionados en alícuotas de 0.5 ml. Tanto para la formación como para la remoción de los gradientes se empleó una bomba peristáltica (Auto Densi Flow IIC HBI). La lámpara o detector de UV utilizado fue un LKB Bromma 2138.

Con el objeto de obtener una mayor resolución de los perfiles, las diferentes fracciones de los gradientes se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) de mayor sensibilidad y se agruparon en tres zonas: zona (1) partículas ribonucleoproteicas, zona (2) monosomas y subunidades ribosomales y zona (3) polisomas.

## 2.5-Aislamiento de RNA total y análisis de Northern blot.

Mediante el método de extracción fenólica se llevó a cabo la extracción del RNA total de las fracciones de los gradientes de sacarosa (Farrell, 1993). Las muestras de RNA resultantes de la extracción se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser usadas después.

Se hicieron análisis de Northern blot (Farrel, 1993), con las muestras de RNA. Primero, se separaron electroforéticamente a través de geles desnaturalizantes (1.9 % de agarosa, 2.2 % de formaldehído) en una cámara para electroforesis. A continuación se transfirieron las muestras del gel a una membrana de Nylon por capilaridad empleando buffer 10 X, a lo largo de 15 horas a temperatura ambiente. Terminada la transferencia, el RNA contenido en la membrana se fijó covalentemente por exposición a luz ultravioleta durante 2 minutos, a una energía de  $120\text{ mJoules/cm}^2$  en un aparato Cross-linker(UV Crosslinker Hoefer UVC 500).

Las membranas fueron prehibridadas a una temperatura de  $58^{\circ}\text{C}$  por 2 horas con buffer de hibridación (amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.2, Suero de Albúmina Bovina (BSA) al 1 % p/v, y Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 7 % p/v).

La hibridación también se hizo a  $58^{\circ}\text{C}$  con adición de la sonda radiactiva, y fue por 16 horas.

La sonda fue marcada con  $^{32}\text{P}$  por la técnica de Random Primer (Thomas, 1980).

Finalizada la hibridación, se lavaron las membranas con el fin de remover toda la hibridación inespecífica, primero 2 veces con una solución de lavado (SSC 2X, SDS 0.1 %) durante 15 minutos (lavado de baja astringencia), y luego, una vez aumentando la astringencia de la solución de lavado (SSC 0.1X, SDS 0.1 %) a temperatura ambiente y también por 15 minutos. Se hizo un lavado adicional (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %) a  $50^{\circ}\text{C}$  , 15 minutos en los casos en que se detectó demasiada inespecificidad.



## 2.5-Aislamiento de RNA total y análisis de Northern blot.

Mediante el método de extracción fenólica se llevó a cabo la extracción del RNA total de las fracciones de los gradientes de sacarosa (Farrell, 1993). Las muestras de RNA resultantes de la extracción se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser usadas después.

Se hicieron análisis de Northern blot (Farrel, 1993), con las muestras de RNA. Primero, se separaron electroforéticamente a través de geles desnaturalizantes (1.9 % de agarosa, 2.2 % de formaldehído) en una cámara para electroforesis. A continuación se transfirieron las muestras del gel a una membrana de Nylon por capilaridad empleando buffer 10 X, a lo largo de 15 horas a temperatura ambiente. Terminada la transferencia, el RNA contenido en la membrana se fijó covalentemente por exposición a luz ultravioleta durante 2 minutos, a una energía de  $120 \text{ mJoules/cm}^2$  en un aparato Cross-linker(UV Crosslinker Hoefer UVC 500).

Las membranas fueron prehibridadas a una temperatura de  $58^{\circ}\text{C}$  por 2 horas con buffer de hibridación (amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.2, Suero de Albúmina Bovina (BSA) al 1 % p/v, y Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 7 % p/v).

La hibridación también se hizo a  $58^{\circ}\text{C}$  con adición de la sonda radiactiva, y fue por 16 horas.

La sonda fue marcada con  $^{32}\text{P}$  por la técnica de Random Primer (Thomas, 1980).

Finalizada la hibridación, se lavaron las membranas con el fin de remover toda la hibridación inespecífica, primero 2 veces con una solución de lavado (SSC 2X, SDS 0.1 %) durante 15 minutos (lavado de baja astringencia), y luego, una vez aumentando la astringencia de la solución de lavado (SSC 0.1X, SDS 0.1 %) a temperatura ambiente y también por 15 minutos. Se hizo un lavado adicional (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %) a  $50^{\circ}\text{C}$  , 15 minutos en los casos en que se detectó demasiada inespecificidad.

Finalmente, se analizaron las membranas por autorradiografía, exponiéndolas sobre una placa virgen de rayos X ( Kodak X-Omat XK1), y revelando, después del tiempo que se consideró prudente, tomando en cuenta la intensidad de la radiactividad de la sonda, con revelador y fijador Kodak GBX (Maniatis, 1990).

### 3.0 RESULTADOS

En la figura (3.1) pueden apreciarse las curvas de germinación de los lotes normal(A) y deteriorado(B) de semillas de maíz. Es evidente que las condiciones de deterioro por estrés afectaron por lo menos a dos aspectos importantes de la germinación, primero, el tiempo o momento en que germinó la mayor parte de la población del lote deteriorado, lo cual ocurrió aproximadamente a las 50 horas transcurridas después del momento en que las semillas fueron embebidas, al menos 12 horas más tarde con respecto al lote control.

El otro aspecto claramente alterado fue el porcentaje de germinación. Las semillas control germinaron hasta en un 88% (de un lote de 100), mientras que las semillas estresadas sólo lo hicieron en un 65-69% (20% menos).

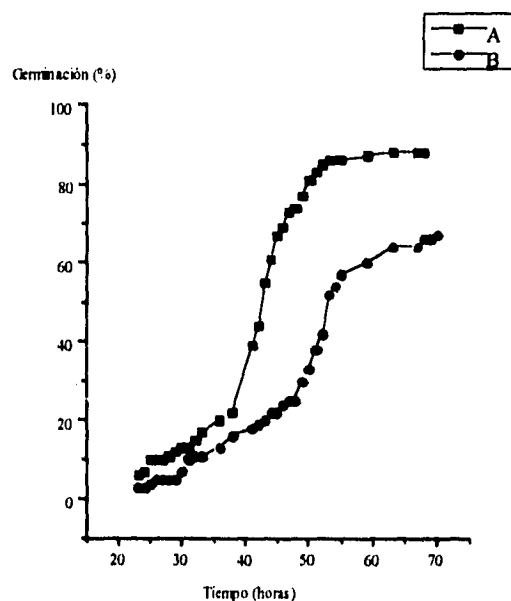


Fig.(3.1). Curvas de germinación de lotes de semilla de maíz.(A) maíz control y (B) maíz deteriorado.

Con la intención de mostrar de otra forma gráfica la repercusión que tuvo el estrés aplicado al lote de semillas deterioradas, se obtuvieron los índices de germinación de los dos lotes de maíz antes mencionados.

En la figura (3.2) se puede observar más claramente que en la propia curva de germinación (fig. 1), que la hora en que ocurre la germinación de la mayor parte de las semillas en uno y otro lote son diferentes, teniendo una clara inclinación hacia la parte derecha del gráfico para el caso del lote deteriorado, lo cual indica que la hora o el momento en que germinó el grueso de la población de este lote se retardó con respecto al control.

El índice de germinación se determinó de la siguiente forma: se contó el número de semillas germinadas a cada intervalo de tiempo y estos valores se graficaron. El número de semillas se graficó en el eje de las ordenadas y los intervalos de tiempo sobre el eje de las abcisas (ver figura 3.2).

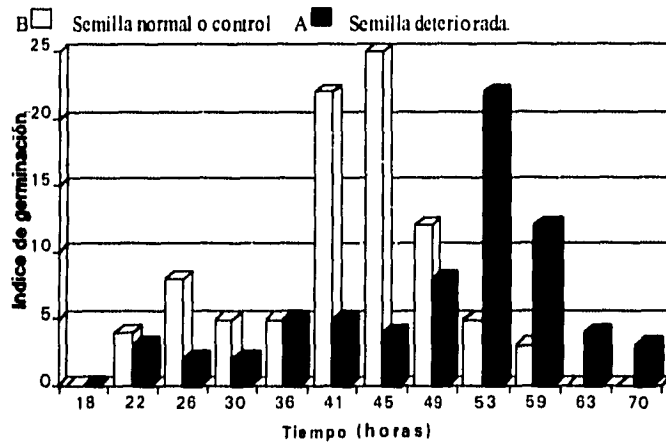


Fig. 3.2- Índice de germinación de lotes de semilla de maíz.  
Semilla deteriorada (A) y semilla control (B).

Posteriormente se procedió a la obtención y análisis de la población de polisomas de ambos lotes de semillas para lo cual se realizaron gradientes de densidad de sacarosa.

Los resultados del análisis de distribución de polisomas (perfiles o gráficas de absorbancia vs número de fracción) hechos en gradientes de densidad de sacarosa (15-55%), con los extractos de ejes embrionarios germinados a diferentes condiciones, son los siguientes:

Seis horas de germinación, para ejes de semillas control y deterioradas (fig. 3.3-A), 24 horas de germinación, con  $\alpha$ -amanitina, para ejes control y deteriorados (fig. 3.3-B) y, 24 horas de germinación, sin  $\alpha$ -amanitina, para ejes control y deteriorados (fig. 3.3-C).

A 6 horas de germinación, los perfiles de gradientes de densidad de sacarosa de las muestras control y deterioradas fueron muy semejantes (fig.3.3-A), no obstante que las fracciones de los gradientes fueron leídas en un espectrofotómetro de mayor sensibilidad que el detector empleado durante el momento justo de la separación de éstos. Sin embargo, en esta misma figura puede apreciarse que en la curva de la semilla normal se ve un "pico" más que en la curva de la semilla deteriorada. Este pico, que aparece a la altura de la fracción número 13, es un artefacto debido a un error técnico al estar fraccionando el gradiente. Pudo haber ocurrido que al momento de fraccionar no se tomase la misma cantidad de alícuota en las fracciones 10 y 11, que son las que anteceden a este pico, de tal suerte que se diluyera la fracción 10 con respecto a la 11 (lo cual haría que bajara la lectura de absorbancia en ese punto). Además, si este pico no fuese un artefacto, claramente se hubiese visto en el perfil original, debido a su tamaño. De igual forma, los resultados de las muestras de los dos lotes, pero ahora con 24 horas de germinación, y en presencia de  $\alpha$ -amanitina exhibieron gráficas sin diferencias muy grandes (figura 3.3-B).

En la figura 3.3-A se observan los señalamientos de las tres zonas de esos gradientes a partir de las cuales se agruparon las diferentes fracciones obtenidas. Así, de la fracción 0 a la 5 se agruparon las fracciones asumiendo que contenían principalmente partículas ribonucleoproteicas, de la fracción 7 a la 10 se agruparon asumiendo que contenían subunidades ribosomales, 40 y 60S, y monosomas, y finalmente, de la fracción 11 a la 19 se agruparon las fracciones que contenían polisomas. Todas estas consideraciones se hicieron en base a resultados obtenidos en otros trabajos realizados en el mismo laboratorio en donde se realizó esta tesis. La manera de agrupar las fracciones de los gradientes de esta figura también se aplicó a los gradientes restantes.

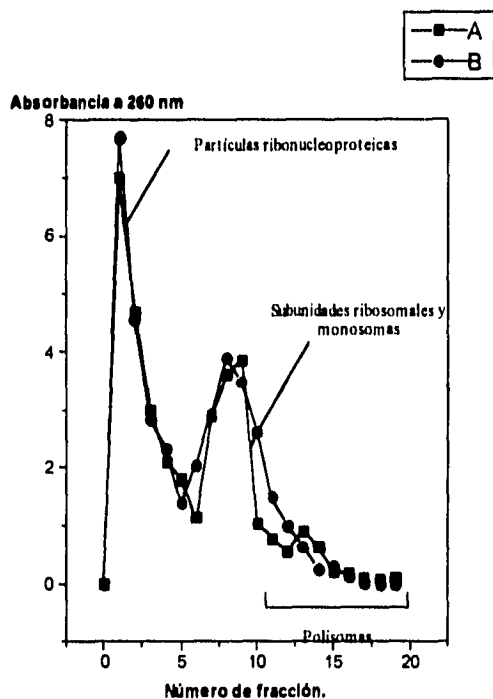


Figura 3.3-A. Perfil de gradiente de densidad de sacarosa. semillas normal y deteriorada con 6 horas de germinación. (A) Semilla normal. (B) Semilla deteriorada.

La figura (3.3-C), en donde pueden observarse los perfiles de las condiciones de 24 horas de germinación sin  $\alpha$ -amanitina para los lotes control y deteriorado, tampoco contiene diferencias significativas, ni en la zona no-polisomal, que va de la fracción 0 a la fracción 10 aproximadamente, ni en la zona polisomal, (fracción 11 a la 20), ésto tanto para la figura 3.3-C como para las dos anteriores, de tal suerte que el deterioro no parecería afectar a este tipo de parámetros. Sin embargo, se determinaron las áreas bajo la curva de las zonas polisomal y no-polisomal, y se obtuvieron las relaciones  $P/N-P$  y  $P/N-P+P$ , donde  $P$ = fracción polisomal,  $N-P$ =



fracción no polisomal y N-P-P= suma de las dos fracciones RNA total (ver tabla 3.1)

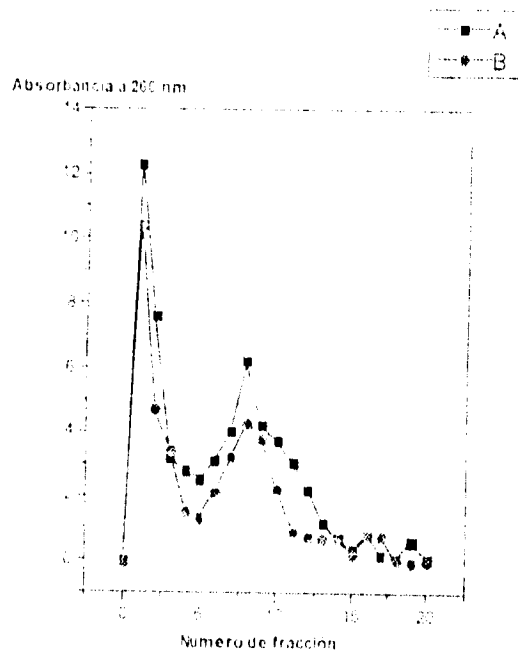


Figura 3-3-B Perfil de gradiente de densidad de sacarosa  
Semillas normal y deteriorada con 24 horas de  
germinación en presencia de  $\alpha$ -amanitina  
(A) Semilla normal (B) Semilla deteriorada.

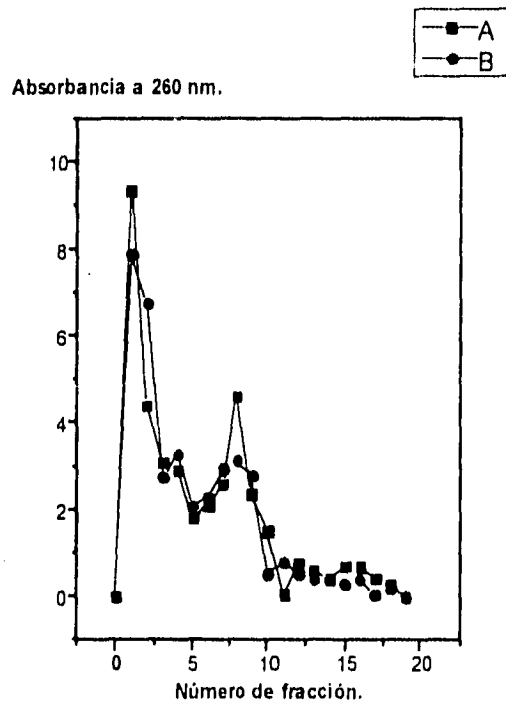


Figura 3.3-C. Perfil de gradiente de densidad de sacarosa.  
 Semillas normal y deteriorada.  
 (A) Semilla normal (B) Semilla deteriorada.

TIEMPO (horas)	CONTROL		DETERIORADA	
	P/NP	P/NP+P	P/NP	P/NP+P
6	0.02	0.019	0.018	0.017
24 (con $\alpha$ -amanitina)	0.13	0.11	0.064	0.050
24	0.17	0.14	0.068	0.060

Tabla 3.1. Relación de las fracciones polisomal/no-polisomal y polisomal/no polisomal + polisomal para cada una de las condiciones de germinación (tiempo) y tipo de semilla, determinadas a partir de los perfiles de gradientes de densidad de sacarosa, mediante la determinación del área bajo la curva de los mismos.

Como puede apreciarse en los resultados presentados en la tabla anterior, las relaciones (P/N-P y P/N-P+P) siempre fueron mayores en los casos de la semilla control, por consecuencia, en estas semillas la fracción polisomal fue superior con respecto a la de las semillas deterioradas. El efecto que tuvo el deterioro en las semillas sometidas a estrés, cuya repercusión pudo observarse a través de las curvas de germinación no fue muy obvio en las gráficas de los perfiles de gradientes de densidad de sacarosa. Sin embargo, al realizar los análisis de las relaciones (P/N-P y P/N-P+P) obtenidas de las gráficas, queda manifiesto que sí existe una disminución en la cantidad de polisomas que logran ensamblarse durante la germinación, causado por las condiciones de almacenaje de las semillas. Es notable señalar que a 24 h esta disminución se hace mucho más apreciable en ausencia de  $\alpha$ -amanitina que cuando este inhibidor del proceso de la transcripción se encuentra presente en los ejes.

Se recordará de la sección de materiales y métodos, que de las diferentes fracciones, polisomal y no-polisomal, de los diversos tratamientos, se extrajo el RNA total mediante una precipitación fenol-cloroformo. Este RNA total, que a la postre fue el que se cargó directamente sobre los geles desnaturalizantes, se checó primero sobre

minigeles de agarosa al 1% para estar seguros de la integridad del mismo, y de esta forma evitar que el análisis de Northern blot fuera inútil (ver figura 3.4).

Los carriles 1, 2 y 3 (6D) de la figura (3.4) corresponden al RNA total (1 y 2 fracciones no-polisomales y 3 fracción polisomal) de semilla deteriorada, con 6 horas de germinación; los carriles 1, 2 y 3 (6N) corresponden a la semilla normal con las mismas horas de germinación que el anterior y las mismas equivalencias entre carriles y fracciones. Los carriles 1, 2 y 3 (24D) se refieren a las muestras de la semilla deteriorada pero con 24 horas de germinación en presencia de  $\alpha$ -amanitina, 1, 2 y 3 (24N) pertenecen a la semilla normal (o control), también germinada con  $\alpha$ -amanitina, y es el mismo caso de equivalencias entre carriles y fracciones que los anteriores.

En esta figura se aprecia claramente el estado aceptable del RNA extraído, hecho que se deduce a partir de la buena definición de las bandas de RNA ribosomal, 18S y 25S que pueden verse sobre todo en los carriles de las fracciones polisomales de las diferentes muestras (carriles 3-6D, 3-6N y 3-24D), en el carril 24N no se observan estas bandas, debido a que la cantidad de RNA total que se cargó, era muy pequeña. La integridad de esta fracción se determinó en otro gel, cuya fotografía no se presenta en este trabajo). En cuanto a las fracciones no polisomales, sólo en los carriles 2-6D, 2-6N, 2-24D, y 2-24N, se logran observar las dos bandas antes aludidas, probablemente pertenecientes a los monosomas, mientras que los carriles 1-6D, 1-6N, 1-24D y 1-24N (que igualmente pertenecen a la fracción no polisomal) exhiben la presencia de la banda del RNA de la subunidad pequeña, esto es la banda del RNA ribosomal 18S así como la de un RNA de bajo peso molecular, aproximadamente de 5S que al parecer corresponde al peso de tRNA.

La intensidad variable del RNA en los carriles, se debe a que se cargaron volúmenes iguales en todos los casos, y como las muestras no tenían la misma concentración de RNA, los carriles contenían cantidades diferentes de RNA; en este caso no era

importante igualar las concentraciones de RNA total. Sin embargo para el análisis de Northern blot se tuvieron que poner cantidades iguales en todos los carriles de los geles desnaturalizantes, para tener resultados comparables entre todas las muestras en cuanto al contenido del transcrito de HRGP que se usaría como marcador.

#### **Análisis de Northern blot.**

Las muestras previamente checadas se separaron electroforéticamente en geles desnaturalizantes y posteriormente fueron transferidas a una membrana de nylon que después fue hibridada con la sonda radiactiva de estudio. La autoradiografía del Northern blot se presenta en la figura 3.5. Puede notarse que en la autoradiografía se detectaron dos bandas bien definidas, una de las cuales al parecer era de RNA ribosomal de la subunidad pequeña (la de arriba), y la otra el mensaje de la glicoproteína de pared celular. Esto porque, utilizando las distancias recorridas por las bandas ribosomales a lo largo del gel, determinadas sobre la membrana hibridada, previa tinción con bromuro de etidio, se pudo obtener el conocimiento de que, efectivamente, la distancia recorrida por la banda de mayor peso molecular, observada en la autoradiografía, coincidió exactamente con la distancia que recorrió el RNA de la subunidad ribosomal pequeña vista en la membrana (ver figura 3.4). Conociendo los valores en kilobases (Kb) de los dos RNAs de las dos subunidades ribosomales, así como las distancias experimentales de recorrido, se graficaron ambos puntos sobre una escala logarítmica para poder extrapolar, con la ayuda del valor de la distancia recorrida por la banda de menor peso molecular, la del mensaje, y así obtener un valor aproximado en Kb. Tal resultado fue de 1.8. Un aspecto interesante que se aprecia en esta figura es la cantidad de este mensaje que logra transferirse a polisomas a las 6 horas (carril 3, 6D). Esta cantidad disminuye en la semilla deteriorada, con respecto a la entrada del mismo a polisomas de semilla

normal, (carril número 3, 6N). Esto se deduce si se aprecia la menor intensidad de las bandas en el carril 3-6D que en el carril 3-6N, asumiendo que en ambos se depositó la misma cantidad de RNA total (ver figura 3.4).

Por lo que respecta a la movilización del mensaje a 24 horas de germinación (en presencia de  $\alpha$ -amanitina) puede notarse que en la semilla deteriorada el mensaje se acumuló en la parte no polisomal, es decir no logró transferirse hasta la fracción polisomal, presumiblemente por efecto del estrés, (carril número 2-24D), situación muy contrastante con la de la semilla normal, en donde es claro que el mensaje se detectó principalmente en la fracción polisomal, (carril número 3-24N), y en mayor proporción que en 3-6N.

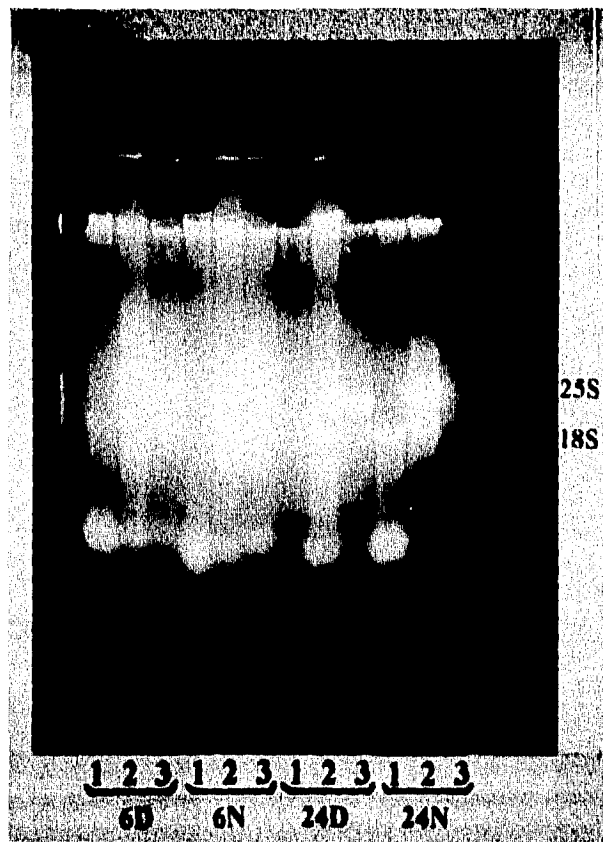


Figura 3.4.- Electroforesis de RNA total en gel de agarosa al 1%. Carriles 1, 2, 3 6D, RNA de embriones deteriorados con 6 horas de germinación. Carriles 1, 2, 3 6N, RNA de embriones normales con 6 horas de germinación. Para los demás carriles es la misma equivalencia, sólo que con 24 horas de germinación en presencia de  $\alpha$ -amanitina.

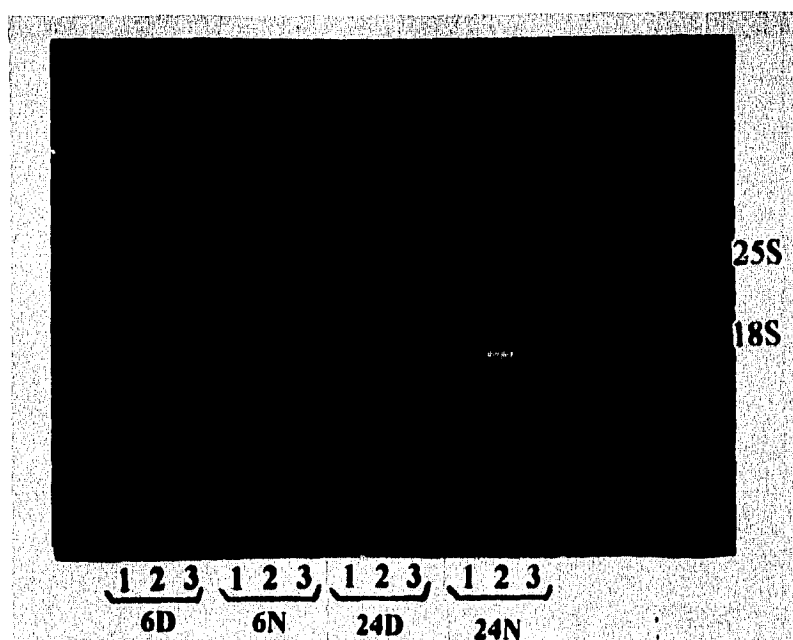


Figura 3.5.- Autorradigrafía de Northern blot. Carriles 1, 2 y 3 (6D y 6N) RNA total de embriones con 6 horas de germinación, deteriorados y normales respectivamente. Carriles 1, 2 y 3 (24D y 24N) RNA total de embriones con 24 horas de germinación en presencia de  $\alpha$ -amanitina deteriorados y normales.



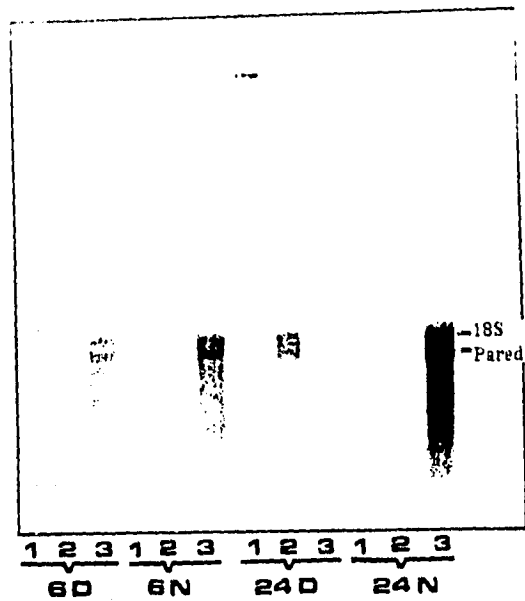


Figura 3.6.- Membrana de transferencia teñida con bromuro de etidio.  
 Carriles 1, 2 y 3 (6D y 6N) RNA total de embriones con  
 6 horas de germinación, deteriorados y normales respectivamente.  
 Carriles 1, 2 y 3 (24D y 24N) RNA total de embriones con 24 horas  
 de germinación en presencia de  $\alpha$ -amanitina deteriorados y normales.

#### 4.0 DISCUSION

Tal como lo muestran las gráficas de las curvas de germinación de los lotes de semillas normal y deteriorada, el estrés de temperatura y humedad aplicado al lote estresado generó diferencias entre los lotes de semillas. Esto se deduce si se observa que un menor número de semillas del lote estresado germinó respecto al control (figura 1). Además, el lapso de tiempo en que germinó la mayor parte de las semillas estresadas fue más prolongado que en el caso de el lote de semillas no deterioradas (figura 2). Estos dos parámetros de la germinación, que según estos experimentos fueron claramente modificados, también pueden serlo por otro tipo de estreses presentes durante el almacenamiento, tal como el tiempo prolongado del mismo, aun en condiciones adecuadas de almacenamiento (Dell'Aquila, 1987; Aguilar *et al.*, 1992).

La repercusión que tiene este tipo de estrés en parámetros como el porcentaje e índice de germinación está ampliamente demostrada en la literatura existente. Para los fines de este trabajo, estos experimentos se realizaron como una prueba que nos permitiese ver, en forma rápida y sencilla, el fenómeno a estudiar, para que sirviera de marco a la parte medular del estudio.

Tomando en cuenta que no se observó desplazamiento significativo en la región donde aparecen los picos de absorbancia (de las PRNPs, los monosomas y polisomas), a lo largo de los perfiles de gradientes (figuras 3.3-A, 3.3-B y 3.3-C), puede asumirse que el estrés no modificó el tamaño de las distintas partículas ribonucleoproteicas y polisomas formadas en ese lapso, ya que si así hubiera sido, los perfiles de ambos tipos de ejes no coincidirían. Sin embargo, el deterioro aparentemente tuvo efecto en la movilización de los mensajes almacenados durante la germinación de los embriones estresados. En efecto, este fenómeno se logra apreciar en los resultados de la tabla 1.1, en la que se muestra que hubo una menor

concentración de polisomas en estos embriones, esto es, un menor número de mensajes se encontraban siendo traducidos en los embriones deteriorados al término de la germinación.

Con relación al marcador usado para medir el efecto del estrés en la movilización de los mRNAs almacenados, cabe recordar que la síntesis de novo de mRNA estuvo inhibida hasta en un 95% en las condiciones que implicaban etapas tardías de la germinación (24 horas), en las cuales se ha visto que más del 60% de los mRNAs utilizados en la síntesis de proteínas provienen de síntesis *de novo* (Beltrán-Peña *et al.*, 1995), caso contrario al que acontece en etapas tempranas de la germinación, en las que la síntesis de proteínas está soportada principalmente por mRNAs almacenados (Kermode, 1990; Rushton and Bray, 1987; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981).

El hecho de que los valores de las razones de los embriones tratados con  $\alpha$ -amanitina (tabla 1.1), fueran menores comparados con aquéllos en los que no se empleó el inhibidor, sugiere que la inhibición de la síntesis *de novo* de RNA por parte de la  $\alpha$ -amanitina ocurrió.

A pesar de que se usó una sonda homóloga y condiciones de hibridación de alta especificidad, hubo cruce inespecífico de la sonda molecular con la subunidad ribosomal pequeña (18S) de maíz. Sin embargo, la posición de esta banda no interfirió con la posición de la banda del mensaje de la glicoproteína hibridado con la sonda homóloga que mostró claramente una banda de menor peso molecular que la de 18S, correspondiendo aproximadamente al peso de la sonda ya reportado (Ruiz-Avila *et al.*, 1991).

La explicación de esta hibridación inespecífica podría deberse a que la homología entre la secuencia de bases de la subunidad ribosomal pequeña de maíz y la secuencia de la sonda empleada, sea alta en alguna zona del rRNA de tal suerte que ni aun aplicando las condiciones de astringencia (con el fin de eliminar la

hibridación inespecífica, situación que por cierto, a juzgar por la limpieza de la autorradiografía, se pudo cumplir), se haya eliminado la presencia de dicha banda.

Por otra parte, el valor en kilobases (Kb) obtenido para la banda de menor peso molecular, que fue de 1.8, es relativamente mayor al reportado para el mensaje de maíz medido en el híbrido con la misma sonda, que fue de 1.5 Kb (Ruiz-Avila *et al.*, 1991). Cabe mencionar que al no haber utilizado marcadores de peso molecular (por que no se contaba con ellos) durante la electroforesis, limitó la exactitud en la determinación del valor de la banda del mensaje ya que ésta sólo se hizo graficando dos puntos, los de las distancias recorridas a lo largo del gel, por el rRNA de las subunidades ribosomales.

La mayor presencia de mensaje en la fracción polisomal de la condición 6N respecto a la misma fracción en la condición 6D implica que la movilización del mensaje para la glicoproteína se vio ligeramente afectada por efecto del deterioro en la semilla estresada, pero no tanto como lo fue en la condición de 24 horas de germinación de semillas deterioradas (figura 5). En este caso el estrés propició que el mensaje viera frenada aun más su movilización hacia la fracción polisomal ya que puede notarse que la mayor parte del mensaje se detectó en la fracción no polisomal, que presumiblemente contenía monosomas y a lo sumo pequeños polisomas, como se comprobó por análisis de las partículas presentes en este pico de absorbancia, por otros miembros del laboratorio en trabajos previos (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981). Esta situación fue totalmente diferente a la del control en donde la mayor parte del mensaje se ubicó en la fracción polisomal (3-24D, figura 3.5). Lo anterior parece indicar que el deterioro afectó de tal forma a la traducción de esta proteína que sólo permitió que se ensamblasen los mensajes a monosomas y quizás pequeños polisomas, pero de alguna forma de ahí en adelante, la elongación traduccional se vio frenada.

No obstante que la integridad del rRNA pareció ser aceptable (figura 3.4), probablemente una parte de éste (sobre todo en el caso de las muestras de RNA total provenientes de embriones de semillas estresadas) no lo era, de tal suerte que ese hecho fuese uno de los factores que afectaron la movilización de mensajes (Broklehurts and Fraser, 1980).

Como ya se mencionó, la tinción con bromuro de etidio de la membrana hibridada con la sonda homóloga se hizo con la idea de tener un testimonio gráfico en el cual se demostrara que la cantidad cargada de RNA total en los carriles del gel, hubiese sido más o menos la misma (figura 3.6). Aun cuando en esta figura se observan ligeras diferencias en las intensidades de las bandas ribosomales, las cuales están en función de la cantidad de muestra cargada, no se deben a esta circunstancia los efectos vistos en la inmovilización del mensage en la autorradiografía del análisis de Northern blot (figura 3.5).

Es interesante considerar los resultados negativos obtenidos en la distribución de mRNAs a partir de embriones de 24 horas de germinación sin  $\alpha$ -amanitina durante el análisis de Northern blot. Este fenómeno podría deberse a que durante la germinación las semillas estresadas y las no estresadas, hayan sintetizado transcritos de proteínas relacionadas con la muerte celular o con la degradación de proteínas o RNA, de tal suerte que la acción del  $\alpha$ -amanitina en los embriones que sí fueron tratados con este inhibidor hubiera impedido la síntesis de estos transcritos y por ende su acción contra la funcionalidad del RNA, lo cual no ocurriría en las semillas germinadas en ausencia de  $\alpha$ -amanitina.

Otros aspectos del estrés aplicado, congruentes con los resultados obtenidos en este trabajo podrían, por ejemplo, ser la disminución en la energía disponible en el embrión para su desarrollo y por ende para la ocurrencia de numerosos procesos bioquímicos vitales durante la germinación. Como se pudo observar en los resultados, aparentemente la movilización a una etapa tardía de la germinación de

embriones estresados, se vio frenada después de ensamblados los monosomas. Esto podría implicar que la etapa de elongación de la síntesis de proteínas hubiese sido la etapa más afectada de este proceso. Brocklehurst y Fraser (1980), han encontrado que semillas no viables de diferentes tipos, poseen un contenido mucho menor de adenosín trifosfato (ATP) que semillas viables. Esto significa que probablemente la baja de ATP, GTP y otras fuentes energéticas, pudiera ser uno de los factores que impidiesen la realización de procesos metabólicos altamente consumidores de energía, como en este caso, la etapa de elongación. Considerando que durante la síntesis de proteínas, por cada adición de un aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento se consumen dos moléculas de GTP, se puede concluir que el generar nuevas proteínas es uno de los procesos que requieren gran cantidad de energía. Además, si pensamos en que la fracción en donde se encuentra la mayor cantidad de mensaje, en los casos en que la movilización se detuvo, es la fracción 2 constituida de monosomas y de subunidades ribosomales libres, entonces es razonable pensar que el ensamblaje del mensaje para formar los monosomas activos, también estuviera afectada por la baja cantidad de moléculas energéticas, derivada del estrés, esto en base a que tanto la etapa de activación de aminoácidos, como el mismo inicio de la traducción requieren también cantidades importantes de ATP y GTP. Otros factores posiblemente involucrados y que pueden estar igualmente relacionados con la inhibición de la etapa de elongación, son: la fosforilación de proteínas ácidas ribosomales y su efecto en la unión de éstas con los ribosomas, así como la funcionalidad de éstos. Se ha descubierto que el contenido de proteínas ácidas ribosomales dentro de la subunidad ribosomal grande está en función de el estado metabólico en células procariones y eucariotes (Sáenz-Robles *et al.*, 1981), en forma tal que la ausencia de estas proteínas en los ribosomas puede ocasionar que el factor de elongación EF-2, pierda su actividad de hidrólisis de GTP (de cuya importancia ya se habló). En ejes de maíz se ha encontrado que las proteínas

ribosomales ácidas se fosforilan intensamente al inicio de la germinación, indicando que no están ensambladas en los ribosomas de ejes secos (Pérez-Méndez *et. al.*, 1993) de tal manera que si el estrés aplicado afectara la unión de estas proteínas a los ribosomas, por carecer de energía para su fosforilación, entonces uno de los posibles daños en el proceso traduccional podría situarse a este nivel (Aghoven *et al.*, 1979).

Existen experimentos que indican que procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas ácidas ribosomales son eventos claves para que ocurra la interacción entre éstas y los ribosomas (Vidales *et.al.*, 1984; Zinker *et.al.*, 1980). Esto implica que si de alguna forma el estrés inhibiera además la actividad de la cinasa responsable de la fosforilación de tales proteínas, entonces estaría ocurriendo un daño traduccional al mismo nivel de elongación durante la síntesis de proteínas (Sánchez-Madrid *et. al.*, 1979). Esto podría ocurrir tanto por impartir carácter no funcional a los ribosomas como por inhibir la actividad de hidrólisis por GTP del factor de elongación EF-2 (Sánchez-Madrid *et.al.*, 1981).

ribosomales ácidas se fosforilan intensamente al inicio de la germinación, indicando que no están ensambladas en los ribosomas de ejes secos (Pérez-Méndez *et. al.*, 1993) de tal manera que si el estrés aplicado afectara la unión de estas proteínas a los ribosomas, por carecer de energía para su fosforilación, entonces uno de los posibles daños en el proceso traduccional podría situarse a este nivel (Agthoven *et al.*, 1979).

Existen experimentos que indican que procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas ácidas ribosomales son eventos claves para que ocurra la interacción entre éstas y los ribosomas (Vidales *et.al.*, 1984; Zinker *et.al.*, 1980). Esto implica que si de alguna forma el estrés inhibiera además la actividad de la cinasa responsable de la fosforilación de tales proteínas, entonces estaría ocurriendo un daño traduccional al mismo nivel de elongación durante la síntesis de proteínas (Sánchez-Madrid *et. al.*, 1979). Esto podría ocurrir tanto por impartir carácter no funcional a los ribosomas como por inhibir la actividad de hidrólisis por GTP del factor de elongación EF-2 (Sánchez-Madrid *et.al.*, 1981).



## 5.0 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se pueden hacer las siguientes conclusiones, respecto al efecto del estrés en las semillas, expresado en los diferentes parámetros analizados:

- 1.- La germinabilidad del lote de maíz estresado se vio retardada y disminuída respecto a la del lote control.
- 2.- La movilización de mensajes almacenados se vio reducida cuantitativamente en cuanto a la transición desde su forma de partículas ribonucleoproteicas a su estado de polisomas activos durante la síntesis de proteínas. Este fenómeno se observó tanto a etapas temprana como tardía de la germinación, en semillas de maíz estresadas.
- 3.-Dicha reducción se pudo determinar de dos formas: a) Por medio del cálculo de las áreas bajo la curva de las fracciones polisomales y no polisomales para cada condición y b) mediante análisis de Northern blot practicados al RNA total de los embriones, usando una sonda específica de un mRNA que codifica para una glicoproteína de pared celular.
- 4.- Probablemente, la modificación en la movilización de los mensajes ocurrió a nivel de la elongación de la síntesis de proteínas, a juzgar por los resultados derivados de los experimentos.
- 5.- Las evidencias muestran que la movilización del mensaje usado como marcador, es uno de los diversos factores susceptibles a ser deteriorados por la presencia de este tipo de estrés.
- 6.- Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la importancia que tiene la aplicación de condiciones adecuadas, bajas temperaturas y humedades relativas, durante el almacenamiento de semillas, en aspectos tales como su germinabilidad.

7.- Este tipo de conocimientos, acerca de aspectos biológico-moleculares susceptibles a ser alterados por factores estresantes, podrían emplearse como criterios para obtener variedades de maíz resistentes a estreses.

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

- 1-Agthoven van, A., J., Massen, J., A. and Möller, W., (1977) Structure and Phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis. *Biochemical and biophysical research communications*, **77**, 989-998.
- 2-Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryogenic maize tissue during germination. *J. Plant Physiol.*, **135**, 416-421.
- 3-Bewley, D. and Black, M., (1986) *Seeds, physiology of development and germination*. New York. Plenum Press. pp 104-107.
- 4-Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A. and Sánchez de Jiménez, E. (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Molecular Biology*. In press.
- 5-Bewley, J. D. and Black, M. (1978) *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Volume 1. Development, Germination and Growth. Springer-Verlag. pp 1-20, 115-117.
- 6-Black, M. (1989) Seed research, past, present and future. *Advances in the development and germination of seeds*. Vol **187**, 1-6.
- 7-Bray, C. M. and Chow, T. Y. (1976a) Lesions in post-ribosomal supernatant associated with loss of viability in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biochem. Biophys. Acta* **442**, 1-3.
- 8-Bray, C. M. and Chow, T. Y. (1976b) Lesions in the ribosomes of non-viable pea (*Pisum sativum*) embryonic axes tissue. *Biochim. Biophys. acta* **442**, 14-23.
- 9-Bray, C. M. and Dasgupta, J. (1976) Ribonucleic acid synthesis and loss of viability in pea seeds. *Planta* **132**, 103-108.

- 10-Brocklehurst, P. A. and R.S.S. Fraser (1980) Ribosomal RNA integrity and rate of seed germination. *Planta* **148**, 417-421.
- 11-Chen, D., Sarid, and Katchalski, E. (1968) Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. *Biochemistry* **60**, 902-909.
- 12-Cooper, J. B. and Varner, J. E. (1983) Selective inhibition of proline hydroxylation by 3, 4- dehydroproline. *Plant Physiology* **73**, 324-328.
- 13-Datta, K., Marsh, I. and Markus, A. (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology* **72**, 394-397.
- 14-Dell'Aquila, A. (1987) Mean germination time as a monitor of seed ageing. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**, 761-768.
- 15-Dell'Aquila, A. Zocchi, G., Lanzani, G. A. and De leo, P. (1976) Different forms-off EFl and viability in wheat embryos. *Phytochemistry* **15**, 1607-1610.
- 16-Delouche, J. C., Baskin, C. C. (1973) Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* **1**, 427-452.
- 17-De Vries, H. (1901) *Die Mutationstheorie*, Vol. 1, Veit and Co
- 18-Dommes, J. and de Walle, C. (1983) Newly synthesized mRNA in translated during the initial imbibition phase of germinating maize embryo. *Plant Physiology* **73**, 484-487.
- 19-Hoseney, R. C., (1991) *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Zaragoza España. Ed. Acribia 114-120.
- 20-José-Estanyol, M., Ruiz-Avila, L. and Puigdoménech, P. (1992) A maize embryo specific gene encodes a proline rich and hidrophobic protein. *Plant Cell* **4**, 413-423.
- 21-Kermode, A.R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *CRC Crit Rev Plant Sci* **9**, 155-195.
- 22-Klein, R.R.; Mason, H. S; Mullet, E.J. (1988) Hight-Regulated Translation of chloroplast proteins. Transcripts of PsaA-PsaB, PsbA, and RbcL are asociated with

- 10-Brocklehurst, P. A. and R.S.S. Fraser (1980) Ribosomal RNA integrity and rate of seed germination. *Planta* **148**, 417-421.
- 11-Chen, D., Sarid, and Katchalski, E. (1968) Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. *Biochemistry* **60**, 902-909.
- 12-Cooper, J. B. and Varner, J. E. (1983) Selective inhibition of proline hydroxylation by 3, 4- dehydroproline. *Plant Physiology* **73**, 324-328.
- 13-Datta, K., Marsh, I. and Markus, A. (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology* **72**, 394-397.
- 14-Dell'Aquila, A. (1987) Mean germination time as a monitor of seed ageing. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**, 761-768.
- 15-Dell'Aquila, A. Zocchi, G., Lanzanc, G. A. and De leo, P. (1976) Different forms-off EF1 and viability in wheat embryos. *Phytochemistry* **15**, 1607-1610.
- 16-Delouche, J. C., Baskin, C. C. (1973) Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* **1**, 427-452.
- 17-De Vries, H. (1901) *Die Mutationstheorie*, Vol. 1, Veit and Co
- 18-Dommes, J. and de Walle, C. (1983) Newly synthesized mRNA in translated during the initial imbibition phase of germinating maize embryo. *Plant Physiology* **73**, 484-487.
- 19-Hoseney, R. C., (1991) *Principios de ciencia y tecnologia de los cereales*. Zaragoza España. Ed. Acribia 114-120.
- 20-José-Estanyol, M., Ruiz-Avila, L. and Puigdoménech, P. (1992) A maize embryo specific gene encodes a proline rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* **4**, 413-423.
- 21-Kermode, A.R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *CRC Crit Rev Plant Sci* **9**, 155-195.
- 22-Klein, R.R.; Mason, H. S; Mullet, E.J. (1988) Light-Regulated Translation of chloroplast proteins. Transcripts of PsaA-PsaB, PsbA, and RbcL are associated with

polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *Journal of Cell Biology* **106**, 289-301.

23-Lakon, G. (1949) The topographical method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* **24**, 389-394.

24-Larson, D.E. and Sells, B.H. (1987) The function of proteins that interact with mRNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* **74**, 5-14.

25-Lehninger, A. L., Nelson, L. D., and Cox, M. M., (1993) *Principles of Biochemistry*. second edition. Worth Publishers. chapter 26, pp 892-940.

26-Ludevid, M. D., Ruiz-Avila, L., Vallés, M. P., Stiefel, V., Torrent, M., Torné, J. M. and Puigdoménech, P. (1990) Expression of genes for cell-wall proteins in dividing and wounded tissues of *Zea mays* L. *Planta* **180**, 524-529.

27-Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1990) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. second edition. CSH laboratory.

28-Marmur, J. J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.

29-Mayer, A. M. and A. Poljakoff-Mayber, (1989) *The germination of seeds*. Fourth edition, pp 19-21.

30-Mory, Y. Y., Chen, D. and Sarid, S. (1972) Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. *Plant Physiology* **49**, 20-23.

31-Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-479.

32-Muro, R. M. (1986) Efecto del deterioro de semillas sobre los sistemas de síntesis de proteínas de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

33-Navashin, M. S. (1933) Ageing of seeds is a cause of chromosome mutations. *Planta* **20**, 233-243.

34-Nichols, C. (1941) Spontaneous chromosome aberration in *Allium*. *Genetics* **26**, 89-100.

- 35-Osborne, D. J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* **61**, 3568-3577.
- 36-Osborne, D. J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. (1980/81) Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*) *Israel J. of Botany* **29**, 259-272.
- 37-Pérez-Méndez, A., Aguilar, R., Briones, E. and Sánchez de Jiménez, E. (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Science* **94**, 71-79.
- 38-Peumans, W. J. and Carlier, A. R. (1981) Loss of protein synthesis activity in ageing wheat grains: Lesions in the initiation process and mRNA degradation. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **176**, 384-395.
- 39-Roberts, B. E. and Osborne, D. J. (1973) Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescence. *Biochem. J.* **135**, 405-410.
- 40-Roberts, B. E., Payne, P. I., Osborne, D. J. (1973) Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activity of protein synthesizing systems in vitro associated with a loss of viability. *Biochem. J.* **131**, 375-386.
- 41-Ruiz-Avila, L., Ludevid, M. D. and Puigdoménech, P. (1991) Differential expression of a hydroxyproline-rich cell-wall protein gene in embryonic tissues of *Zea mays* L. *Planta*, **184**, 130-136.
- 42-Rushton, P.J. and Bray, C.M. (1987) Stored and *de novo* synthesized polyadenylated RNA and loss of vigor and viability in wheat seeds. *Plant Sci.* **51**, 51-59.
- 43-Sáenz-Robles, M.T., Remacha, M., Vilella, M.D., Zinker, S. and Ballesta, P.G.J. (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of eukaryotic ribosomal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1050**, 51-55.

- 44-Sánchez de Jiménez, E., Reynoso, E., Albores, M. and Aguilar, R.,(1992) Changes in protein synthesis in embryonic axes after long-term storage of maize seeds. *Seed Science Research*, **2**, 191-198.
- 45-Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1984) Protein synthesis patterns : relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* **75**, 231-234.
- 46-Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., López, S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **99**, 445-450.
- 47-Sánchez-Madrid, F., Vidales, F.J. and Ballesta, J.P.G. (1981) Functional role of Acidic Ribosomal Proteins. Interchangeability of Proteins from Bacterial and Eukaryotic Cells. *Biochemistry*, **20**, 3263-3266.
- 48-Sánchez-Madrid, F., Conde, P., Vázquez, D. and Ballesta, J.P.G. (1979). *Biochemical Biophysics Res. Commun.*, **87**, 281-291.
- 49-Sax, K., and Sax, H. J. (1964) The effect of chronological and physiological ageing of onion seeds on the frequency of spontaneous X-ray induced chromoaberrations. *Radiat. Bot.* **4**, 37-41.
- 50-Sen, S. and Osborne, D. J. (1977) Decline in ribonucleic acid protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (*Secale cereale*) embryos. *Biochem. J.* **166**, 33-38.
- 51-Van Onckelen, A., Verbeek, R. and Khan, A. A. (1974) Relationship of ribonucleic acid and metabolism in embryo and aleurone to  $\alpha$ -amilase synthesis in barley. *Plant Physiology* **53**, 562-568.
- 52-Vázquez-Ramos, J.M., López, S., Vázquez, E. and Murillo, E. (1988). DNA integrity and DNA polymerase activity in deteriorated maize embryo axes. *J. Plant Physiol.*, **133**, 600-604.



53-Vidales, F.J., Sáenz-Robles, M.T. and Ballesta, J.P.G. (1984). Acidic proteins of the large Ribosomal Subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of Phosphorylation. *Biochemistry*, **23**, 390-396.

54-Villiers, T. A. (1974) Seed ageing: Chromosomes stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiology* **53**, 875-878.

55-Zinker, S. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **606**, 76-82.