

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES Y CITOQUIMICOS EN EL  
ENDOSPERMO DE *Turbina corymbosa* (Convolvulaceae)  
DURANTE LA GERMINACION.**

**M en C GUILLERMO LAGUNA HERNANDEZ**

**TESIS DOCTORAL  
(BIOLOGIA)**

**1990**



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.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO  
DE CITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.  
BAJO LA DIRECCION DE LA DOCTORA GUADALUPE  
JUDITH MARQUEZ GUZMAN.

1990

**A:**

**María Teresa (esposa), por la comunión de nuestros sentidos.**

**Ayari e Ireri (hijas), por la inspiración en el saber.**

**Carmen (madre), por la fortuna de ser.**

**Jacinto (padre), por la permanencia de su valor.**

**Ruth, Adalberto, Ana María, Jacinto (hermanos), por la fuerza de nuestra unión.**

**Mi familia, por la conjunción de los valores más elevados.**

**Mis amigos, por la confianza.**

**Mis maestros, por su labor ejemplar.**



## A G R A D E C I M I E N T O S

A todos aquellos que me brindaron su apoyo para el logro del presente documento.

A los integrantes de la comisión que dictaminó sobre los méritos del presente trabajo:

DRA. MARIA CRISTINA PEREZ AMADOR B.

DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

DR. EMIL MARK ENGLEMAN

DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA

DR. ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES

Al Dr. H. Merchant L. y a la Dra. Irma Villalpando por las facilidades para el uso del microscopio electrónico en el laboratorio a su cargo.

A la Dra. M.C. Pérez Amador y a la Biol. Patricia Guevara F. por el apoyo en la parte química de este estudio.

Al Dr. A. Hamabata N. y a la Biol. Ivone Márquez por el apoyo en los ensayos de hidratación y lixiviación.

A la M. en C. Alicia Brechú F. por su estímulo constante.

A las secretarias: Maria del Carmen Victorio G.  
Elisa Bárcenas del Olmo  
María de la Luz Legaria G.

## C O N T E N I D O

RESUMEN

INTRODUCCION .....	1-4
OBJETIVOS .....	5
ANTECEDENTES .....	6-15
MATERIALES Y METODOS .....	16-21
RESULTADOS .....	22-37
DISCUSION .....	38-53
CONCLUSIONES .....	54-55
LITERATURA CITADA .....	56-69

## R E S U M E N

La semilla madura de *Turbina corymbosa* "ololiuhqui", presenta un endospermo formado por dos regiones: la capa de aleurona de células vivas y la capa de galactomananos, una región acelular, constituida por restos de paredes celulares.

En el presente trabajo se estudiaron los cambios en la organización subcelular del endospermo y la movilización de sus reservas, durante la germinación.

Se utilizaron semillas embebidas de una a noventa y dos horas, las cuales se procesaron para su observación al microscopio fotónico y al microscopio electrónico de transmisión. Además se realizaron pruebas citoquímicas de alta resolución.

Con microscopio fotónico y la reacción de ácido peryódico-reactivo de Schiff, se observaron los primeros cambios en la región acelular a partir de las cuarenta y ocho horas. A las setenta y dos horas los galactomananos desaparecen junto con las células de la capa de aleurona. Con el microscopio electrónico, los cambios se hacen aparentes desde la primera hora de imbibición. El retículo endoplásmico se organiza desde las veinticuatro horas de imbibición. Se nota la transformación de los cuerpos proteicos en vacuolas con restos de material de membranas y la introducción de esferosomas, plastos y mitocondrias a las vacuolas en las muestras

de cuarenta y ocho horas en adelante. Aparece hidrólisis total de las células a las setenta y dos horas. Las pruebas citoquímicas de alta resolución, demuestran la actividad de fosfatasa ácida, en los cuerpos proteicos, desde la primera hora de imbibición y la actividad de lipasa neutra en los esferosomas, cuando penetran a las vacuolas derivadas de los cuerpos proteicos.

Los resultados sugieren que la fuente de energía que el endospermo utiliza durante la germinación, proviene de la degradación de los glicéridos, almacenados en los esferosomas y que los cuerpos proteicos funcionan como vacuolas autolíticas. Se propone que el endospermo puede participar como captador y regulador de agua para la germinación y como fuente de energía, carbono, nitrógeno y reguladores del crecimiento para el embrión.

*Turbina corymbosa* (Convolvulaceae) DURANTE LA GERMINACION.

## I N T R O D U C C I O N

*Turbina corymbosa* (L.) Raf., sinom. *Rivea corymbosa* (L.) Hall., perteneciente a la familia Convolvulaceae, es una enredadera leñosa, de flores blancas en corimbos. En la República Mexicana se localiza en zonas cálidas del Sur y también se encuentra en Centroamérica (Standley y Williams 1970). Su semilla se conoce en México con los nombres de "ololiuhqui", "semilla de la virgen", "badoh amarillo" y "xtabentum". Se reporta como una planta muy usada desde antes de la conquista española y después en la época colonial, en ritos indígenas de caracter mágico-religiosos (Osmond 1955, Wasson 1963, Barrera et al. 1976, Díaz 1979, Schultes y Hofmann 1979). En 1960 Hofmann y Tschertter y en 1963 Hofmann reportan el aislamiento y caracterización de los principios activos que presentan las semillas de esta especie, los que le confieren propiedades psicotrópicas.

La semilla de *Turbina corymbosa* es pequeña y ovoide, mide en promedio 4.3mm de largo y 3.6mm de ancho. Su color corresponde al castaño rojizo en una tabla de colores (Kornerup y Wanscher 1978). Su testa es dura, impermeable al agua, cubierta por tricomas pequeños. Contiene un embrión bien desarrollado, con dos

cotiledones longiplicados, tres veces mas largos que el eje embrionario, en medida perimetral. El embrión presenta abundantes reservas de lípidos y proteínas. La semilla presenta un endospermo constituido por dos regiones: una capa de aleurona, formada por uno a tres estratos de células vivas, que contienen abundantes esferosomas (cuerpos lipídicos) y cuerpos proteicos. Esta capa está separada de la testa por una cutícula y hacia el embrión está directamente relacionada con la otra región del endospermo que es acelular, fibrosa brillante cuando está seca y mucilaginoso cuando está hidratada, con un alto contenido de galactomananos (Márquez-Guzmán y Laguna-Hernández 1982, Laguna-Hernández et al. 1984, Brechú-Franco 1980).

Son numerosos los estudios que se han realizado respecto a la germinación de semillas de importancia agrícola, relacionados con su latencia, viabilidad y vigor. Se han investigado aspectos bioquímicos, moleculares, celulares, fisiológicos y morfológicos, ya sea en la semilla completa, embrión, cotiledones, eje embrionario o el endospermo.

En cuanto a investigaciones que tratan sobre el papel del endospermo en la germinación, existen muchos trabajos en el campo bioquímico y fisiológico, pero a nivel celular son muy escasos (Hanson et al. 1959, Nieuwdorp y Buys 1964, Horner y Arnott 1966, Eb Van Der y Nieuwdorp 1967, Srivastava y Paulson 1968, Ory et al.

1968, Breidenbach et al. 1968, Jones 1969a y 1969b, Jones y Price 1970, Vigil y Ruddat 1973, Reid 1971, Reid y Meier 1972, Hallam et al. 1972, Rost 1972, Jones 1974, Jacobsen et al. 1976, Jacobsen y Pressman 1979, McClendon et al. 1976, Jelsema et al. 1980, Thomas et al. 1980, Brechú-Franco et al. 1984, Gregerson y Taiz 1985, Fernández y Staehelin 1987, Brooks y Mitchell 1988, Sakai-Wada y Nakata 1987). Aun así, la información que estas investigaciones han aportado, junto con las realizadas en el campo bioquímico, ha permitido un gran avance en el conocimiento integral de la germinación en las semillas de monocotiledóneas y sobre todo en algunas gramíneas (Jacobsen et al. 1979). En el caso de las semillas dicotiledóneas y endospermicas, los estudios son más escasos y se encuentran en sus primeras etapas (Reid 1971, Reid y Meier 1972 y 1973, Reid y Davies 1977, Rijven 1972, McCleary et al. 1976, McCleary 1983, McCleary y Matheson 1983, Bewley et al. 1983, Ouellette y Bewley 1986). Estas semillas son un sistema biológico interesante para investigar la germinación, porque la mayoría de ellas presentan en su endospermo una región acelular constituida fundamentalmente por galactomanano, como es el caso de algunas leguminosas (Meier y Reid 1982) y convolvuláceas (Brechú-Franco 1980). Estas últimas poseen además una capa de aleurona con abundantes reservas de lípidos y proteínas (Laguna-Hernández et al. 1984), por otra parte, provienen de

plantas silvestres, lo que las hace un sistema no perturbado por la manipulación humana.

El presente estudio tiene el propósito de aportar datos que permitan avanzar en la integración del conocimiento de la germinación en semillas dicotiledóneas y endospermicas.

## O B J E T I V O   G E N E R A L

EXPLICAR LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES QUE SE PRESENTAN EN EL ENDOSPERMO DE LA SEMILLA DE *Turbina corymbosa* Y RELACIONARLOS CON SU FUNCION DURANTE LA GERMINACION.

## O B J E T I V O S   P A R T I C U L A R E S

- 1- ANALIZAR LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL ENDOSPERMO NO CELULAR
- 2- ANALIZAR LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES EN LA ORGANIZACION SUBCELULAR DE LA CAPA DE ALEURONA.
- 3- ANALIZAR LA MOVILIZACION DE LAS RESERVAS DEL ENDOSPERMO MEDIANTE TECNICAS CITOQUIMICAS DE ALTA RESOLUCION.
- 4- RELACIONAR LOS HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES Y CITOQUIMICOS CON LA CINETICA DE IMBIBICION DE LA SEMILLA Y EL FLUJO DE SOLUTOS.

## A N T E C E D E N T E S

### Ubicación taxonómica (Cronquist 1981).

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Convolvulaceae
Género:	<i>Turbina</i>
Especie:	<i>Turbina corymbosa</i>

### Sinonimia:

*Turbina corymbosa* (L.) Raffinesque Fl. Tell. 11:81. 1836

*Convolvulus corymbosa* L. Syst. Nat. ed. 10:293. 1759

*Convolvulus sidaefolia* H.B.K. Nov. Gen. et Sp. 3:99. 1818

*Ipomoea sidaefolia* Choisy Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve  
6:459. 1833

*Rivea corymbosa* (L.) Hall. f., Bot. Jahrb. Syst. 18:157 1893

Cuando Hofmann y Tschertter (1960) y Hofmann (1963), reportaron sus hallazgos acerca de los alcaloides contenidos en las semillas de *T. corymbosa*, lo hicieron con el nombre sinónimo de *Rivea corymbosa* a pesar de que Raffinesque en 1836 había dado a esta especie el nombre de *Turbina corymbosa*. Pérezamador y colaboradores (1960 y 1964), acerca del aislamiento y estructura del glucósido turbicorina, la refieren como *Turbina corymbosa*.

En la actualidad el género está bien caracterizado y se sabe que presenta dos especies en el mundo, pero en México sólo se encuentra la especie *T. corymbosa* (Austin 1975).

La semilla de esta especie la hemos estudiado en su anatomía y morfología, en la ultraestructura de las células de aleurona de semillas en latencia, durante su desarrollo y en algunos aspectos de su germinación (Márquez-Guzmán y Laguna-Hernández 1982, Laguna-Hernández et al. 1984, Márquez-Guzmán 1986, Brechú-Franco et al. 1984, Brechú-Franco 1980). Esto nos ha permitido saber que es una semilla que presenta latencia por testa dura, impermeable al agua. Cuenta con un endospermo rico en carbohidratos, principalmente galactomanano y en lípidos con abundante ácido linoleico, almacenados en los esferosomas de las células de aleurona, las cuales también presentan cuerpos proteicos. La semilla posee un alto porcentaje de germinación cuando se escarifica.

Esta semilla es muy interesante en el aspecto etnobotánico por el uso que se le da en ritos mágico-religiosos, en el campo de la farmacología por las propiedades curativas que se le asignan y por su contenido de alcaloides del tipo ergolínicos, en la química por la presencia de glucósidos con un esqueleto básico de kaureno. Por todo esto, ha recibido mucha atención de los científicos y se ha producido gran cantidad de reportes.

Ahora la estamos considerando como un sistema biológico apropiado para el estudio de la germinación en los aspectos de la movilización de reservas, a través de los cambios observados a nivel celular, subcelular y citoquímico.

La germinación es el nacer de un organismo, a partir de una espora o una semilla.

En las fanerógamas generalmente se ha dado este nombre al desarrollo de una planta joven, a partir del embrión (Baillon 1886).

Germinar (del latín *germinare* - brotar, echar vástagos la planta), v. intr. En las espermatofitas, cuando el embrión contenido en la semilla recobra su actividad vital, amortiguada durante más o menos tiempo, se dice que germina y el fenómeno recibe el nombre de germinación. Lo provocan la absorción de agua y una temperatura adecuada. El embrión y el

tejido nutricio embeben el agua y se hinchan, actúan las zimasa y movilizan las reservas, la plúmula despierta de nuevo a la vida y reviven los meristemas todos. (Font Quer 1953).

Las dos definiciones anteriores dan idea del conocimiento que se tenía en ese tiempo, en 1886 se define el fenómeno con base en los aspectos morfológicos aparentes a simple vista y en 1953 ya se incluyen en la definición aspectos finos como son: la imbibición, la actividad enzimática, la movilización de reservas y los cambios citológicos en los meristemas.

Conforme ha avanzado la tecnología en las diversas áreas del conocimiento, han avanzado los métodos de estudio aplicados para resolver las múltiples incógnitas planteadas en una área determinada. En el caso de la germinación de las semillas se han aplicado para su estudio las técnicas modernas de la física, de la biofísica, de la química, de la bioquímica, de la biología molecular y de la biología celular, cuyos resultados han permitido integrar el conocimiento del fenómeno en algunas gramíneas, que son las que más atención han recibido.

La gran cantidad de información derivada de estos estudios y la fragmentación del conocimiento debido a los distintos enfoques de estudio, han hecho que en la actualidad resulte difícil definir el fenómeno. Muchos no aceptan la definición simple de antes, o más

aún, algunos consideran la germinación como la captación de agua, pero que incluye numerosos eventos como: hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis macromolecular y crecimiento celular (Bewley y Black 1982). Esto lleva a definir el fenómeno desde varios puntos de vista, como por ejemplo: morfológicamente, germinación es la transformación de un embrión en una plántula; fisiológicamente, es la reanudación del metabolismo y crecimiento que fueron suspendidos o disminuidos y el comienzo en la transcripción del genoma; bioquímicamente, germinación es la diferenciación secuencial de las vías oxidativa y sintética (Jan y Amen 1977).

Así se podrían sumar más definiciones de acuerdo a las áreas cognoscitivas que se ocuparan del fenómeno, pero en forma integral se acepta que la germinación es un proceso que lleva un embrión a transformarse en una plántula y que esto involucra gran variedad de eventos, directamente relacionados con la organización de la semilla.

Las semillas son una parte fundamental en el ciclo de vida de las angiospermas, porque contienen el embrión que se desarrollará en una nueva planta, cuando la semilla germine. En este momento, el embrión utiliza las substancias almacenadas en su cuerpo, en el endospermo o en el perispermo, para crecer y transformarse en una plántula, que al establecerse y desarrollarse alcanza el estado de

planta madura, la cual, cierra el ciclo al producir semillas. Las semillas de las plantas monocotiledóneas, en general presentan un embrión pequeño con un cotiledón que puede ser grande o pequeño en relación al eje radícula-hipocotilo; sin embargo, presentan un endospermo bien desarrollado, que puede almacenar carbohidratos, en su mayoría almidones, lípidos del tipo triglicéridos y/o proteínas, en diferentes proporciones, de acuerdo al taxon que correspondan.

Las semillas de plantas dicotiledóneas, en general, presentan un embrión grande, bien desarrollado, con dos cotiledones, que son grandes en la mayoría de las semillas, en las cuales, por lo general, el endospermo ha desaparecido durante el desarrollo del embrión y las sustancias de reserva se almacenan en los cotiledones. Sin embargo, en este grupo hay semillas que en su madurez presentan endospermo que puede almacenar carbohidratos generalmente no almidonosos, lípidos y proteínas. De acuerdo a las características de las semillas arriba mencionadas, será su comportamiento durante la germinación. Los diferentes aspectos que este fenómeno comprende, han sido estudiados a niveles y en circunstancias diversas y desde varios puntos de vista, en gran variedad de especies y sus resultados están contenidos en multitud de artículos y que llenan capítulos de varios libros (Koslowsky 1972, Bewley y Black 1982, Khan 1982, Nozzolillo et al. 1983).

El presente trabajo estudia algunos aspectos del fenómeno de la germinación, con técnicas propias de la Biología Celular, en una semilla dicotiledónea, con endospermo mucilaginoso formado principalmente por galactomananos, y una capa de aleurona con abundantes reservas de lípidos y proteínas y escaso almidón.

El estudio de las células de aleurona en la semilla madura deshidratada (Laguna-Hernández et al. 1984) y la investigación de los fijadores y amortiguadores más apropiados para el estudio de semillas (Mollenhauer y Tottem 1971), permitió considerar que el uso de dos técnicas de postfijación, con permanganato de potasio y con tetraóxido de osmio, es importante en la interpretación correcta de los resultados. La microscopía electrónica tiene gran variedad de técnicas auxiliares que permiten abordar el análisis de problemas biológicos desde varios puntos de vista. En el presente trabajo se usó la microscopía electrónica de transmisión con dos técnicas de postfijación y técnicas citoquímicas para demostrar la actividad de la fosfatasa ácida y de la lipasa neutra. La lipasa (glicerol-éster-hidrolasa EC 3.1.1.3) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol. En estudios bioquímicos se ha demostrado que se encuentra en tejidos de plántulas de varias especies. Particularmente se ha investigado la lipólisis con gran detalle, en el endospermo de semillas en germinación de *Ricinus* (Ory et al.

1960, 1962 y 1968, Ory 1969, Muto y Beevers 1974). En este tejido también se ha obtenido la mayor parte de la información en la localización intracelular de la lipólisis, demostrándose que posee dos diferentes actividades de lipasa (Ory et al. 1968, Muto y Beevers 1974), una enzima capaz de hidrolizar triglicéridos, que es una lipasa ácida, con una actividad máxima a pH 5.0 y que se localiza en la fracción subcelular de esferosomas, y otra lipasa alcalina, con una actividad óptima a pH 9.0, la cual actúa solamente en ésteres monosustituidos del glicerol y se encontró en membranas de retículo endoplásmico y de glioxisomas. En 1967 Jacks et al. reportaron la presencia de actividad de lipasa en la fracción celular cruda de mitocondria y posteriormente en 1976 Schousbue demostró la asociación de actividad de lipasa con la fracción mitocondrial de levadura. Más recientemente Wang y Huang (1987) demostraron la biosíntesis de una lipasa neutra en el escutelo de maíz que se encontró asociada a la membrana de los esferosomas. A nivel celular se ha estudiado la movilización de las reservas lipídicas (Bergfeld et al. 1978, Wanner et al. 1982, Ciamporová 1983, Fernández y Staehelin 1987) y se había establecido que hay varias corrientes para interpretar la forma de hidrólisis de los lípidos, una de las cuales podría ser la transferencia de ácidos grasos a glioxisomas y otra, la vía de la membrana limitante del esferosoma (Trelease y Doman 1984), esta

última ha recibido apoyo y recientemente una modificación con los resultados del estudio de Fernández y Staehelin (1987).

La actividad de fosfatasa ácida o fosfohidrolasa monoester ortofosfórico (EC 3.1-3.2) está ampliamente distribuida en la naturaleza, desde bacterias hasta el hombre. En éste se descubrió la actividad en el plasma sanguíneo, eritrocitos, leucocitos, médula ósea, riñón, hígado y próstata. La actividad en este último órgano llega a ser hasta mil veces más que en los otros y purificada en una unidad de 84,000 a 109,000 D, aunque en otros tejidos, llegan a ser cuatro subunidades con diferentes niveles de actividad, de acuerdo a la asociación de las mismas. Actualmente se ha estudiado la actividad de fosfatasa ácida prácticamente en todos los tejidos (Hollander 1971).

En vegetales se estudió en plántulas de lupino, una fosfatasa ácida no específica, con una purificación de mil veces, que hidrolizó ésteres monofosfato y pirofosfato, con p-nitrofenilfosfato como sustrato. La actividad óptima fue entre pH 5.2 a 5.5 (Newmark y Wenger 1960). También se reportó una purificación de fosfatasa ácida de 300 veces, en hojas de tabaco, con una actividad óptima a pH 5.5 a 5.7 y una alta actividad en ribonucleósidos 2' y 5' monofosfatos y glucosa-1-P (Shaw 1966). Essner (1973) define la actividad de fosfatasa ácida (fosfomonoesterasas II) como un grupo de enzimas no específicas,

que hidrolizan una variedad de ésteres orgánicos con la liberación de iones fosfato. El pH óptimo varía de 4.5 a 6.0. En citoquímica es una reacción utilizada para la localización de lisosomas. Los primeros ensayos a nivel de microscopía electrónica fueron hechos por Sheldon et al. (1955), Holt y Hicks (1961), Essner y Novikoff (1961). En vegetales, entre los primeros reportes están los de Poux (1963).

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

### Material biológico

Se utilizaron semillas maduras y secas cosechadas en San Carlos Yautepec, Oax., México, mantenidas en su cápsula indehisciente hasta el momento de su utilización. Todas las semillas usadas en los diferentes ensayos fueron seleccionadas por flotación, desinfectadas superficialmente con hipoclorito de calcio al 2% durante 10 minutos y lavadas con agua destilada estéril cinco veces, durante 25 minutos, después se secaron con papel absorbente y se lijaron en la región calazal y por los lados; se enjuagaron nuevamente con agua estéril y se secaron.

### Pruebas de hidratación

Se realizaron las pruebas de hidratación en tres ensayos separados. En cada ensayo se utilizaron tres lotes de 10 semillas cada uno, se les determinó el peso inicial y se colocaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, con 10 ml de agua desionizada estéril. Se mantuvieron en una estufa a 26°C y se les determinó el peso cada hora, se eliminó el agua exterior con papel absorbente.

## **Pruebas de conductividad y lixiviación**

Se determinó la cinética de conductividad, a partir de semilla seca, en dos ensayos con tres lotes de 5 semillas cada uno, durante siete horas. Tres lotes de semillas se incubaron durante cuarenta y ocho horas y se determinó al final la conductividad del agua. De estas semillas se separaron las testas con endospermo y se incubaron durante una hora, midiendo cada cinco minutos la conductividad. El agua de incubación de los tres ensayos se liofilizó en cada caso, se diluyó con 1ml de agua desionizada y se tomaron alícuotas para determinar:

- a) carbohidratos totales por el método de la antrona
- b) proteínas por el método de Bradford
- c) aminoácidos libres, por el método de la ninhidrina
- d) aminoácidos libres, por analizador automático
- e) glucósidos kauranoicos en placa delgada
- f) taninos por el método de gelatina sal
- g) alcaloides con el reactivo de Dragendorff y en placa delgada
- h) resinas glicosídicas en placa delgada
- i) mucílago por precipitación con etanol

## **Microscopía fotónica y electrónica**

Se colocaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, diez grupos de 5 semillas cada uno, con papel absorbente y 5 ml de agua

destilada estéril. Se incubaron en una estufa a 26°C y oscuridad. A intervalos de: 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72 y 96 horas, se tomó una semilla y se le midió la longitud, la anchura y la radícula en caso de que ya hubiera emergido. Se cortó en cuatro cuartos longitudinales.

### Microscopía fotónica

Un cuarto de la semilla se fijó en FAA (formol-ácido acético-alcohol), se incluyó en parafina de acuerdo a la técnica de Johansen (1940). Se obtuvieron cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor y se procesaron para la reacción de APS (ácido peryódico-reactivo de Schiff) para localizar polisacáridos insolubles (Jensen 1962).

### Microscopía electrónica de transmisión

Un cuarto de la semilla se cortó en trocitos de 0.5 mm aproximadamente, los cuales se fijaron durante tres horas en glutaraldehído 3.0% más paraformaldehído 1.5% en amortiguador S-solidina 0.05 M pH 7.2 con sacarosa 0.06 M en frío (Mollenhauer y Totten 1971). Después se lavaron en el mismo amortiguador con tres cambios durante 3 horas a 7°C, se separaron en cuatro porciones y se procesaron como sigue:

**a) Extracción de lípidos y postfijación con OsO<sub>4</sub>**

Se deshidrataron con alcoholes graduales, etanol al 30, 50, 70 y 96%, con cambios de 20 minutos cada uno, dos cambios de etanol absoluto y dos de acetona, de 20 minutos cada uno y se colocaron en hexano, con un primer cambio de 1 hora y un segundo cambio de 13 horas. Después se trataron con acetona, etanol absoluto y alcoholes graduales de etanol 96, 70, 50 y 30%, con cambios de 20 minutos cada uno y se enjuagaron con agua destilada, posteriormente con amortiguador S-colidina y se postfijaron con OsO<sub>4</sub> al 2% en amortiguador S-colidina durante 1 hora 30 minutos. Se enjuagaron con el mismo amortiguador durante 30 minutos, con tres cambios. Se deshidrataron y se procesaron para su inclusión.

**b) Extracción de lípidos y postfijación con KMnO<sub>4</sub>**

Se siguió el mismo método de deshidratación hasta hexano y de rehidratación hasta agua destilada. Se postfijaron en KMnO<sub>4</sub> al 2% en agua destilada durante 15 minutos. Se enjuagaron con varios cambios de agua destilada hasta que ésta no tuviera color. Se deshidrataron y procesaron para su inclusión.

**c) Postfijación con OsO<sub>4</sub>**

Se colocaron en OsO<sub>4</sub> al 2% en amortiguador S-colidina durante 1 hora 30 minutos. Se enjuagaron con tres cambios de 10 minutos cada

uno en el mismo amortiguador. Se deshidrataron y procesaron para su inclusión.

#### d) Postfijación con $\text{KMnO}_4$

Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución acuosa de  $\text{KMnO}_4$  al 2% durante 15 minutos . Se lavaron con varios cambios de agua destilada hasta que no tuviera color. Se deshidrataron y procesaron para su inclusión.

#### Pruebas citoquímicas de alta resolución

Dos cuartos de la semilla se cortaron en trocitos de 0.5 mm aproximadamente y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 durante 3 horas, se lavaron en el mismo amortiguador con varios cambios durante 3 horas y se procedió a efectuar las pruebas citoquímicas de fosfatasa ácida (Barka y Anderson 1962) y de lipasa neutra (Gomori 1949), con sus respectivos testigos, carentes de substrato. Al final se deshidrataron y procesaron para su inclusión.

#### Inclusión en resina epóxica

Todas las muestras fueron deshidratadas con etanol, pasadas por dos cambios de óxido de propileno, de 20 minutos cada uno, preincluidas en resina epóxica Poly/Bed 812 con catalizador, en

mezclas con óxido de propileno en proporciones de 1:2, 1:1 y 2:1 y resina pura por varias horas. Se incluyeron y polimerizaron a 60°C durante 48 horas. Se efectuaron cortes finos en un ultramicrotomo Sorvall Poter Blum MT-2 con cuchilla de diamante, los cuales fueron colocados en rejillas de cobre cubiertas con Formvar. Se contrastaron con una solución de citrato de plomo al 0.3%, excepto los cortes de las pruebas citoquímicas. La observación se efectuó en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-9.

## R E S U L T A D O S

### Pruebas de hidratación, conductividad y lixiviación

Las semillas dejan de hidratarse en forma rápida a las 11 horas (gráfica 1). A partir de este momento la hidratación fue de 140 a 175 %, es decir, que las semillas pesaron aproximadamente 2.5 veces más que el peso inicial.

La conductividad del agua de imbibición de las 48 horas fue en promedio de 180  $\mu\text{mho/cm.g}$ . La cinética de conductividad mostró una salida de iones lenta durante las tres primeras horas, manteniéndose entre 10 y 20  $\mu\text{mho/cm.g}$ , a partir de las 4 horas y hasta las 7 horas, fin de la medición, el cambio en la conductividad fue más rápido, de 30 a 70  $\mu\text{mho/cm.g}$  (gráfica 2). La conductividad mostrada por las capas de aleurona aisladas después de 48 horas de imbibición de semillas enteras y colocadas en agua desionizada durante una hora, mostró una salida de solutos rápida durante los primeros 15 minutos con un cambio de 30 a 45  $\mu\text{mho/cm.g}$  y es lenta en los siguientes tiempos, registrándose 51  $\mu\text{mho/cm.g}$  a los 60 minutos.

La determinación de carbohidratos fue positiva, se cuantificaron 260  $\mu\text{M/ml}$  en el agua de semillas remojadas por 7 horas.

La ninhidrina dio reacción positiva y el analizador automático de

aminoácidos detectó indicios de un péptido.

La determinación de proteínas por el método de Bradford fue positiva, se cuantificaron 14  $\mu\text{g/ml}$  en el agua de imbibición de 48 horas y 52  $\mu\text{g/ml}$  en el agua de incubación de las capas de aleurona.

La determinación de glucósidos kauranoicos fue positiva, se encontraron la turbicorina y la corimbosina en cromatografía en placa delgada.

En el perfil cromatográfico para alcaloides se observan dos de los marcadores testigos: la amida del ácido lisérgico y la chanoclavina.

El perfil de resinas glicosídicas registra una mancha para el liofilizado, en tanto que en el del testigo (*Ipomoea murucoides*) se observan seis.

La prueba para mucílagos fue positiva, al obtenerse un precipitado.

La prueba para taninos resultó negativa.

#### Microscopía fotónica (Lámina I)

La reacción de APS (ácido peryódico-reactivo de Schiff), permitió seguir los cambios en la estructura del endospermo en forma general en la estructura de la semilla. Se observó que a las dieciocho horas de imbibición (Fig. 1) las células presentan en su

citoplasma escasas vacuolas (V) y pequeñas; la zona acelular de galactomanano (G) se nota compacta y fuertemente teñida. A las cuarenta y ocho horas, cuando la radícula tenía 3.0 mm de longitud, se empieza a notar menos compacta (Fig. 2); las células presentan más vacuolas (V), sobretodo las del segundo estrato, que tienen formas irregulares y son grandes. A las sesenta horas y una radícula de 1.3 cm de longitud (Fig. 3), en las células del primer estrato se observan grandes vacuolas (V), dobles o únicas y la región acelular se presenta más laxa. A las setenta y dos horas y una radícula de 1.6 cm de longitud (Fig.4), la región acelular ya no existía en las zonas laterales de la semilla y era muy escasa en el septo que se encuentra entre los cotiledones, la capa de aleurona muestra solamente paredes celulares y escasos restos celulares.

#### **Microscopía electrónica de transmisión**

Los cambios celulares a este nivel de observación, son evidentes desde la primera hora de imbibición. Para que la descripción de los mismos sea más precisa, se hará de acuerdo a las técnicas usadas:

## Postfijación con $KMnO_4$

Una hora (Lámina II, Figuras 5 a 7)

Las células presentan en la periferia del citoplasma, una banda angosta (flechas), muy electrodensa sin límites precisos, que en algunas células se ve fragmentada y en otras, se llegan a observar también pequeñas manchas electrodensas en la región central del citoplasma (flechas), limitadas por membrana. Las mitocondrias (M) en algunas zonas son abundantes, con escasas crestas cortas y poco electrodensas. Los plastos (Pl) son escasos y presentan uno o dos granos de almidón. El núcleo (N) de forma irregular, con un contenido homogéneo poco electrodenso, con nucleolos (nu) poco aparentes de aspecto compacto; la envoltura nuclear (en) en la mayoría de los núcleos aparece ondulada e interrumpida en algunas porciones. En relación a los cuerpos proteicos (cp), existen diferencias notables, de acuerdo al estrato que ocupe la célula; las células que quedan junto a la cutícula, presentan los cuerpos proteicos como vesículas grandes y pequeñas, de forma más o menos circular al corte, con un contenido homogéneo poco electrodenso; las células de la segunda capa, vecinas a la región del galactomanano, presentan los cuerpos proteicos como una o dos vesículas muy grandes de forma irregular y con un material más electrodenso en el centro. Los esferosomas no se observan como

zonas pequeñas, irregulares, electronclaras, como se aprecian en preparaciones de semilla seca (Laguna-Hernández et al. 1984).

Cuatro horas (Lámina III, Figura 10)

Sin cambio significativo respecto a la primera hora. La región electrodensa periférica del citoplasma es más angosta y junto a ella coinciden algunas zonas pequeñas electronclaras irregulares (flechas); la zona electrodensa se acentúa en las células de la segunda y tercera capas, en estas células los cuerpos proteicos (cp) son grandes vesículas rodeadas por angostas zonas de citoplasma, en algunas de éstas, en su región central, se encuentran cuerpos vesiculares y/o material fibrilar más electrodensos.

Ocho horas (Lámina III, Figura 11) -

En este momento, no se aprecia la zona electrodensa en forma de banda periférica en las células. Los esferosomas (Es) aparecen bien conservados con formas circulares y algunos irregulares, electronclaros, muy abundantes. Los cuerpos proteicos (cp) se presentan como vesículas de tamaño mediano, circulares e irregulares, muchas con cuerpos vesiculares o un material fibrilar electrodensos. El núcleo (N) presenta una forma irregular, su contenido homogéneo poco electrodensos, la envoltura nuclear

(en) bien definida, continua y con muchos poros.

Doce horas (Lámina IV, Figuras 12 a 14)

Las células se ven muy bien conservadas, con abundantes esferosomas (Es) pequeños, regulares circulares o irregulares, electroncleros, con una membrana bien delimitada. En algunas células se observa un sistema de retículo endoplásmico (Re) muy regular, con túbulos muy rectos conectados con los esferosomas (\*). En las células del segundo estrato el aspecto sigue similar a los tiempos anteriores. Se observan grandes vacuolas irregulares, con un contenido heterogéneo de densidad variable a los electrones. En este momento los núcleos (N) se observan de forma circular u ovoide, con un nucleolo (nu) pequeño, menos compacto y más electrondenso, la envoltura nuclear bien marcada, continua y con muchos poros, la cromatina se empieza a notar granular y electrondensa. Las mitocondrias se observan más electrondensas, con las crestas más largas. La pared celular de las células de la segunda capa, que queda en contacto con la región acelular o galactomanano, se observa laxa en algunas zonas.

Dieciseis horas (Lámina V, Figura 16)

El aspecto de las células en general es similar al de las doce horas, sólo que algunos núcleos (N) presentan uno o dos nucleolos

(nu) de aspecto granular y en algunos con una zona vacuolar, son electrodensos; la cromatina es homogénea o con zonas de heterocromatina (hc), la envoltura nuclear (en) está bien constituida, con poros (flechas) y heterocromatina (hc) adherida a la membrana interna de la misma. Las mitocondrias (M) son más electrodensas. Los esferosomas (Es) son más abundantes, circulares, pequeños. Los cuerpos proteicos (cp) contienen un material heterogéneo, fibrilar y granular.

Veinte horas (Lámina V, Figura 17)

Las células presentan menos esferosomas (Es) aunque la mayoría son grandes e irregulares. Las mitocondrias (M) presentan abundantes crestas, electrodensas, algunas mitocondrias se ven alargadas y con una constricción, dando el aspecto de bipartición (\*). El retículo endoplásmico (Re) es muy abundante, en forma de túbulos delgados, algunos ramificados. Tanto en las células del primero como del segundo estratos, se observan grandes vacuolas con contenido fibrilar electrodensos y en algunas hay cuerpos vesiculares electrodensos. La pared celular se ve íntegra en algunas zonas y en otras se ve laxa.

Veinticuatro horas (Lámina VI, Figuras 18 a 21)

Las células vecinas a la cutícula presentan abundantes esferosomas

(Es)de contornos regulares, circulares y pequeños. Los cuerpos proteicos (cp) son como vacuolas grandes, irregulares, poco electrondensos, con algunas zonas circulares claras que contienen un material electrondenso. En otras células se observan zonas de citoplasma como en proceso de invaginación a las vacuolas (\*). Las mitocondrias (M) se observan electrondensas y varias como en división (flecha). Continúa la organización del retículo endoplásmico (Re) y se empieza a observar los primeros dictiosomas (Di). Los núcleos (N) siguen con un aspecto homogéneo, con uno o dos nucleolos (nu) y de forma circular o elipsoidal. En las células del segundo estrato se encuentran algunos plastos (Pl) con un cuerpo muy electrondenso circular y hasta tres granos de almidón. Presentan una o dos vacuolas grandes irregulares. Las paredes celulares con zonas laxas más abundantes.

Treinta y treinta y seis horas (no ilustrado)

Los esferosomas presentan la membrana muy electrondensa y de bordes irregulares, dentados, su tamaño más bien es grande. El retículo endoplásmico es abundante, de forma tubular y en algunas zonas ramificado. Las mitocondrias son abundantes, de forma alargada o circulares y muy electrondensas. Los plastos son muy electrondensos, alargados como si estuvieran en división. Algunas vacuolas son irregulares con cuerpos vesiculares parecidos a

porciones de retículo endoplásmico, y en otras vacuolas se observa un precipitado electrondenso generalmente central. El núcleo es circular o alargado con la envoltura doble muy bien definida, con abundantes poros; no se observan zonas de heterocromatina y el nucleolo es grande con un aspecto granular y fibrilar. La pared celular tiene poco contraste y es laxa.

Cuarenta y ocho horas (Lámina VIII, Figura 26)

Las células vecinas a cutícula presentan un citoplasma con abundante retículo endoplásmico (Re), muy electrondenso. Se observan abundantes dictiosomas (Di) y mitocondrias (M) y plastos (Pl) muy electrondensos. Las vacuolas (cp) son muy grandes, irregulares, contienen cúmulos de pequeñas vesículas electrondensas (o). Los esferosomas (Es) son como espacios electronclaros, regulares en forma, circulares o elípticos, desde muy pequeños hasta grandes. Las paredes celulares (Pc) tienen zonas laxas más abundantes.

Sesenta horas (Lámina IX, Figuras 29 y 30)

En este momento muchas células vecinas a la cutícula están totalmente degradadas, permanecen restos de citoplasma y membrana celular (\*) como una banda muy delgada electrondensa, junto a la pared celular (Pc), la cual aparece sin contraste y muy laxa.

Algunas células aún no se degradan totalmente y presentan una o dos vacuolas (V) muy grandes que contienen algunos cuerpos electrodensos, algunos restos de mitocondrias y cuerpos electroncleros con su membrana electrodensa. En el citoplasma se observan algunos plastos alargados; esferosomas, como zonas electroncleras irregulares, de contornos electrodensos. Las mitocondrias son muy electrodensas, circulares y de mediano tamaño. Las células del segundo estrato están totalmente degradadas, vacías, las paredes celulares sin contraste, laxas y las láminas medias adelgazadas. En algunas células todavía se observó el núcleo (N), cuya envoltura nuclear (en) apareció con los espacios perinucleares ensanchados, dando el aspecto de vesículas o cisternas concatenadas. En una célula se localizó un fragmento de envoltura nuclear, que se reconoce por la presencia de varios poros.

Setenta y dos horas (Lámina XI, Figura 38)

Sólo se encuentran paredes celulares muy delgadas, que todavía mantienen la forma de la célula, ya que permanecen algunas fibras. Las paredes celulares del segundo estrato casi no se observan y la lámina media es muy delgada. Se empieza a observar hidrólisis de cutícula.

Noventa y seis horas (no ilustrada)

Las paredes celulares de la segunda capa se ven rotas, ya no se observa el límite celular, la cutícula se ve más hidrolizada.

Postfijación con OsO<sub>4</sub>

Debido a que los tejidos postfijados con osmio provienen de las mismas semillas que proporcionaron el material postfijado con permanganato de potasio, no se describirá detalladamente cada etapa como se hizo para la serie anterior y sólo se marcarán o destacarán detalles sobresalientes o diferentes a los observados con la otra técnica de postfijación.

Una y cuatro horas (Lámina III, Figuras 8 y 9)

En algunas células se observan los esferosomas (Es) muy grandes, como fusionados, pero en otras se aprecian bien conservados, como cuerpos de forma circular, pequeños, con un contenido homogéneo, difuso, electrondenso. El núcleo (N) presenta una forma irregular, con la envoltura nuclear (en) no contrastada, electronclara, como en tinción negativa, interrumpida en algunas zonas. Los cuerpos proteicos (cp) aparecen como vesículas de forma irregular con un contenido fibrilar electrondenso.

Ocho y doce horas (Lámina IV, Figura 15)

Prácticamente el mismo aspecto que en los momentos anteriores. Los esferosomas (Es) son pequeños y abundantes, electrondensos, difusos. Los cuerpos proteicos (cp) con un contenido fibrilar electrondenso. La envoltura nuclear (en) a las doce horas aparece electrondensa y algunos núcleos tienen forma alargada o elipsoidal (no ilustrada).

Veinticuatro horas (Lámina VII, Figuras 22 y 23)

Las células presentan núcleos (N) con dos nucleolos (nu) o con uno grande, con la zona granular y fibrilar distinguibles, la envoltura nuclear (en) bien definida, electrondensa. Los esferosomas son escasos y la mayoría grandes. Se aprecian algunos cuerpos electrondensos, circulares y pequeños, diferentes a los esferosomas. Dentro de las vacuolas de contenido fibrilar homogéneo, se encuentran cuerpos membranosos espiralados (m) (figuras mielínicas). Se observan abundantes ribosomas (r), algunos adheridos a membrana de retículo endoplásmico. Algunas paredes celulares son laxas. Las mitocondrias (M) presentan abundantes crestas, aunque poco electrondensas.

Treinta y seis horas (no ilustrada)

Las mitocondrias se ven alargadas, muy electrondensas. Los plastos

se alargan en uno de sus extremos y contienen una inclusión circular muy electrodensa en la región que permanece globosa, similar a la que se observa en la figura 28.

Cuarenta y ocho horas (Lámina VIII, Figuras 27 y 28)

Se observan abundantes esferosomas (Es) de mediano tamaño o muy pequeños, electrodensos, difusos. Los plastos (Pl) con forma de clava, hasta con tres granos de almidón y una inclusión electrodensa. En las células del segundo estrato se encuentran una o dos vacuolas muy grandes con cuerpos electrodensos semejantes a esferosomas y también cuerpos membranosos espiralados y algunos restos de mitocondrias. Las paredes celulares (Pc) son laxas.

Sesenta horas (Lámina X, Figuras 31 y 32)

Se observan abundantes plastos (Pl) muy electrodensos. En las células vecinas a la cutícula existen dos o tres vacuolas de mediano tamaño con un contenido electrodensito heterogéneo, algunas contienen cuerpos electrodensos circulares, semejantes a esferosomas. En las células del segundo estrato se aprecia una vacuola central (V) muy grande con abundantes cuerpos electrodensos, algunos esferosomas (Es) parece que penetran en ella (\*). La pared celular (Pc) de estas células, se observa muy

clara y laxa, pero con la forma original de la célula.

Setenta y dos horas (no ilustrada)

Todas las células están totalmente degradadas. Los restos de las paredes celulares mantienen la forma original de la célula, la estructura fibrilar es muy laxa; la lámina media muy delgada.

Extracción de lípidos con hexano (Lámina VII, Figuras 24 y 25; Lámina X, Figuras 33 y 34)

Las muestras extraídas con hexano y postfijadas con permanganato de potasio presentan los esferosomas electronclaros con una matriz fibrilar electrodensa en diferentes grados de abundancia. A las veinticuatro horas de imbibición en las células del segundo estrato de la capa de aleurona, se observan en la vecindad de los cuerpos proteicos (cp) (Fig. 24, flecha) zonas electronclaras con un contenido fibrilar electrodenso, semejante al de ellos. Estos presentan su límite muy bien definido, por una membrana electrodensa, con un contenido fibrilar-granular fino, electrodenso, con zonas claras (\*) irregulares o circulares que separan porciones del contenido de los cuerpos proteicos. Las mitocondrias (M) (Fig. 25) permanecen electrodensas, algunas con una zona central clara, pequeña. En los plastos permanece la inclusión circular electrodensa en la región globosa del mismo.

En las muestras postfijadas con tetraóxido de osmio el aspecto prácticamente es el mismo que en la serie anterior. Los esferosomas (Es) (Fig. 33 y 34) aparecen electronclaros con un material fibrilar reticulado muy fino, electrondenso. Las zonas internas de la vacuola, colindantes con el citoplasma, aparecen discontinuas (\*) en forma de delgadas proyecciones citoplásmicas y tienden a la forma ovoide. Los plastos (Pl) presentan forma de clava, es decir, con una región globosa y un extremo alargado, en la región globosa se observa un material granular-fibrilar, con una apariencia similar al citoplasma, las inclusiones circulares electrondensas continúan con el mismo aspecto. Las mitocondrias (M) aparecen electrondensas circulares o alargadas.

#### Citoquímica de alta resolución

##### Fosfatasa ácida (Lámina XII, Figuras 39 a 42)

La reacción fue positiva desde la primera hora de imbibición, se localiza en la membrana plasmática y en los cuerpos proteícos, también se encontró en la lámina media de todas las células del endospermo. Aunque en la primera hora de imbibición, se observó en el núcleo y en el citoplasma un precipitado, éste fue de gránulos muy pequeños, por lo que no se consideró como producto de la reacción enzimática. A las cuatro horas de imbibición la reacción

es parecida a la de una hora y a las ocho horas todavía se aprecia la reacción en los cuerpos proteicos y la lámina media, pero ya no se localiza en la membrana plasmática. A las dieciocho horas la reacción es positiva en los cuerpos proteicos, en la lámina media y en la pared celular. A las cuarenta y ocho horas la reacción es positiva en la lámina media, los cuerpos proteicos y las mitocondrias, en especial en sus crestas. En este momento el precipitado en la vacuola se encuentra desplazado a la periferia, la región central aparece electronclara. Los testigos no presentan ningún tipo de precipitados.

#### Lipasa neutra (Lámina XIII, Figuras 43 a 45)

La reacción de lipasa fue positiva desde las primeras horas de imbibición, se localizó en retículo endoplásmico ubicado entre los esferosomas o dentro de ellos y en la membrana de los cuerpos proteicos (flechas). A las cuarenta y ocho horas, cuando los esferosomas se introducen a las vacuolas derivadas de los cuerpos proteicos, el producto de la reacción se localiza dentro de los esferosomas electrodensos, en zonas electronclaras, limitadas por membrana, a la que se encuentra adherido el producto de la reacción. En estas muestras, la reacción en mitocondrias es evidente, el precipitado parece que se localiza en el espacio intermembranal. Los testigos no presentaron precipitado.

## D I S C U S I O N

La utilización de las dos técnicas de postfijación: con permanganato de potasio y con tetraóxido de osmio, permitió obtener información complementaria, importante en la interpretación de los sucesos que tuvieron lugar en las células del endospermo durante la germinación de las semillas; de igual forma fue el apoyo que dieron los resultados de las técnicas citoquímicas empleadas. De este modo, la presencia de la zona electrondensa que aparece en la periferia de las células, en las muestras procesadas con permanganato de potasio, a la hora y a las cuatro horas de imbibición, se interpreta como la fusión de los esferosomas, mezclados con proteínas, debido a que el permanganato de potasio es buen fijador de lipoproteínas pero no de grasas (Luft 1956), permite su flujo, coalescencia y mezcla. Esto se deduce, porque en las muestras de los mismos tiempos, postfijadas con tetraóxido de osmio, los esferosomas, en la mayoría de los casos, aparecen íntegros como zonas pequeñas circulares u ovoides, electrondensas, limitadas por membrana, distribuidos en la periferia y región central del citoplasma. Aún así, hubo células en las que se observaron zonas electrondensas largas de lípidos, lo que puede indicar la coalescencia de esferosomas. Esto fue más frecuente en las primeras etapas de la imbibición, posiblemente

por una organización molecular diferente de las membranas en el estado seco de la semilla, y que las primeras cuatro horas de imbibición no fueron suficientes para alcanzar la organización molecular normal de estado hidratado. Simon en 1974 y 1978 sugirió que cuando las semillas están deshidratadas, sus membranas celulares son incapaces de funcionar como barreras permeables selectivas, debido a que cambian de su configuración de bicapa de fosfolípidos a una configuración hexagonal o micelar. Seewaldt et al. en 1981, en un estudio de la organización de las membranas en semillas de soya durante la hidratación, reportan que sólo se detecta un espaciamiento mayor de la bicapa de fosfolípidos, cuando el nivel de deshidratación de las semillas, es por abajo del 12%, pero que no se pierde su estructura de bicapa. Lo anterior indica que en los sistemas celulares con escaso contenido de agua, la organización molecular cambia, respecto a los sistemas con un alto contenido de agua. Se ha propuesto que la membrana de los esferosomas está constituida por una monocapa de fosfolípidos, es decir, por la mitad de una membrana unitaria (Yatsu y Jacks 1972), por lo que debe ser menos inestable que una membrana unitaria. También el cambio en organización molecular, podría explicar la apariencia en tinción negativa que presenta la envoltura nuclear con la postfijación con tetraóxido de osmio, en las muestras de una y cuatro horas de imbibición, y que se

consignó también en las células de la semilla seca (Laguna-Hernández et al. 1984). Además, la envoltura nuclear no solamente presenta este aspecto, sino que se observa discontinua en ciertas regiones durante las primeras cuatro horas de imbibición, y alcanza su organización completa a partir de las ocho horas; este momento coincide con la hidratación de las semillas al 100%. A las dieciséis horas las células presentan un aspecto en su organización, que denota una actividad plena, como por ejemplo, el núcleo presenta su cromatina nítida en forma granular y electrondensa, la envoltura nuclear bien delimitada y con varios poros, los nucleolos con el aspecto granular fibrilar y vacuolado que marca la característica de actividad de síntesis de poliribonucleótidos. Es importante señalar, que es aproximadamente en este momento, cuando la hidratación de la semilla, respecto al aumento de peso, se empieza a estabilizar. La reacción positiva de fosfatasa ácida localizada en la membrana celular en las primeras horas de imbibición, podría estar marcando, la fusión de los lípidos con proteínas del tipo enzimas hidrolíticas de citoplasma y no la presencia de fosfatasa ácida de membrana, ya que no se observa actividad a las ocho horas y en tiempos posteriores. La abundancia de esferosomas en las células del endospermo de *T. corymbosa* en la semilla latente, permite pensar que los glicéridos almacenados en ellos, son una fuente fundamental de energía para

la semilla durante su latencia y de gran importancia en su germinación. Los cambios observados en los diferentes lapsos, en la abundancia de los esferosomas, marca una movilización intensa de los mismos, a partir de las veinticuatro horas y alcanza su punto máximo entre las cuarenta y ocho y las sesenta horas de imbibición, cuando se observa que existe una marcada movilización de los esferosomas hacia la o las vacuolas derivadas de los cuerpos proteicos, a las cuales se introducen en forma íntegra. Esta evidencia indica que los esferosomas se degradan dentro de la vacuola, ya que algunos de ellos se notan menos electrondensos o con zonas más claras y en otras muestras se observan también restos de membranas. Ciamporová en 1983, en un estudio de la movilización de las reservas lipídicas en primordios de raíz en tallo de *Populus niger* "chopo" muestra que los esferosomas se introducen en vacuolas en las que se encuentran restos de estructuras membranosas y esferosomas con espacios claros de diferente tamaño, por lo que propone que en esas vacuolas se degradan los esferosomas, aunque no explica el mecanismo; además de los que se degradan en el citoplasma. Esto último no fue observado en las muestras de nuestro estudio.

Fernández y Staehelin (1987) en un trabajo con células de aleurona de cebada y con la técnica de criofractura, observan que hay una íntima relación entre los esferosomas y los cuerpos proteicos, lo

que les indica que la monocapa de fosfolípidos que limita a los esferosomas, está directamente unida con la capa externa de la bicapa de fosfolípidos de la membrana que rodea a los cuerpos proteicos . De esto , ellos proponen que la actividad de lipasa localizada en los esferosomas después de un tratamiento con GA3 (giberelina) durante dos horas, en las células de aleurona de semillas embebidas durante cuatro días , se debe a la transferencia de la enzima , del cuerpo proteico al esferosoma; en este caso la actividad determinada fue la de lipasa neutra. Los resultados en *T. corymbosa* indican que la actividad de lipasa, también neutra ,en los esferosomas, está presente, solamente cuando éstos han penetrado a la vacuola derivada de los cuerpos proteicos, por lo que, se puede pensar que la enzima se encuentra en los cuerpos proteicos y solo tiene actividad cuando entra en contacto con los glicéridos del esferosoma, ya que en ninguno de los tiempos muestreados se observó actividad de lipasa en el interior de las vacuolas o cuerpos proteicos ni en los esferosomas, lo cual indicaría una alta especificidad de la lipasa por el sustrato. Por otra parte, el hecho de que los esferosomas no presenten la actividad de lipasa, sino hasta que tienen contacto con la vacuola, puede apoyar el modelo de transferencia de la enzima, del cuerpo proteico al esferosoma, propuesto por Fernández y Staehelin (1987), en el que establecen que la lipasa

se localiza incluida en la bicapa de la membrana del cuerpo proteico y que al ponerse en contacto con la membrana sencilla del esferosoma, la lipasa se transfiere a esa monocapa de fosfolípidos. Las imágenes mostradas en las figuras 32 y 45, indican zonas de degradación periféricas en los esferosomas, es decir, junto a su membrana, lo cual puede apoyar que la localización de la enzima es en la membrana. Lin et al. en 1983 demostraron que en el escutelo de plántulas de maíz, la actividad de lipasa neutra aumenta con el desarrollo, y se localiza fuertemente unida a los esferosomas y permanece en la membrana de ellos, después de la extracción de los glicéridos. Además, los cuerpos lipídicos aislados sufren autólisis de los triacilgliceroles internos, que produce una liberación de ácidos grasos. Esta enzima tiene una actividad óptima a pH 7.5 y solamente en acilgliceroles de ácido oleico o linoleico, que son los constituyentes principales del aceite de maíz. También Lin et al. (1982) en un estudio sobre lipasa en cotiledones de soya, durante la germinación, descubren que existe una lipasa neutra en esferosomas, que pudo hidrolizar solamente monolinoleína y N-metilindoxilmiristato y disminuyó rápidamente su actividad en las primeras etapas de crecimiento de las plántulas (tres días). Estos resultados refuerza la observación de que la localización de la enzima, es membranal y que es altamente específica. En

nuestro estudio, se observó en algunas células, actividad de lipasa en la membrana de los cuerpos proteicos, en la primera hora de imbibición (Fig. 43), lo que puede significar un apoyo a los hallazgos de Fernández y Staehelin (1987). La marca de actividad de lipasa en mitocondrias, parece estar localizada en el espacio intermembranal, lo cual, plantearía la posibilidad de que la enzima se localice en la membrana externa y que la hidrólisis de glicéridos ocurra en este sitio, lo que facilitaría el paso de ácidos grasos al interior de la mitocondria, para su degradación por beta-oxidación. Aunque Allmann et al en 1966 realizaron un estudio encaminado a localizar el sistema oxidante de ácidos grasos, en mitocondrias de corazón de res y, demostraron que las enzimas que activan a los ácidos grasos, la aciltransferasa y las enzimas de la beta-oxidación, se localizan exclusivamente en la membrana externa de la mitocondria, así como el sistema de carnitina; discuten en este trabajo sus resultados comparándolos con los de Yates y Garland (1966), quienes proponen que los ácidos grasos son convertidos a ésteres de acil-CoA por una ATP-tiocinasa, localizada en el lado externo de la membrana interna de la mitocondria. Cualquiera que fuera el resultado aceptable, la hidrólisis del ester glicérido, tendría que darse en la membrana externa, por lo que con la prueba citoquímica puede ocurrir precipitación de producto en el espacio intermembranal con

la reacción de lipasa neutra. Este hallazgo, podría apoyar además, la posibilidad de que las mitocondrias estén utilizando ácidos grasos como fuente importante para la producción de ATP, ya que el aumento en la electrondensidad de las mismas se debe probablemente a un incremento en el contenido de proteínas, puesto que en las muestras extraídas con hexano y postfijadas con permanganato de potasio, la electrondensidad en ellas no cambia. Nieuwdorp y Buys (1964) describen cambios en las mitocondrias de células de escutelo de cebada durante la germinación, que coinciden con los observados en *T. corymbosa*, pero no proponen ninguna causa.

La presencia de arreglos membranales en forma espiral, semejando figuras mielínicas, dentro de los cuerpos proteicos o vacuolas, indica una actividad de degradación de materiales, transformando la vacuola en una vacuola autofágica. Matile (1978) menciona que el englobamiento de material citoplásmico por la invaginación del tonoplasto, produce la formación de vesículas intravacuolares, que contienen una porción de citoplasma, la cual, al ser degradada deja como restos, esos arreglos membranales; ésto se muestra también en un estudio por Ciamporová (1983). Por otra parte, desde 1968 Yatsu y Jacks reportan que en cotiledones de semillas secas de algodón, se presenta actividad de fosfatasa ácida y proteinasa ácida, asociada a los granos de aleurona (cuerpos proteicos) in situ y cuando fueron aislados por centrifugación en glicerol puro,

presentaron un 77% de actividad de fosfatasa ácida y 100% de actividad de proteinasa ácida, por lo que se puede considerar a los cuerpos proteicos como organelos autolíticos. En 1970 Yoo, considera que la vacuolización de los cuerpos proteicos, observada en embrión de chícharo durante la germinación, se puede interpretar como la digestión y utilización de proteínas almacenadas y ya que su membrana limitante permanece intacta, las enzimas hidrolíticas se localizarían dentro de ellas, se considerarían autolíticos y actuarían como lisosomas. Wilden et al (1980) demuestran la presencia de varias hidrolasas en los cuerpos proteicos de cotiledon de haba, entre la que se encuentra la fosfatasa ácida; en este mismo artículo se reporta, que observaciones al microscopio electrónico de transmisión, de tejido de plántulas al tercer día de germinación, mostraron la presencia dentro de los cuerpos proteicos de pequeñas vesículas (0.3 a 1.0 um) que contenían porciones de citoplasma como: membranas, ribosomas, mitocondrias, y que al final del crecimiento de la plántula, esas vesículas aparecen vacías, por lo que proponen, que son vesículas autofágicas, cuyo contenido es degradado por las hidrolasas presentes en los cuerpos proteicos. La presencia de actividad de fosfatasa ácida, demostrada desde las primeras horas de imbibición, en los cuerpos proteicos o vacuolas, en las células de aleurona de *T. corymbosa*, comprueba la presencia en ellos de

enzimas hidrolíticas, permaneciendo hasta las etapas finales de la germinación, cuando en las células solo existe una gran vacuola, en este caso, con la evidencia de que entre las sesenta y las setenta y dos horas de inbibición, las células se degradan totalmente, se podría apoyar que las vacuolas formadas por los cuerpos proteicos son vacuolas autofágicas, ya que presentan restos de material citoplásmico como: mitocondrias, retículo endoplásmico, plastos, esferosomas, en diferentes etapas de degradación y restos membranosos en forma de figuras mielínicas; sin embargo, la reacción de fosfatasa ácida positiva, comprueba que la capacidad de hidrólisis en los cuerpos proteicos se encuentra desde el inicio del proceso de la germinación o desde que la semilla entra en latencia. Ory y Henningsen (1969) reportan la presencia de fosfatasa ácida en granos de aleurona de cebada; en las muestras analizadas de células de aleurona de semillas latentes de cebada y en la fracción purificada de cuerpos proteicos, observan un material altamente electrondenso asociado a los cuerpos proteicos, que a grandes aumentos, se distingue constituido por láminas con un alto contraste, alternadas, con espacios electronclaros, similar a la disposición que toman las capas de mielina en la célula animal; en su interpretación, se refieren a la de Jennings et al (1963), quienes proponen que el mismo arreglo se debe a la presencia de lipoproteínas en los

cuerpos proteicos de trigo, o también a la posibilidad de que pudiera ser la forma de almacenamiento del ácido fítico. En el caso de las células del endospermo de *T. corymbosa*, los arreglos membranales en forma de figuras mielínicas, sólo se observan dentro de los cuerpos proteicos o vacuolas y como productos o restos de la degradación de material citoplásmico, muy diferentes al arreglo del material descrito en esos trabajos; aunque el aspecto de ese material altamente electrodensito a bajos aumentos, es similar al material electrodensito en forma de banda o manchas irregulares, observado en las muestras de las primeras horas de imbibición, postfijadas con permanganato de potasio, la diferencia en este caso es la postfijación, que en los otros estudios fue con tetraóxido de osmio; pero son coincidentes en que se puede tratar de lipoproteínas. Jelsema et al (1980) describen cuerpos laminares fuertemente osmiofílicos, localizados junto a los esferosomas y a los cuerpos proteicos en las células de aleurona de trigo con doce horas de imbibición y en las mismas estructuras, aisladas por centrifugación; por la característica de la densidad de la fracción en la que se encontraron los cuerpos laminares, proponen, que semejan dictiosomas y por lo tanto, pueden ser derivados de retículo endoplásmico, o que éste se forme a partir de los cuerpos laminares. En el caso de la banda o manchas electrodensas irregulares de las células de aleurona de *T. corymbosa*, durante

las primeras horas de imbibición, ya se argumentó la posibilidad de que corresponda a lipoproteínas.

El cambio observado en los plastos en relación a su alargamiento, al aumento de granos de almidón y a la aparición del material electrodensito, puede significar un aumento en su actividad de síntesis de almidón y de lipoproteínas, como una respuesta a la necesidad de energía de las células.

El hecho de que el endospermo acelular se note con una estructura laxa, a partir de las ocho horas de imbibición (Fig. 36) y la pared celular de la última capa de aleurona en contacto con la región acelular, sea laxa a las veinticuatro horas de imbibición (Fig. 37), puede significar una simple dilución y difusión de los polisacáridos no celulósicos, o la hidrólisis de estos a carbohidratos más sencillos (monosacáridos), lo cual, podría estar apoyado por la reacción positiva a carbohidratos en el agua de imbibición; sin embargo, en el agua de imbibición de semillas que permanecieron sesenta horas, se formó un material de consistencia de malvavisco o algodón de azúcar, al liofilizarlo, que al disolverlo en agua y efectuarle la prueba con etanol, precipitó, lo que demostró su naturaleza de mucílago; esto podría indicar que el endospermo acelular, se difunde en forma de mucílago y permanece en el medio.

Quedaría por comprobar, cuanto de estos polisacáridos se hidroliza

a monosacáridos y en qué momento. Estudios realizados con semillas que también presentan en su endospermo galactomanano, como las de algunas leguminosas (Reid 1971, Reid y Meier 1972, 1973; Rijven 1972; Reid y Davies 1977) plantean que la capa de aleurona produce enzimas hidrolasas de galactomananos. Bewley et al (1983) demostraron en semillas de lechuga, que las paredes celulares del endospermo, constituidas por hemicelulosas, fueron degradadas por las enzimas endo-beta-mananasa, manosidasa y alfa-galactosidasa, y en 1986 proponen un modelo que explica el posible papel de estas enzimas (Ouellette y Bewley 1986). Es probable que por la similitud en la organización y naturaleza del endospermo de *T. corymbosa*, con esas semillas, la movilización del galactomanano durante la germinación ocurra en forma parecida. Por otra parte, la presencia de glucósidos kauranoicos en el agua de imbibición de las semillas, plantea la posibilidad de que se encuentren en el endospermo acelular y que interaccionen con el embrión como precursores de giberelinas (Osuna et al 1987), ya que se ha demostrado que el macerado de semillas de *T. corymbosa*, en diferentes etapas de imbibición, contiene mayor concentración de derivados de los glucósidos turbicorina y corimbosina, conforme avanza el tiempo de imbibición, así como también aumenta la actividad hidrolítica para los mismos (Perezamador et al 1981). Como estos estudios fueron realizados con la semilla completa,

sería conveniente separar el embión del endospermo y efectuar las determinaciones por separado, para discernir si los glucósidos se encuentran en el endospermo o en el embrión, así como las enzimas que los hidrolizan. Los ensayos preliminares en este sentido, parecen indicar que los glucósidos kauranoicos se localizan en gran concentración en el endospermo y que no son hidrolizados por éste en sesenta horas de imbibición y que los cotiledones sí tienen la capacidad de hidrolizarlos.

De acuerdo a todo lo anteriormente expuesto se propone que los cambios ultraestructurales observados en las células de aleurona, demuestran una actividad de síntesis de proteínas y de secreción, importantes, muchas de las cuales, deben corresponder a enzimas hidrolizantes de carbohidratos, ya que otras, específicas para proteínas y lípidos, deben estar presentes en los cuerpos proteicos o vacuolas autolíticas. Que la fuente de energía y carbono fundamental en esta actividad, se obtiene de los glicéridos almacenados en los esferosomas. Que los carbohidratos hidrolizados deben servir como fuente de energía y de carbono al embrión, el cual también recibe la acción de los glucósidos kauranoicos, presentes en el agua de imbibición, los que probablemente participen como precursores de reguladores de crecimiento. La naturaleza de mucílago del endospermo acelular, debe representar para la semilla un sistema adecuado para el

control de la cantidad óptima de agua, para la actividad de las células de aleurona y del embrión, durante las primeras horas del proceso.

Brechú et al (1984) en un estudio con microscopía fotónica, muestran que el endospermo de la semilla de *T. corymbosa* empieza a movilizarse a partir de las sesenta horas de germinación, tomando como el principio de ésta, la emergencia de la radícula y que llega al máximo de degradación en las sesenta horas siguientes. En el análisis con microscopía electrónica, objeto del presente trabajo, se observa que los cambios en el endospermo acelular se notan desde las ocho horas de imbibición y que a las setenta y dos horas, ya había desaparecido. Esto significa, que corresponde aproximadamente a la mitad del tiempo establecido en el trabajo anterior. Así también, se muestran aspectos nuevos en la estructura celular, durante el proceso, que permiten plantear hipótesis acerca de su función.

Es necesario considerar, que los resultados de este trabajo, deben relacionarse con el estudio bioquímico de algunas etapas del proceso y con el análisis de los cambios ocurridos en el embrión, a nivel subcelular y bioquímico durante las mismas etapas estudiadas en esta investigación. Así mismo, queda establecido que, abordar un fenómeno biológico desde diferentes aspectos de análisis o con diferentes técnicas de observación, puede producir

resultados complementarios, que ayudan a integrar el conocimiento del fenómeno, de manera más precisa.

## CONCLUSIONES :

- I. Las células del endospermo de la semilla de *Turbina corymbosa*, presentan una organización óptima en sus sistemas membranales y en las estructuras nucleares, para las funciones planteadas, a partir de las dieciseis horas de imbibición.
- II. La actividad hidrolítica en el endospermo empieza a notarse a partir de las veinticuatro horas de imbibición.
- III. La hidrólisis total del endospermo ocurre a las setenta y dos horas de imbibición.
- IV. Los lípidos contenidos en los esferosomas parecen ser la fuente de energía más importante durante todo el proceso estudiado.
- V. Los lípidos son degradados en su propio compartimento (esferosomas), dentro de vacuolas autolíticas.
- VI. Las mitocondrias participan en forma muy importante en el proceso, probablemente en su función de producción de energía a partir de la beta-oxidación de los ácidos grasos.

VII. La síntesis de proteínas, probablemente enzimas, debe ocurrir, a partir de las dieciseis horas de imbibición.

VIII. Los cuerpos proteicos funcionan como vacuolas hidrolíticas desde el inicio del proceso.

IX. La degradación del endospermo se completa cuando la longitud de la radícula apenas es de 15 mm y el resto de la plántula se encuentra dentro de la testa.

X. El endospermo de la semilla de *Turbina corymbosa*, puede estar participando como fuente de energía, carbono y nitrógeno para el embrión, como captador y regulador de agua para la germinación y como fuente de reguladores del crecimiento.

## L I T E R A T U R A      C I T A D A

Allmann, D.W., Galzigna, L., McCaman, R.E. y Green, D.E. 1966. The Membrane Systems of the Mitochondrion IV. The Localization of the Fatty Acid Oxidizing System. Arch Biochem Biophys 117: 413-422.

Austin, F.D. 1975. Convolvulaceae. En Flora de Panamá. Part. IV Ann Missouri Bot Gard 62: 157-224 Woodson, E.R. y Schery, W.R. Eds.

Baillon, M.H. 1886. Dictionnaire de Botanique. II. Librairie Hachette et C. París pp. 692-696.

Barrera, M.A., Barrera, V.A. y López, F.R.M. 1976. Nomenclatura Etnobotánica Maya. Una interpretación taxonómica. Instituto Nacional de Antropología e Historia, S.E.P. Centro Regional del Sureste 36. Colección científica. Etnología. pp. 181 y 297. México.

Barka, T. y Anderson, P J. 1962. Histochemical Methods for Acid Phosphatase Using Hexazonium Pararosnilin as Coupler. J Histochem Cytochem 10: 741-753

Bergfeld, R., Hong, Y.N., Kuhn, T. y Schopfer, P. 1978. Formation of oleosomes (storage lipid bodies) during embryogenesis and their breakdown during seedling development in cotyledons of *Sinapis alba* L. Planta 143: 297-307.

Bewley, J.D. y Black, M. 1982. Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. I, II. Springer-Verlag. Berlin

Heidelberg, New York.

Bewley, J.D., Leung, D.W.M. y Ouellette, F.B. 1983. The cooperative role of endo-beta-mannanase, beta-mannosidase and alfa-galactosidase in the mobilization of endosperm cell wall hemicelluloses of germinated lettuce seeds. En: Recent Advances in Phytochemistry V. 17: Mobilization of Reserves in Germination. pp. 137-152. Nozzolillo, C., Lea, P.J. y Loewus, F.A. Eds. Plenum, New York.

Brechú-Franco, A.E. 1980. Identificación del galactomanano en la semilla de *Turbina corymbosa* y observación de los cambios en el endospermo durante la germinación. Tesis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Brechú-Franco, A.E., Márquez-Guzmán, J. y Laguna-Hernández, G. 1984. Cambios en el edospermo durante la germinación de la semilla de *Turbina corymbosa* (L.) Raf. Convolvulaceae. *Phyton* 44: 95-100.

Breindenbach, R.W., Khan, A.A. y Beevers, H. 1968. Characterization of Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* 43:705-713

Brooks, C.A. y Mitchell, C.A. 1988. Effect of Salicylhydroxamic Acid on Endosperm Strength and Embryo Growth of *Lactuca sativa* L. cv. Waldmann's Green Seeds. *Plant Physiol* 86: 826-829.

Čiamporová, M. 1983. An Ultrastructural Study of Reserve Lipid Mobilization in Stem Root Primordia of Poplar. *New Phytol* 95: 19-29.

Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. Columbia University Press pp 895-898.

Díaz, J.L. 1979. Ethnopharmacology and Taxonomy of Mexican Psychodysleptic Plants. J Psy Drugs 11: 71-101.

Eb, A.A. Van Der y Nieuwdorp, P.J. 1967. Electron Microscopic Structure of the Aleurone Cells of Barley during Germination. Acta Bot Neerl 15: 690-699.

Essner, E. 1973. Phosphatases. En: Electron Microscopy of Enzymes Principles and Methods I. Hayat, M.A. Eds. pp.44-76. Van Nostrand Reinhold Co. New York London.

Essner, E. y Novikoff, A.B. 1961. Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol 9: 773-784.

Fernández, D.E. y Staehelin, L.A. 1987. Does Gibberelic Acid induce the transfer of Lipase from protein bodies to lipid bodies in Barley Aleurone Cells? Plant Physiol 85: 487-496.

Font Quer, P. 1953. Diccionario de Botánica. Ed. Labor, S. A. pp 519

Gomori, G. 1949. Histochemical localization of true lipase. Proc Soc Exp Biol Med 72: 697-700.

- Gregerson, E. L. y Taiz, L. 1985. The effect of abscisic acid on the ultrastructure of barley aleurone cells. *Bot Gaz* 146: 1-5.
- Hallam, N. D., Roberts, B. E. y Osborne, D. J. 1972. Embryogenesis and germination in Rye (*Secale cereale* L.) II. Biochemical and fine structural changes during germination. *Planta* 105: 293-309.
- Hanson, J. B., Vatter, A. E., Fisher, M. E. y Bils, R. F. 1959. The development of mitochondria in the scutellum of germinating corn. *Agron J* 51: 295-301.
- Hofmann, A. y Tschertter, A. 1960. Isolierung von Lysersaure-Alkaloiden aus der mexikanischen Zauberdroge Ololiuqui (*Rivea corymbosa* (L.) Hall. f.) *Experientia* 16
- Hofmann, A. 1963. The active principles of the seed of *Rivea corymbosa* and *Ipomoea violacea* *Bot Mus Leaf Harvard University* 20: 194-212.
- Hollander, V. P. 1971. Acid Phosphatases. En: *The Enzymes*. Boyer, P. D. ed. IV 3ed. Academic Press. New York pp 449-498.
- Holt, S. J. y Hicks, R. M. 1961. The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 47-66.
- Horner, H. T., Jr. y Arnott, H. J. 1966. A histochemical and ultrastructural study of pre and post-germinated *Yucca* seeds.

Jacobsen, J. V., Pressman, E. y Pyliotis, N. A. 1976. Gibberelin-induced separation of cells in isolated endosperm. *Planta (Berl)* 129: 113-122.

Jacobsen, J. V. y Pressman, E. 1979. A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L) seed with emphasis on endosperm breakdown. *Planta* 144: 241-248.

Jacobsen, J. V., Higgins, T. J. V. y Zwar, J. A. 1979. Hormonal control of endosperm function during germination. En: *The Plant Seed: Development, Preservation and Germination*. Rubenstein, I., Phillips, R. L., Green, C. E. y Gengenbach, B. G. eds. Academic Press pp 241-262.

Jacks, T. J., Yatsu, L. Y. y Altschul, A. M. 1967...Isolation and characterization of Peanut spherosomes. *Plant Physiol* 42: 585-597.

Jann, R. C. y Amen, R. D. 1977. What is germination? En: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Khan, A. A. Ed North-Holland Publishing Co pp7-28 Amsterdam New Yor Oxford.

Jelsema, C. L., Powell, M. J., Morr , D. J., Ruddat, M. y Mollenhauer, H. H. 1980. Isolation of lamellar bodies from aleurone layers of wheat grains. *Bot Gaz* 141: 139-148.

Jennings, A. C., Morton, R. K. y Palk, B. A. 1963. *Cytological*

- studies of protein bodies of developing wheat endosperm. Australian J Biol Sci 16: 366-374.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. Principles and Practice. W. H. Freeman and Company. San Francisco and London pp 175-198.
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. Mc Graw Hill, Book Company, Inc. New York and London pp 3-154.
- Jones, R. L. 1969a. Gibberelic acid and the fine structure of barley aleurone cells. I. Changes during the lag-phase of amylase synthesis. Planta (Berl) 87: 119-133.
- Jones, R. L. 1969b. Gibberelic acid and the fine structure of barley aleurone cells. II. Changes during the synthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase. Planta (Berl) 88: 73-86.
- Jones, R. L. y Price, J. M. 1970. Gibberelic acid and the fine structure of barley aleurone cells. III. Vacuolization of the aleurone cell during the phase of ribonuclease release. Planta (Berl) 94: 191-202.
- Jones, R. L. 1974. The structure of the Lettuce Endosperm. Planta (Berl) 121: 133-146.
- Khan, A. A. 1982. The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination. Elsevier Biomedical Press Amsterdam. New York Oxford.

Kornerup, A. y Wanscher, J. H. 1978. Methuen Handbook of Colour 3ed. Eyre Methuen, London.

Kozłowski, T. T. 1972. Seed Biology I y II. Academic Press New York London.

Laguna-Hernández, G., Márquez-Guzmán, J. y Engleman, E. M. 1984. Ultrastructure of the aleurone cells of mature seeds of *Turbina corymbosa* (Convolvulaceae). J Pl Anat Morph I: 39-44.

Lin, Y. H., Moreau, R. A., Huang, A. H. C. 1982. Involvement of glyoxisomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of Soybean seedlings. Plant Physiol 70: 108-112.

Lin, Y. H., Wimer, L. T., Huang, A. H. C. 1983. Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. Plant Physiol 73: 460-463.

Luft, J. H. 1956. Permanganate - A new fixative for electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol 2: 799-801.

McCleary, B. V., Matheson, N. K. y Small, D. M. 1976. Galactomannans and galactoglucomannan in legume seed endosperms: structural requirements for  $\beta$ -mannanase hydrolysis. Phytochemistry 15: 1111-1117.

McCleary, B. V. 1983. Enzymatic interaction in the hydrolysis of galactomannans in germinating guar: the role of exo- $\beta$ -mannanase. Phytochemistry 22: 649-658.

McCleary, B. V. y Matheson, N. K. 1983. Action patterns and substrate binding requirements of  $\beta$ -mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. Carbohyd Res 119: 191-219.

McClendon, J. H., Nolan, W. G. y Wenzler, H. L. 1976. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonolobus*: Leguminosae). Amer J Bot 63 (6): 790-797.

Márquez-Guzmán, J. y Laguna-Hernández, G. 1982. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corymbosa* (L) Raf Convolvulaceae. Phytion 42: 1-8.

Márquez-Guzmán, J. 1986. Anatomía e histoquímica del desarrollo de la semilla de *Turbina corymbosa* (L) Raf Convolvulaceae. Tesis doctoral (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Matile, Ph. 1978. Biochemistry an function of vacuoles. Ann Rev Plant Physiol 29: 193-213.

Meier, H. y Reid, J. S. G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. En: Encyclopedia of Plant Physiology, N. S. vol 13A: Plant carbohydrates I pp 418-471. Loewus, F. A., Tanner, W. eds. Springer, Berlin Heidelberg, New York.

Mollenhauer, H. H. y Totten, C. 1971. Studies on Seeds. I.

Fixation of seeds. J Cell Biol 48: 387-394.

Muto, S. y Beevers, H. 1974. Lipase activities in Castor Bean endosperm during germination. Plant Physiol 54: 23-28.

Nieuwdorp, P. J. y Buys, M. C. 1964. Electron microscopic structure of the epithelial cells of the scutellum of barley. II. Cytology of the cells during germination. Acta Bot Neerl 13: 559-565.

Newmark, M. Z. y Wenger, B. S. 1960. Preparation and some properties of an acid phosphatase from white Lupine seedlings. Arch Biochem Biophys 89: 110-117.

Nozzolillo, C., Lea, P. J. y Loewus, F. A. eds. 1983. Recent Advances in Phytochemistry vol 17. Mobilization of Reserves in Germination. Plenum Press New York London.

Ory, R. L., St. Angelo, A. J. y Altschul, A. M. 1960. Castor bean lipase: action on its endogenous substrate. J Lipid Res 1: 208-213.

Ory, R. L., St. Angelo, A. J. S. y Altschul, A. M. 1962. The acid lipase of the Castor bean properties and substrate specificity. J Lipid Res 3: 99-105.

Ory, R. L., Yatsu, L. Y. y Kircher, H. W. 1968. Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. Arch Biochem Biophys 264: 255-264.

- Ory, R. L. 1969. Acid lipase of Castor bean. *Lipids* 4: 177-185.
- Ory, R. L. y Henningsen, K. W. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. *Plant Physiol* 44: 1488-1498.
- Osmond, H. 1955. Ololiuhqui: The Ancient Aztec Narcotic. *J Ment Sci* 101: 526-537.
- Osuna Fernández M., Aguilar Castillo R., González Esquinca A., Pérez Amador M. C. y García Jiménez F. 1987. Los glucósidos kauranoicos de *Turbina corymbosa* (L) Raf como precursores de giberelinas en sus semillas. *Phyton* 47: 47-51.
- Ouellette, B. F. F. y Bewley, J. D. 1986. Beta-mannoside mannohydrolase and the mobilization of the endosperm cell wall of lettuce seeds cv Grand Rapids. *Planta* 169: 333-338.
- Perezamador, M. C. y Herran, J. 1960. Turbicoryn, a new glycoside obtained from the seeds of a sacred plant. *Tetrahedron Letters* 7: 30-32.
- Perezamador, M. C., García Jiménez, F., Herran, J. y Flores, S. E. 1964. Structure of Turbicoryn, a new glycoside from *Turbina corymbosa*. *Tetrahedron* 20: 2999-3009.
- Perezamador, M. C., Márquez-Guzmán, J., Laguna-Hernández, G. y García Jiménez, F. 1981. Hidrólisis enzimática de la turbicorina y la corimbosina en las semillas de *Turbina corymbosa*. *Phyton* 40

(2): 195-201.

Poux, N. 1963. Localisation des phosphates et de la phosphatase acide dans les cellules des embryons de Blé (*Triticum vulgare* Vill) lors de la germination. Jour Microsc 2: 557-568.

Reid, J. S. G. 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L (Leguminosae). Planta (Berl) 100: 131-142.

Reid, J. S. G. y Meier, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germinating seeds of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L ) Crimson Clover (*Trifolium incarnatum* L) and Lucerne (*Medicago sativa* L). A correlative biochemical and ultrastructural study. Planta (Berl) 106: 44-60.

Reid, J. S. G. y Meier, H. 1973. Enzymic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L Leguminosae). Secretion of  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -mannosidase by the aleurone layer. Planta (Berl) 112: 301-308.

Reid, J. S. G. y Davies, C. 1977. Endo- $\beta$ -mannanase, the leguminous aleurone layer and the storage galactomannan in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. Planta (Berl) 133: 219-222.

Rijven A. H. G. C. 1972. Control of the activity of the aleurone layer of Fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L. Acta Bot Neerl

21: 381-386.

Rost, T. L. 1972. The ultrastructure and physiology of protein bodies and lipids from hydrated dormant and non-dormant embryos of *Setaria lutescens* (Graminae). Amer J Bot 59: 607-616.

Sakai-Wada, A. y Nakata, M. 1987. Effect of gibberellic acid on the ultrastructure and  $\alpha$ -amylase activity of aleurone cells of *Avena sativa* L Plant Cell Physiol 28 (8): 1465-1476.

Schousboe, I. 1976. Triacylglycerol lipase activity in Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Biochim. Biophys Acta 424: 366-375.

Schultes, R. E. y Hofmann, A. 1979. Plants of the Gods: Origins of hallucinogenic use. Mc Graw Hill. Book Company (UK) Limited, Maidenhead, Inglaterra. Versión española por Alberto Blanco. Fondo de Cultura Económica, México. 1982.

Seewaldt, V., Priestley, D. A., Feigenson, G. W. y Goodsaid-Zalduondo, F. 1981. Membrane organization in Soybean seeds during hydration. Planta 152: 19-23.

Shaw, J. G. 1966. Acid phosphatase from Tobacco leaves. Arch Biochem Biophys 117: 1-9.

Sheldom, H. Zetterquist, H. y Branders, D. 1955. Histochemical reactions for electron microscopy: acid phosphatase. Exp Cell Res 9: 592

- Simon, E. W. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol* 73: 377-420.
- Simon, E. W. 1978. Membranes in dry and Imbibing seeds. En: *Dry Biological Systems*. Crowe, J. H. y Clegg, J. S. Eds. Academic Press New York pp 205-224.
- Srivastava, L. M. y Paulson, R. E. 1968. The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. II. Changes during germination. *Can J Bot* 46: 1447-1453.
- Standley, P. C. y Williams, L. O. 1970. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany Vol 24 part IX pp83* Field Museum of Natural History.
- Thomas, J., Kugrens, P. y Ross, C. W. 1980. Cytological and biochemical aspects of cytokinin-enhanced growth of Radish (*Raphanus sativus*) cotyledons. *Amer J Bot* 67: 456-464.
- Trelease, R. N. y Doman, D. C. 1984. Lipid Mobilization. En: *Seed Physiology II. Germination and Reserve Mobilization*. Murray, D. R. Ed. Academic Press.
- Vigil, E. L. y Ruddat, M. 1973. Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum in Barley aleurone cells. *Plant Physiol* 51: 549-558.
- Wang, S. M. y Huang, A. H. C. 1987. Biosynthesis of lipase in the scutellum of Maize kernel. *J Biol Chem* 262: 2270-2274.

Wanner, G., Vigil, E. L. y Theimer, R. R. 1982. Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark grown watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) seedlings. *Planta* 156: 314-325.

Wasson, R. G. 1963. Notes on the present status of ololiuhqui and other hallucinogens of Mexico. *Bot Mus Leaf Harvard University* 20: 161-193.

Wilden Van Der, W., Herman, E. M., Chrispeels, M. J. 1980. Protein bodies of Mung Bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 428-432.

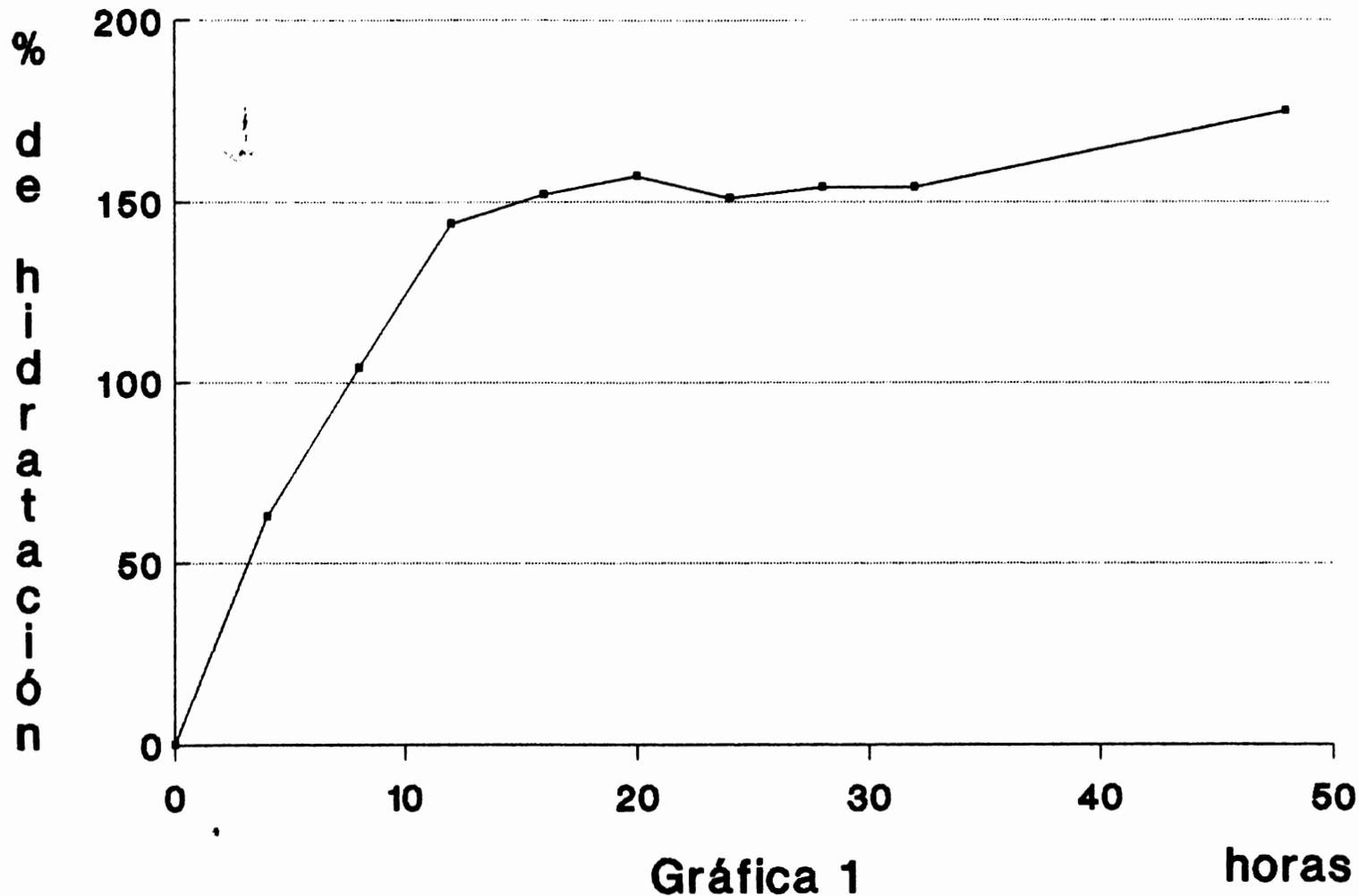
Yates, D. y Garland, P. 1966. The partial latency and intramitochondrial distribution of Carnitine-palmitoyltransferase (E.C. 2.3.1.-) and the CoASH and Carnitine permeable space of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 23: 460-465.

Yatsu, L. Y., Jacks, T. J. 1968. Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds. *Arch Biochem Biophys* 124: 466-471.

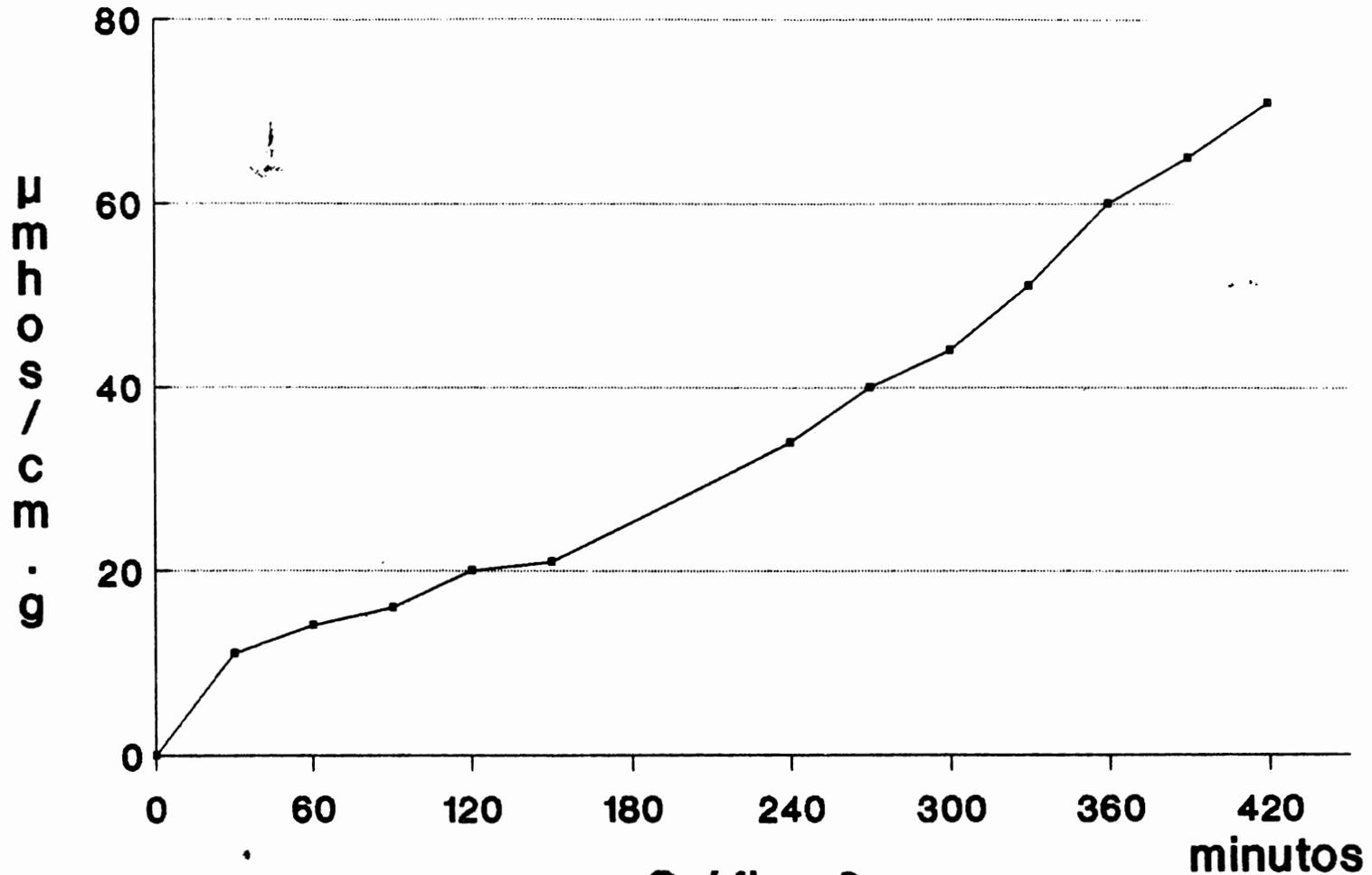
Yatsu, L. Y. y Jacks, T. J. 1972. Spherosomes membranes: half unit-membranes. *Plant Physiol* 49: 937-943.

Yoo, B. Y. 1970. Ultrastructural changes in cells of Pea embryo radicles during germination. *J Cell Biol* 45: 158-171.

# Hidratación de semillas de *Turbina corymbosa*



# CONDUCTIVIDAD EN EL AGUA DE IMBIBICION DE SEMILLAS DE *T. corymbosa*



Gráfica 2

## L A M I N A I

Microscopía fotónica. Acido peryódico-reactivo de Schiff y Hematoxilina.

Fig. 1 Semilla a las dieciocho horas de imbibición.

Las células de aleurona (A) presentan su citoplasma compacto, con escasos espacios claros pequeños, correspondientes a vacuolas. La region acelular del endospermo (G) se ve compacta y muy tejida, en íntimo contacto con el cotiledón (Co). 1700x

Fig. 2 Semilla a las cuarenta y ocho horas de imbibición.

Las células de aleurona (A) presentan en su citoplasma más espacios claros irregulares de tamaño mayor, que corresponden a las vacuolas (V), sobretodo, en las del segundo estrato. La región acelular del endospermo (G) se presenta menos compacta, más clara. 1100x

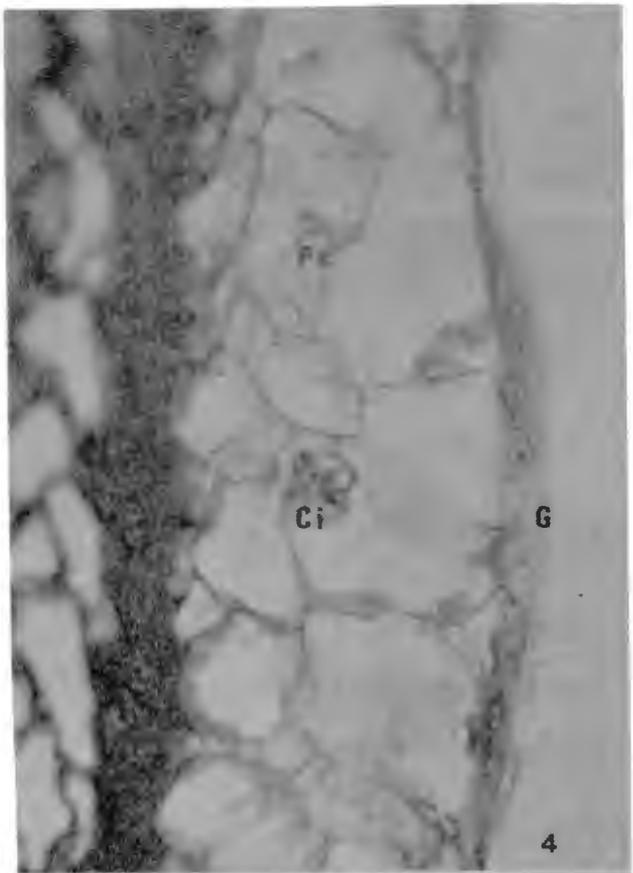
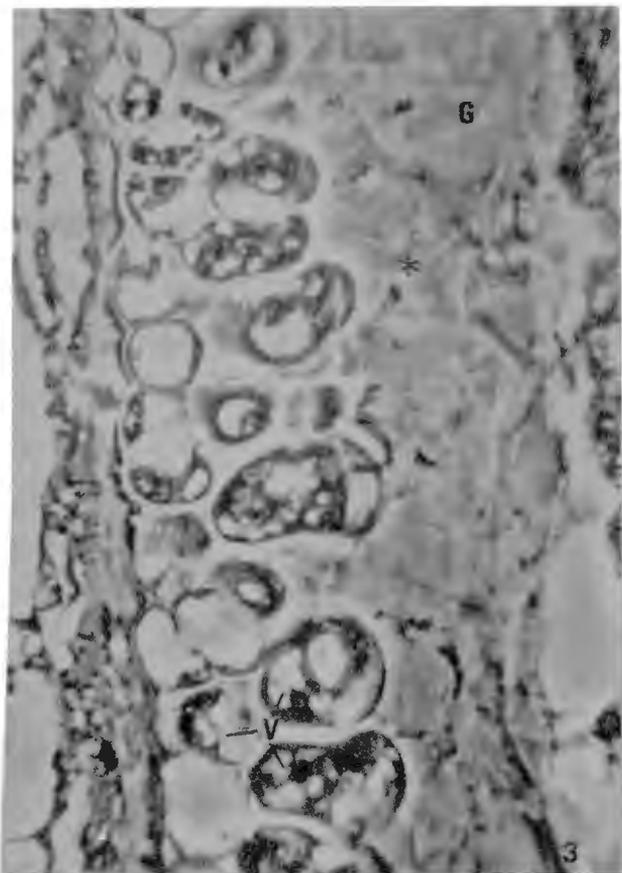
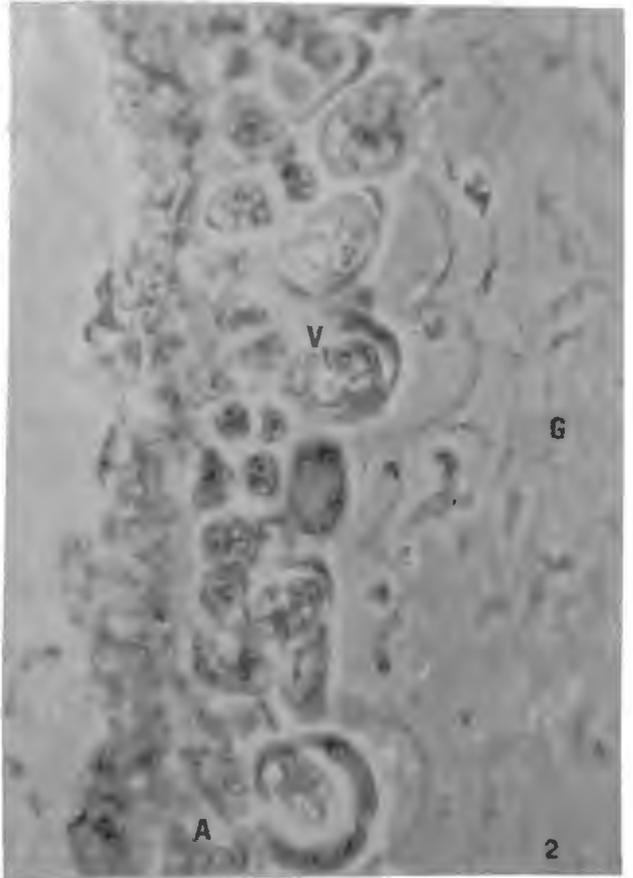
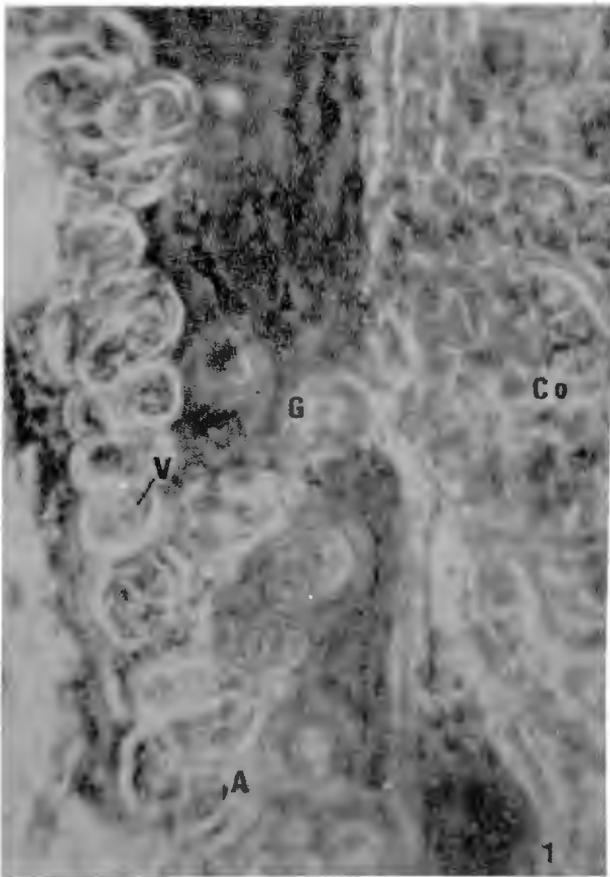
Fig. 3 Semilla a las sesenta horas de imbibición.

Las células de aleurona presentan vacuolas (V) muy grandes, el volumen celular aumenta. La región acelular del endospermo (G) presenta zonas laxas (\*). 1100x

Fig. 4 Semilla a las setenta y dos horas de imbibición.

Región del septo. Paredes celulares (Pc), algunos restos celulares (Ci) y restos de región acelular (G). 720x

L A M I N A I



## L A M I N A II

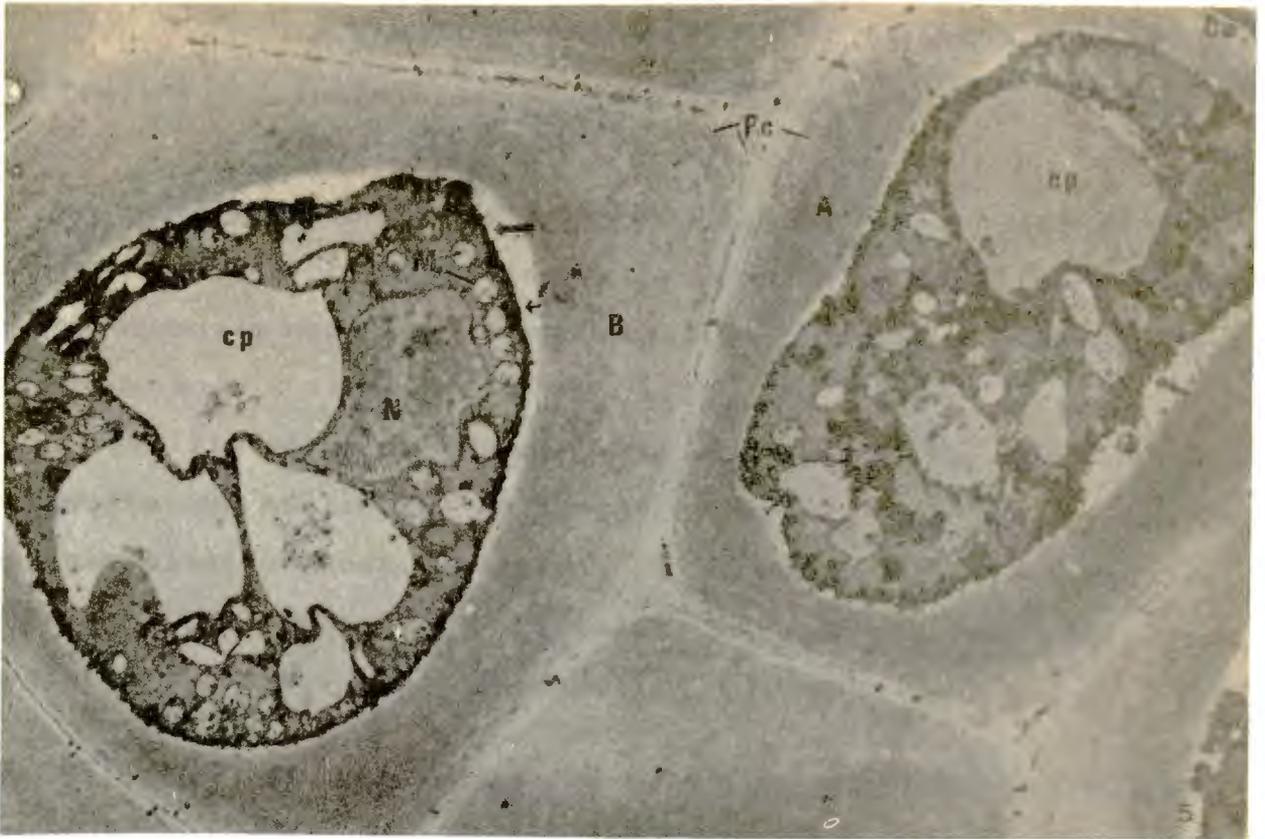
Postfijación con permanganato de potasio. (Figuras 5 a 7)  
Una hora de imbibición.

Fig. 5 Células del primero (A) y del segundo (B) estratos de la capa de aleurona. Se observa: un material muy electrondenso en forma de banda periférica (flechas) o de pequeñas zonas irregulares en la región central del citoplasma (flechas); los cuerpos proteicos (cp) en forma de vesículas irregulares, algunos con un material electrondenso; las mitocondrias (M) circulares, con escasas crestas poco electrondensas; el núcleo (N) con la cromatina poco electrondensa, difusa; las paredes celulares (Pc) con una organización fibrilar uniforme y compacta; la cutícula (Cu) con forma de banda angosta, muy electrondensa, que separa el endospermo de la testa. 5200x

Fig. 6 Célula del segundo estrato, que presenta: un núcleo (N) con su cromatina difusa y clara, con dos nucleolos (nu) poco electrondensos y compactos, con la envoltura nuclear (en) ondulada, interrumpida en algunas zonas (\*); la banda electrondensa (flechas); mitocondrias (M) y cuerpos proteicos (cp). 12500x

Fig. 7 Célula del segundo estrato en la que se observa: una porción del citoplasma que contiene un plasto (Pl) poco electrondenso, de aspecto granular, con dos porciones ovoideas más claras; mitocondrias (M) circulares, poco electrondensas, con escasas crestas; zonas pequeñas, irregulares, electrondensas (flechas), limitadas por membrana. 24600x

L A M I N A    I I



### L A M I N A    I I I

Postfijación con tetraóxido de osmio (Figuras 8 y 9).

Fig. 8 Semilla embebida una hora. Célula del primer estrato. Se observan: cuerpos proteicos (cp) con un material fibrilar-granular electrodensos, homogéneo; esferosomas (Es) pequeños, circulares, electrodensos.    12000x

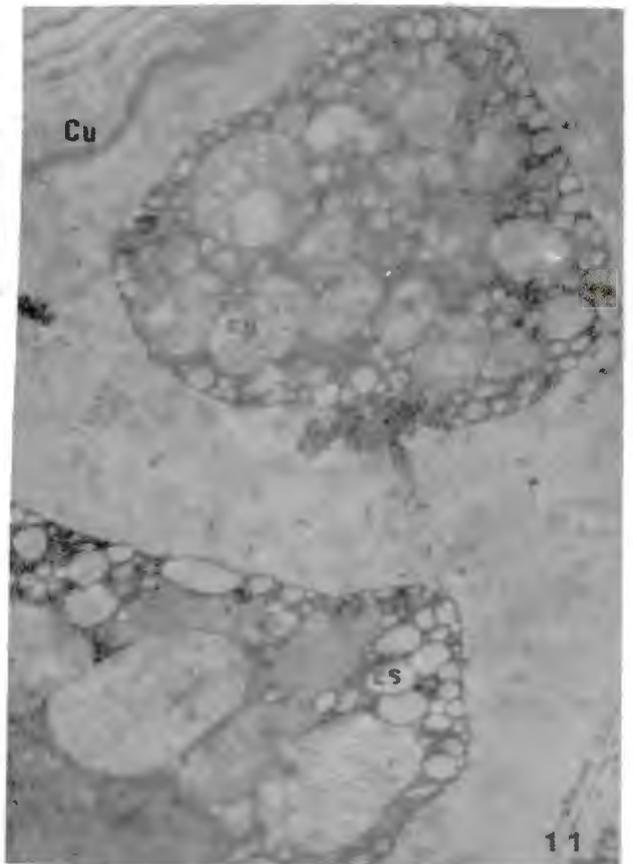
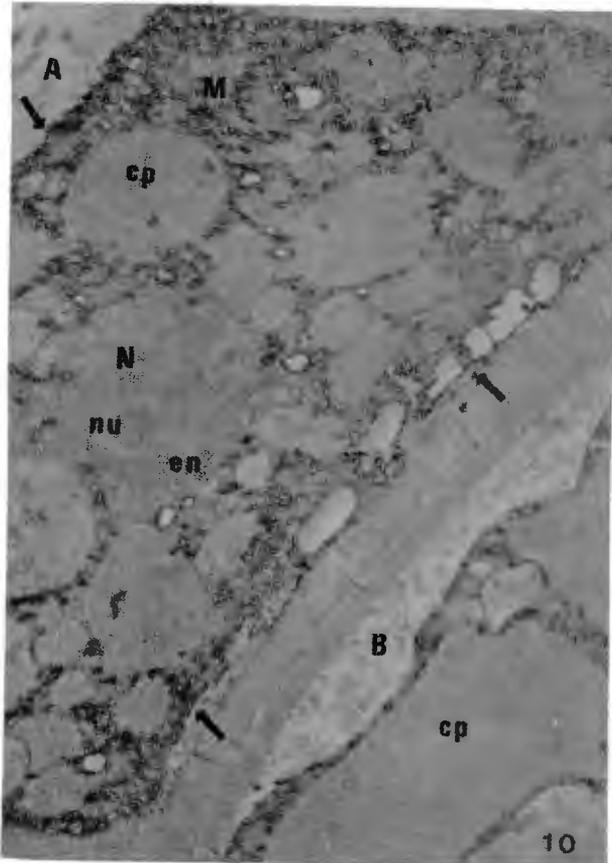
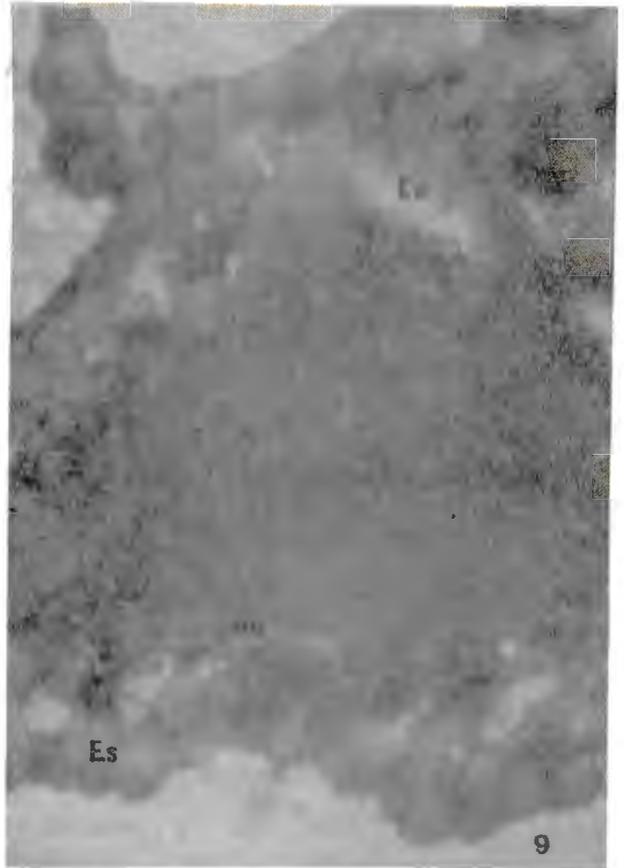
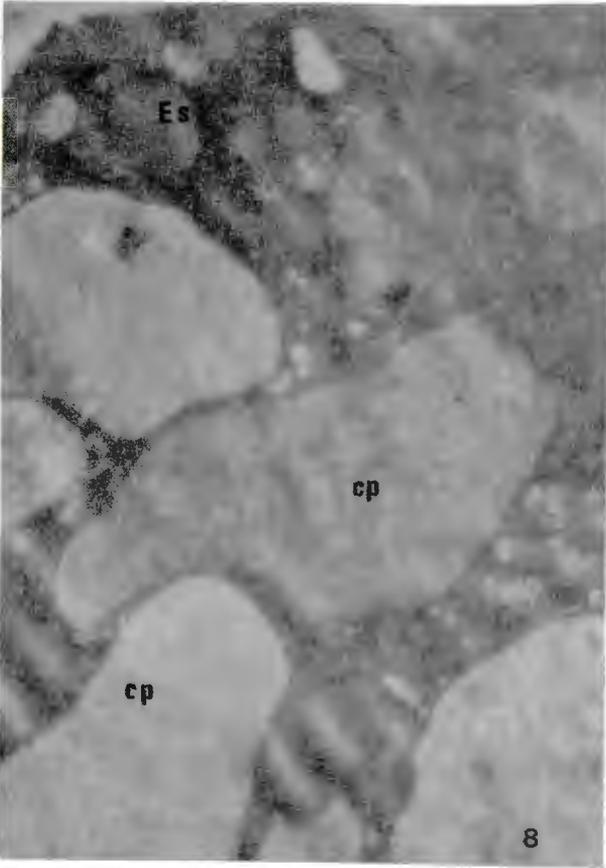
Fig. 9 Semilla embebida cuatro horas. Célula del primer estrato que muestra: un núcleo (N) de forma irregular, con la cromatina homogénea electrodensa, la envoltura nuclear (en) electronclara, como en tinción negativa, ondulada; los esferosomas (Es) son circulares o elipsoidales, pequeños.    13700x

Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 10 y 11)

Fig.10 Semilla embebida cuatro horas. Células del primero (A) y del segundo (B) estratos de la capa de aleurona, que muestran: una zona electrodensa, periférica angosta o porciones pequeñas irregulares en la región central del citoplasma, que coinciden con zonas electronclaras pequeñas (flechas); cuerpos proteicos (cp) circulares o irregulares de tamaño variable; núcleo (N), con su envoltura nuclear (en) ondulada y un nucleolo (nu) de bordes irregulares, compacto y difuso; algunas mitocondrias (M) pequeñas circulares.    4900x

Fig. 11 Semilla embebida ocho horas. Células del primer estrato en las que se observa: la cutícula (Cu) electrodensa; la fusión de cuerpos proteicos (cp) pequeños, contorneados, con un material fibrilar electrodensos; los esferosomas (Es) aparecen como zonas electronclaras, circulares, pequeñas.    5300x

L A M I N A      I I I



## L A M I N A    I V

Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 12 a 14)

Postfijación con tetraóxido de osmio (Figura 15)

Doce horas de imbibición

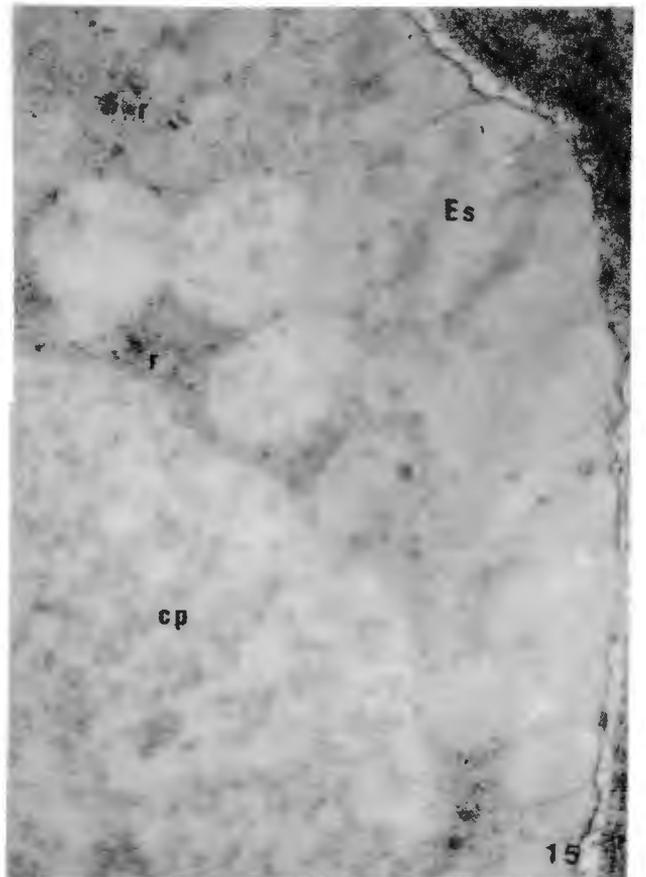
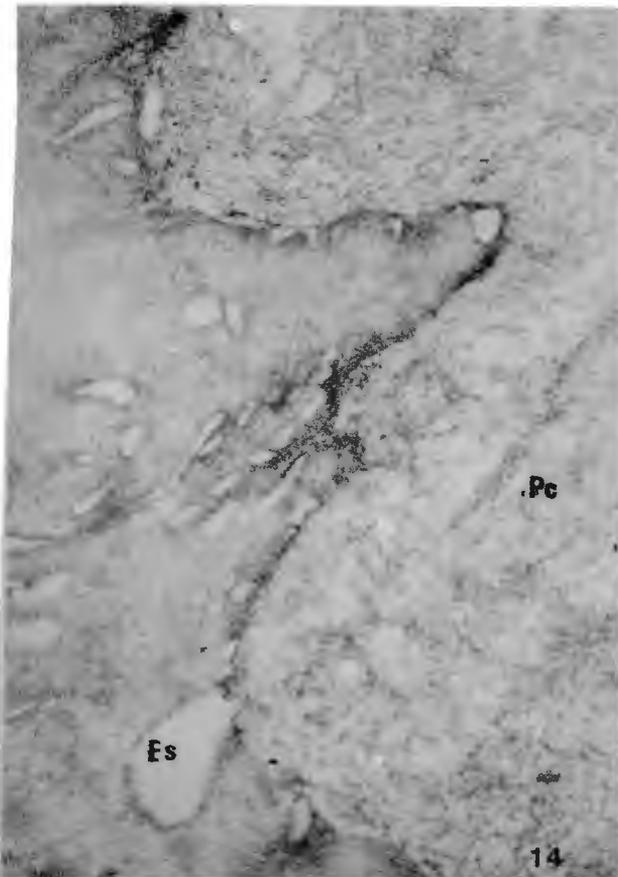
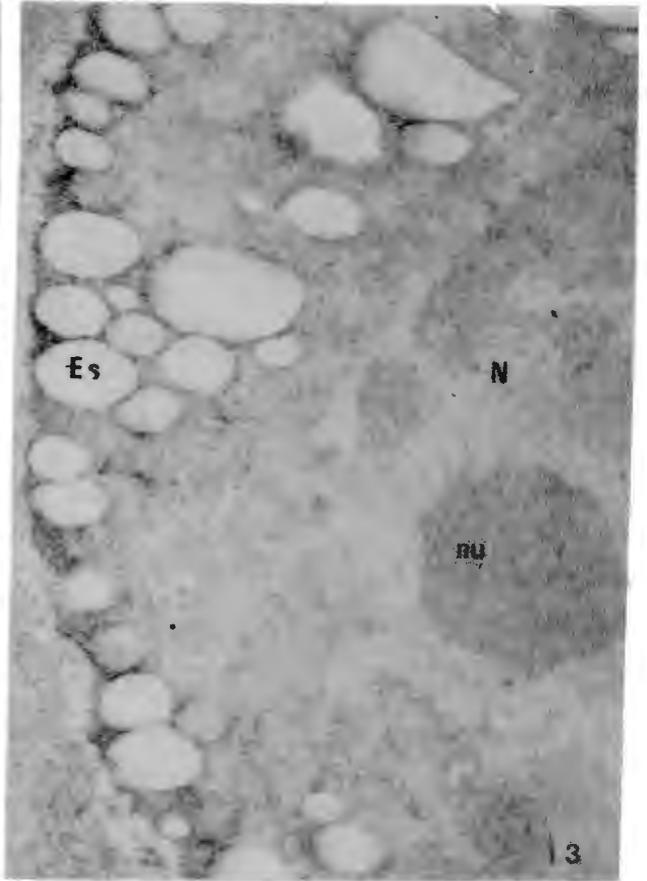
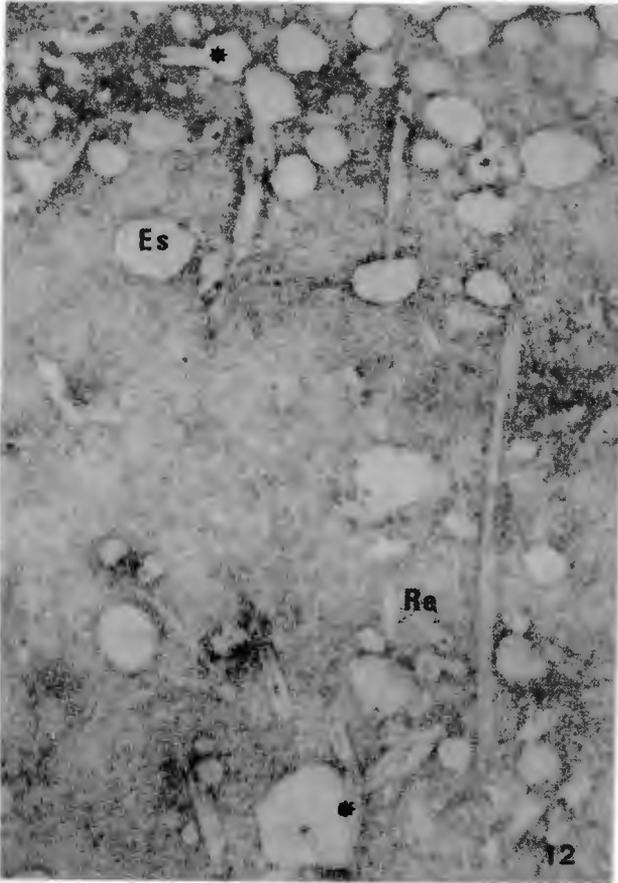
Fig. 12 Célula del primer estrato en la que se observa: los esferosomas (Es) como zonas electronclaras pequeñas, circulares o irregulares; retículo endoplásmico (Re) de forma tubular, conectado con algunos esferosomas (\*)  
22500x

Fig. 13 Célula del primer estrato que muestra: un núcleo (N) con la cromatina granular electrodensa y un nucleolo (nu) granular, electrodensa, poco compacto; los esferosomas (Es) en su mayoría de forma circular, pequeños, electronclaros.        22500x

Fig 14 Célula del segundo estrato, en la que se observa: la región terminal de la célula vecina a la región acelular del endospermo; los esferosomas (Es) como zonas electronclaras irregulares; la pared celular (Pc) con zonas laxas. 22500x

Fig. 15 Célula del primer estrato que muestra: un cuerpo proteico (cp) con un contenido fibrilar electrodensa; poliribosomas (r) y esferosomas (Es) circulares u ovoides, electrodensos, difusos.        26400x

L A M I N A    I V



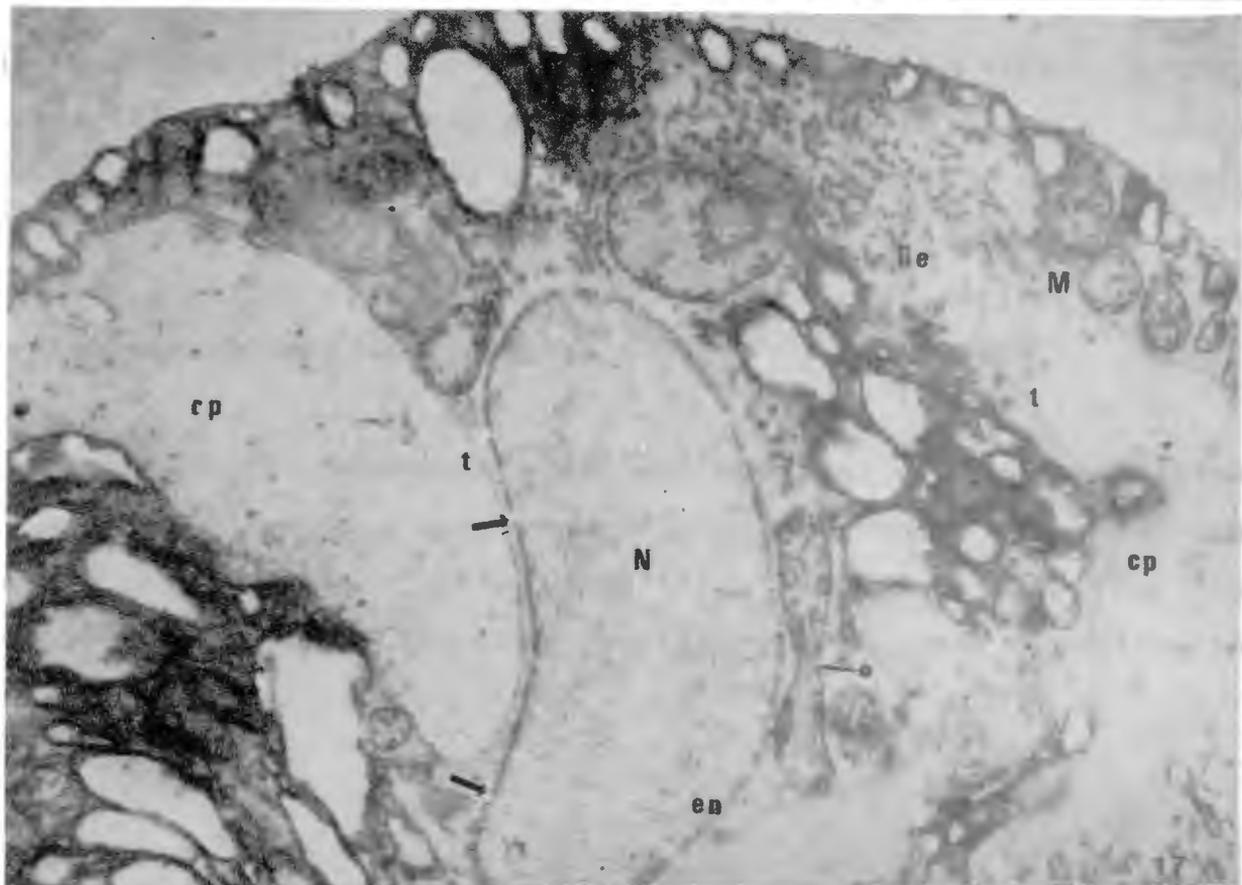
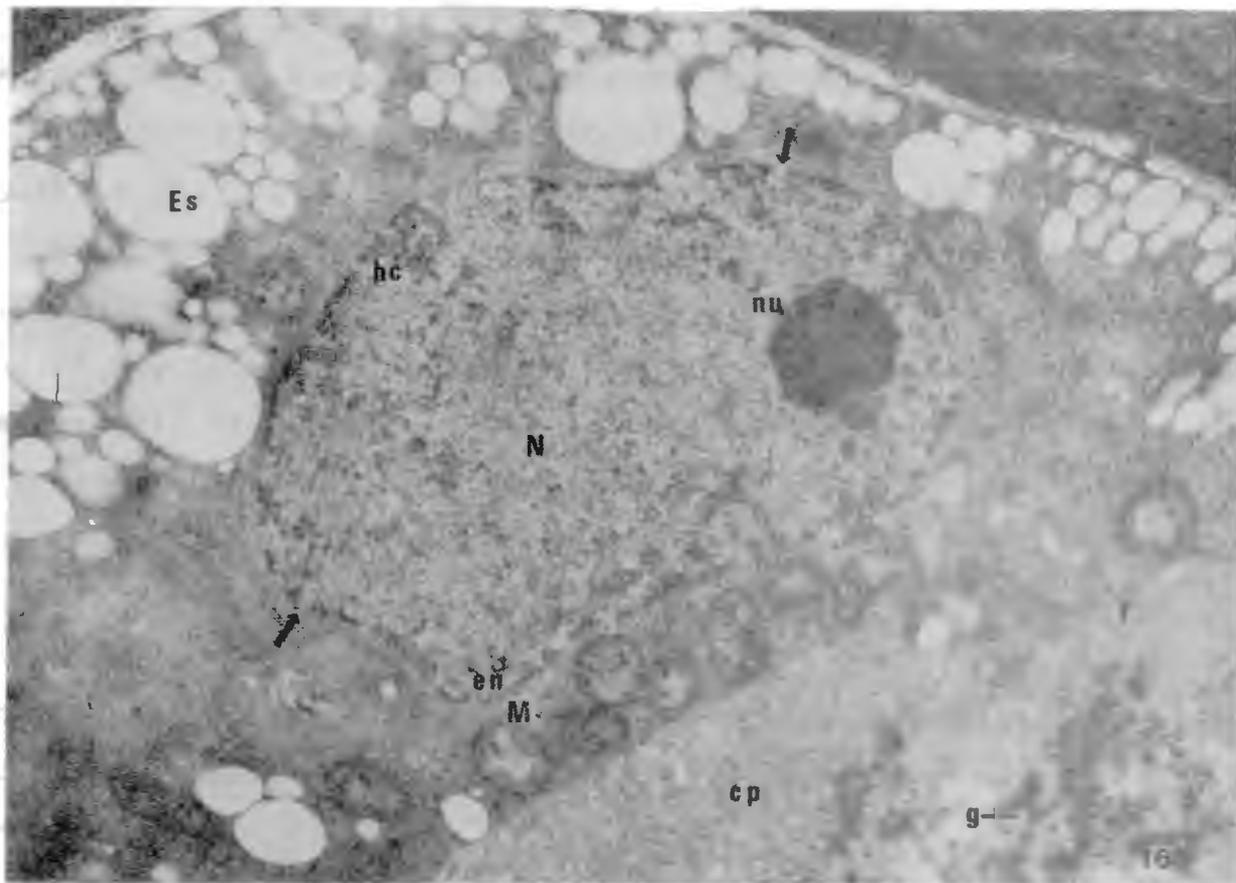
## L A M I N A V

Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 16 y 17)

Fig. 16 Semilla con dieciseis horas de imbibición. Célula del segundo estrato. Se observa: el núcleo (N) con zonas bien definidas de heterocromatina (hc) y la envoltura nuclear (en) con poros (flechas), un nucleolo (nu) granular laxo; los esferosomas (Es) de diferentes tamaños, circulares y electronclaros; las mitocondrias (M) circulares, electrodensas; un cuerpo proteico (cp) grande con un contenido fibrilar homogéneo (f) y zonas granulares electrodensas (g). 13200x

Fig. 17 Semilla embebida veinte horas. Célula del primer estrato que muestra: un núcleo (N) elipsoidal con su cromatina homogénea con escasa heterocromatina, la envoltura nuclear (en) con varios poros (flechas); las mitocondrias (M) electrodensas con abundantes crestas, algunas alargadas como en proceso de bipartición (\*); abundante retículo endoplásmico (Re) de forma tubular; los cuerpos proteicos con su membrana (t) bien definida. 13300x

L A M I N A V



## L A M I N A VI

Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 18 a 21)

Veinticuatro horas de imbibición.

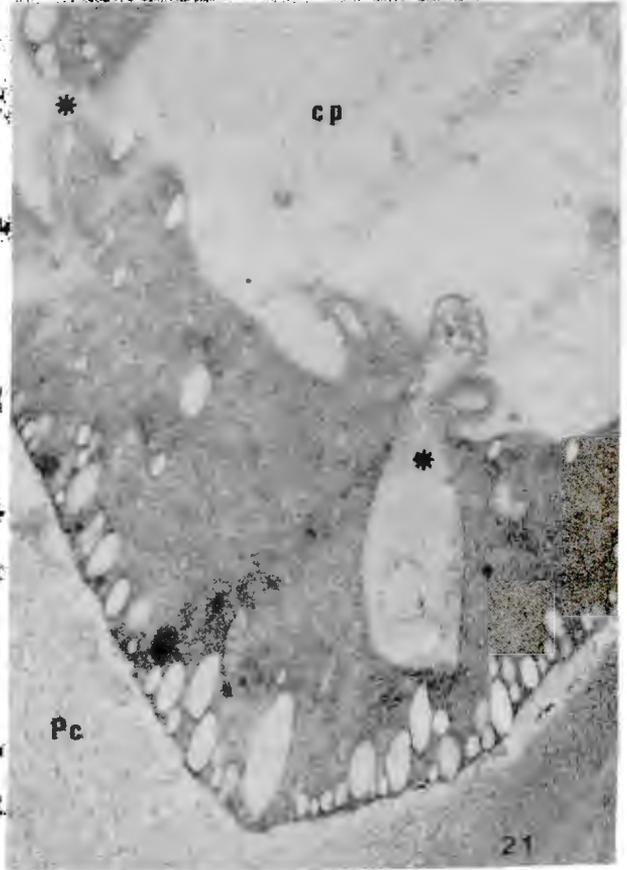
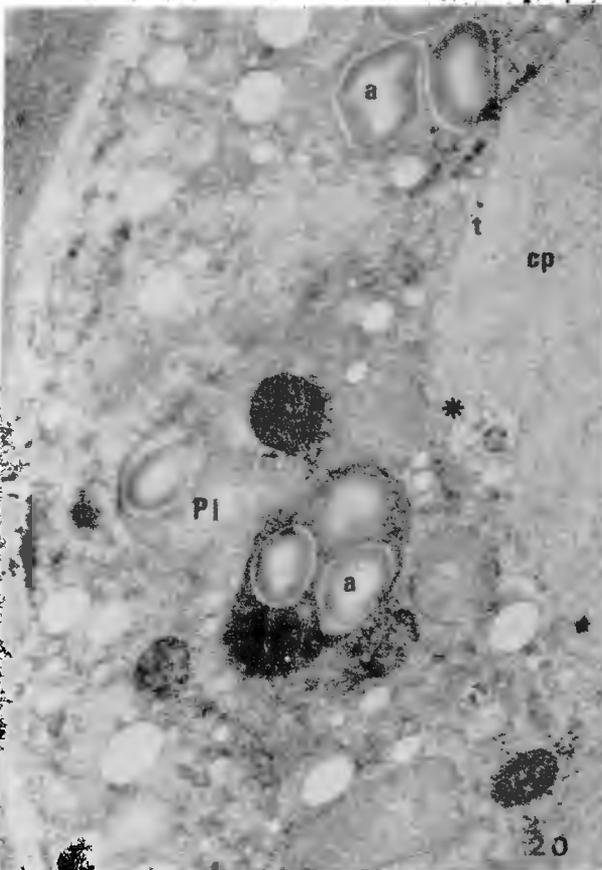
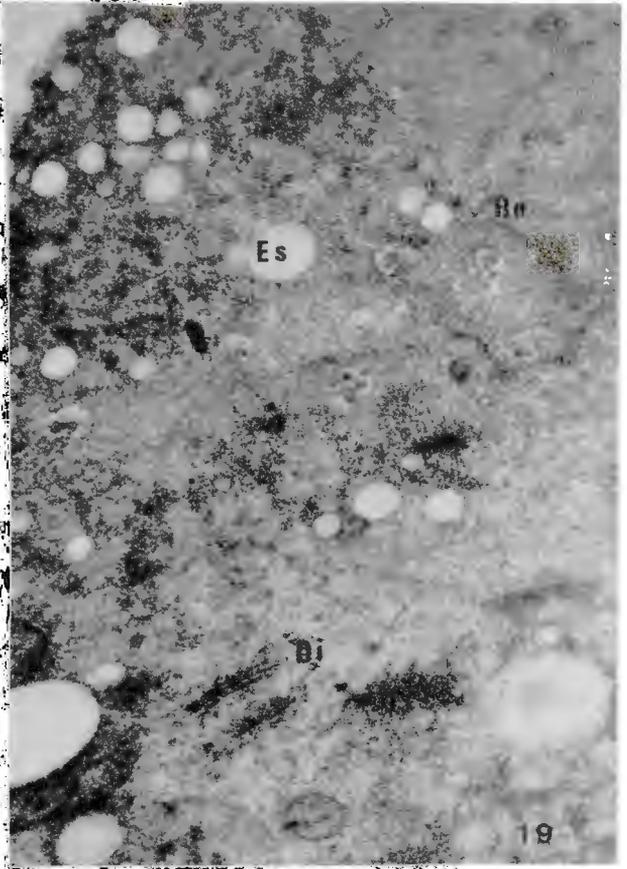
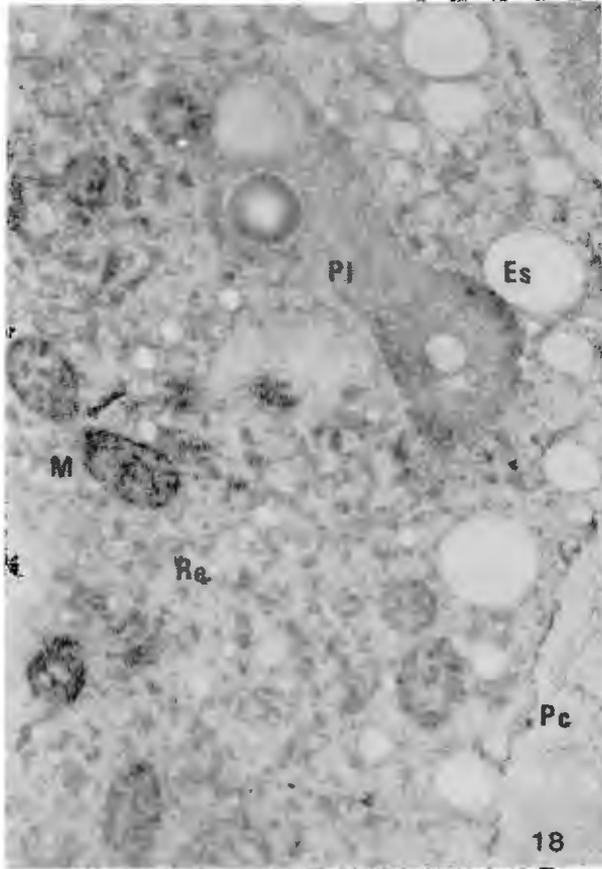
Fig.18 Célula del primer estrato, que muestra: las mitocondrias (M) alargadas, algunas aparentemente en división (flecha), electrondensas con abundantes crestas; el retículo endoplásmico (Re) es muy abundante en forma de túbulos electrondensos; los plastos (Pl) alargados con zonas claras y electrondensas; los esferosomas (Es) circulares de tamaño variable; la pared celular (Pc) con una estructura fibrilar laxa. 13200x

Fig. 19 Célula del primer estrato en la que se observa: el retículo endoplásmico (Re) en forma de túbulos; dictiosomas (Di) electrondensos; esferosomas (Es) circulares, pequeños y electronclaros. 13200x

Fig. 20 Célula del segundo estrato en la que se observa: varios plastos (Pl) hasta con tres granos de almidón (a) y un cuerpo circular muy electrondenso; un cuerpo proteico (cp) muy grande, con la membrana (t) bien definida, con aspecto de vacuola, su contenido granular fino, homogéneo, algunas zonas periféricas como material citoplásmico en invaginación (\*). 13200x

Fig. 21 Célula del segundo estrato que muestra: un cuerpo proteico (cp) grande, irregular, que presenta varias zonas pequeñas que están en contacto con el citoplasma (\*); la pared celular (Pc) en su región vecina al endospermo acelular, con una organización fibrilar laxa. 13200x

L A M I N A VI



## L A M I N A VII

Postfijación con tetraóxido de osmio (Figuras 22 y 23)

Extracción con hexano. Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 24 y 25). Veinticuatro horas de imbibición

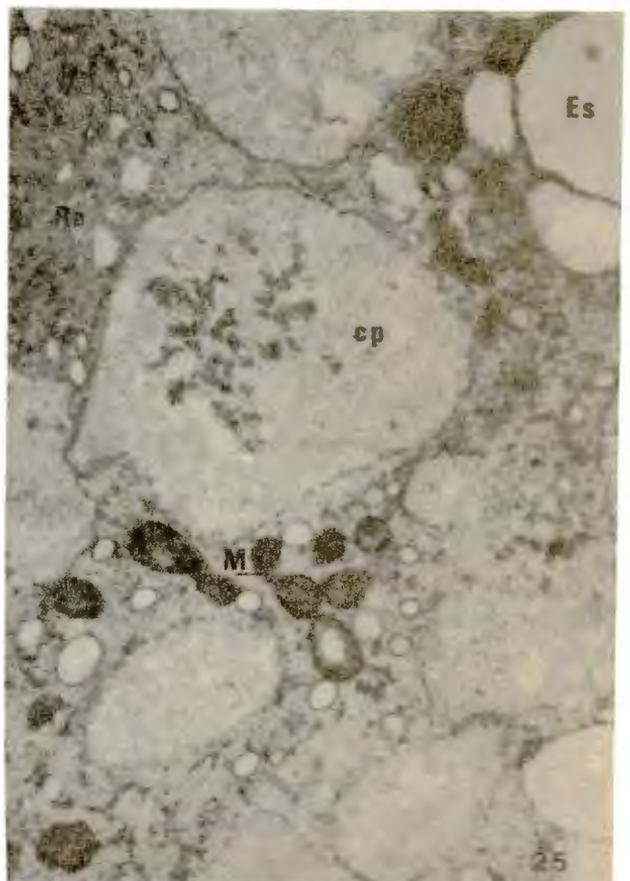
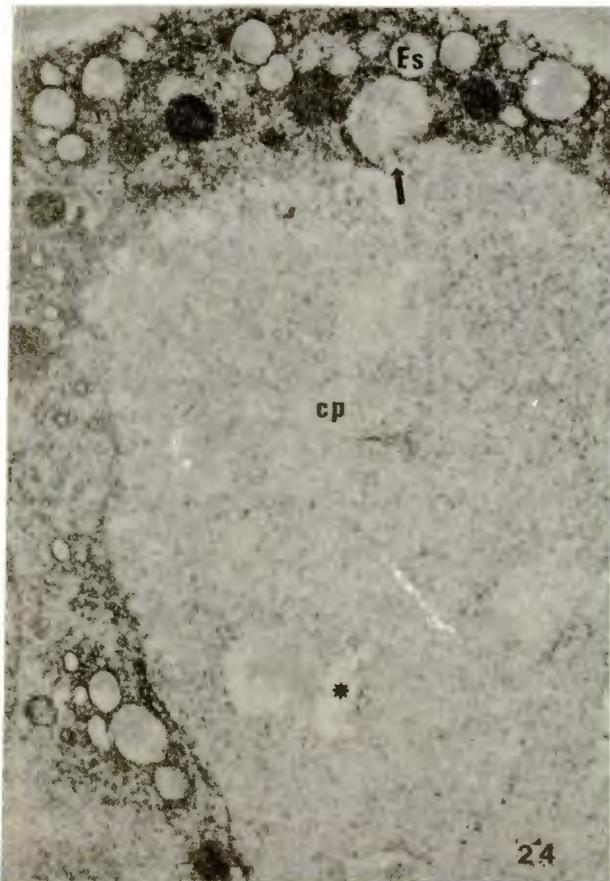
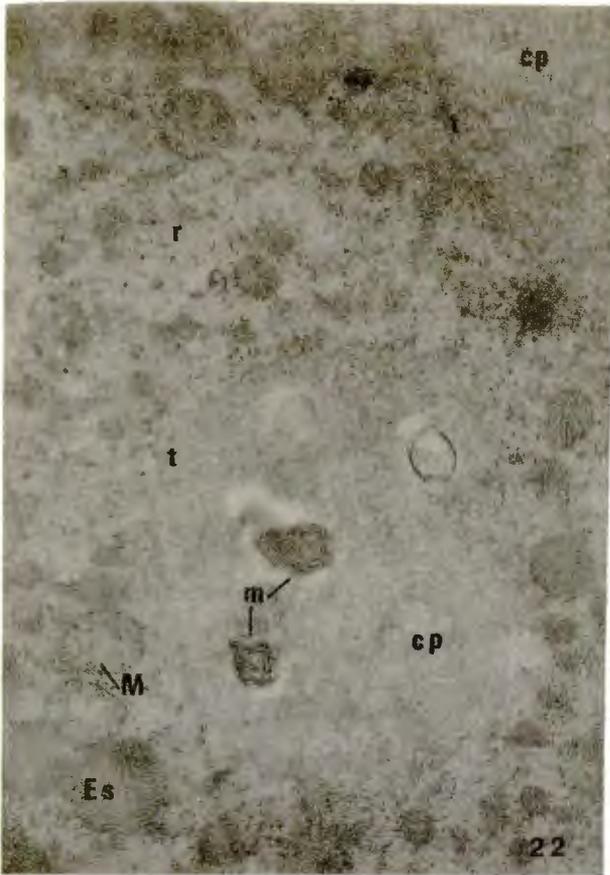
Fig. 22 Célula del segundo estrato en la que se observan: cuerpos proteicos (cp) de contenido homogéneo granular, con figuras mielínicas (m) y la membrana bien definida (t); esferosomas (Es) pequeños, circulares, electrondensos, difusos; las mitocondrias poco electrondensas con las crestas poco definidas, pero abundantes; ribosomas (r) abundantes. 21000x

Fig. 23 Célula del primer estrato que muestra: un núcleo (N) con su cromatina homogénea, un nucleolo (nu) con una zona granular y otra fibrilar, la envoltura nuclear (en) bien definida, electrondensa; cuerpos proteicos con un contenido granular, con algunas figuras mielínicas (m); retículo endoplásmico con ribosomas (r); mitocondrias (M) con abundantes crestas, poco electrondensas. 12300x

Fig. 24 Célula del primer estrato, que presenta: un cuerpo proteico (cp) muy grande, de contenido granular-fibrilar homogéneo, con algunas zonas electronclaras que limitan porciones del mismo material (\*); esferosomas (Es) algunos con un material fibrilar electrondenso, semejante al de la vacuola, algunos fusionados con la membrana de ésta (flecha). 12300x

Fig. 25 Célula del primer estrato, que muestra: varios cuerpos proteicos (cp) de contenido homogéneo, granular-fibrilar fino, algunos con material vesicular electrondenso; los esferosomas (Es) grandes y pequeños, electronclaras con un contenido fibrilar electrondenso; abundante retículo endoplásmico (Re) de forma tubular, ramificado; las mitocondrias (M) muy electrondensas con una zona central más clara. 12300x

L A M I N A VII



## L A M I N A      V I I I

Postfijación con permanganato de potasio (Figura 26)

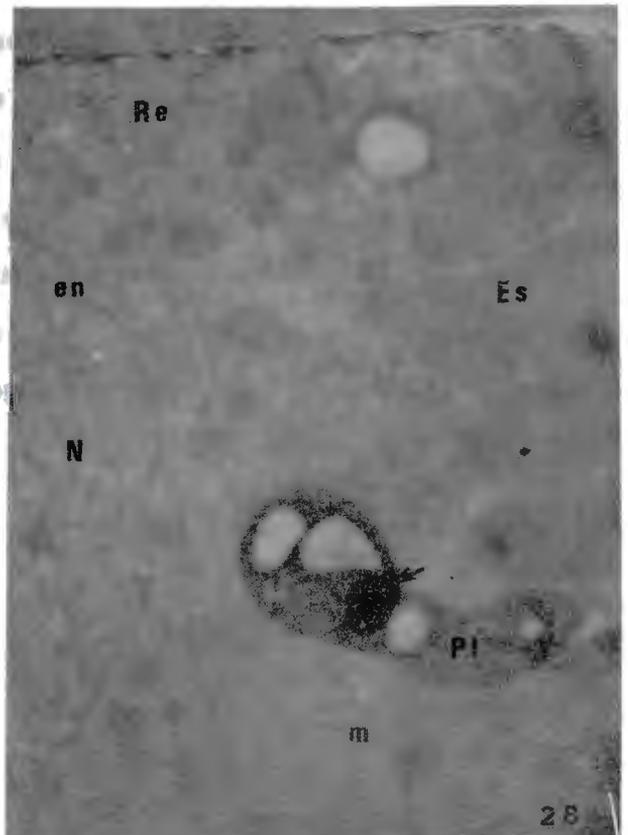
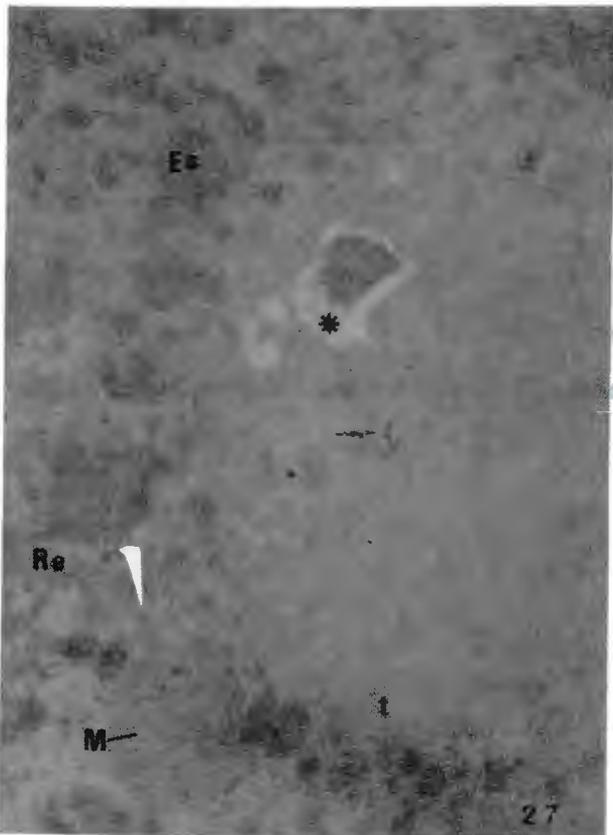
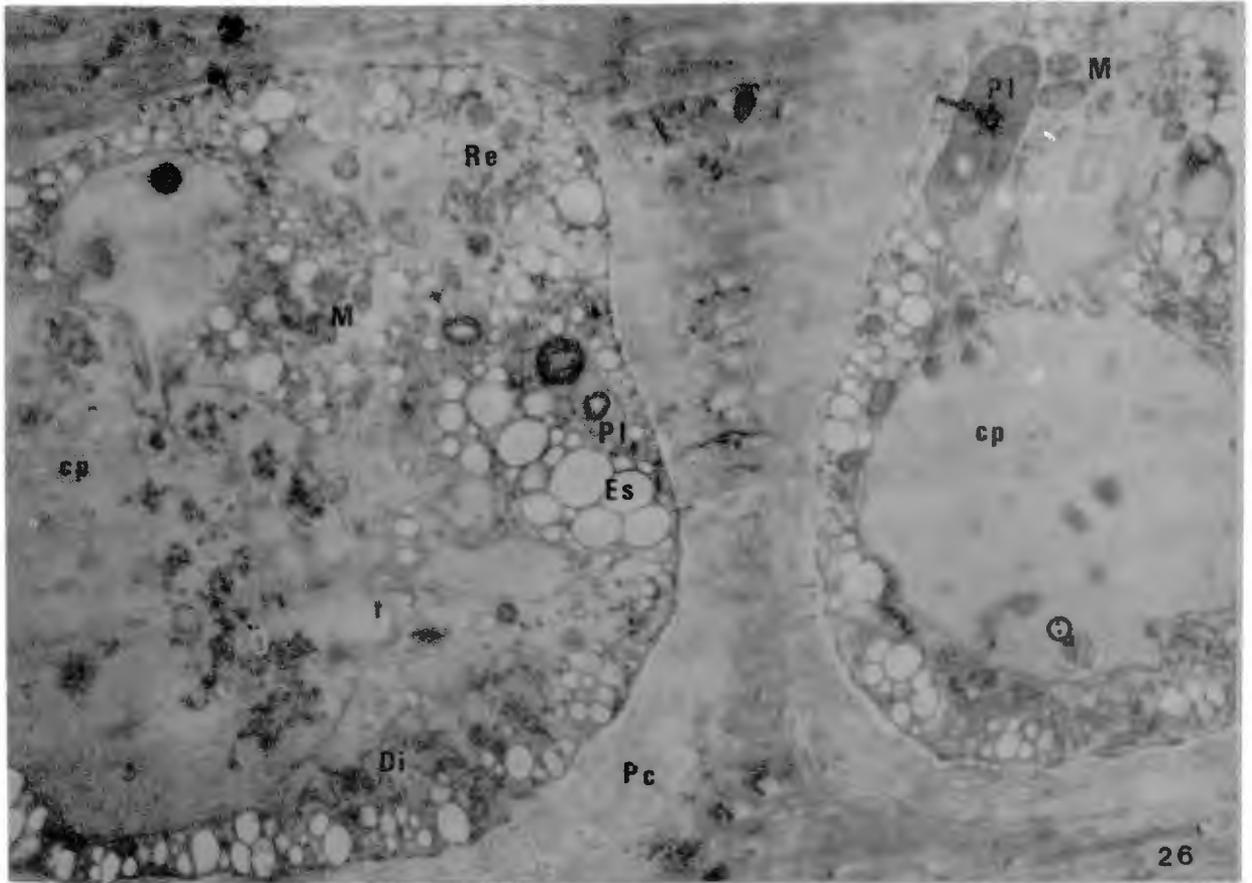
Postfijación con tetraóxido de osmio (Figuras 27 y 28)

Cuarenta y ocho horas de imbibición.

Fig. 26 Células del primer estrato en las que se observa: cuerpos proteicos (cp) grandes, en forma de vacuolas irregulares, algunos de ellos presentan un contenido vesicular electrodensso (o); esferosomas (Es) pequeños, circulares, abundantes, electronclaros; retículo endoplásmico (Re) abundante; plastos (Pl) con la inclusión electrodensa circular (flecha); las mitocondrias (M) electrodensas con abundantes crestas; dictiosomas abundantes (Di); la pared celular (Pc) laxa en la vecindad del endospermo acelular. 7600x

Fig. 27 Célula del primer estrato en la que se observa: una zona difusa limitada por membrana (t) que contiene cuerpos en degradación (\*); abundantes esferosomas (Es) pequeños y grandes, electrodensos; las mitocondrias poco contrastadas; retículo endoplásmico rugoso (Re). 14000x

Fig. 28 Célula del primer estrato, que muestra: retículo endoplásmico (Re) rugoso; esferosomas (Es) grandes y pequeños, electrodensos; plastos (Pl) en forma de clava con una inclusión electrodensa y zonas electronclaras; núcleo (N) con la cromatina finamente fibrilar y la envoltura nuclear (en) bien definida; un arreglo membranal (m) de tipo mielínico. 14000x

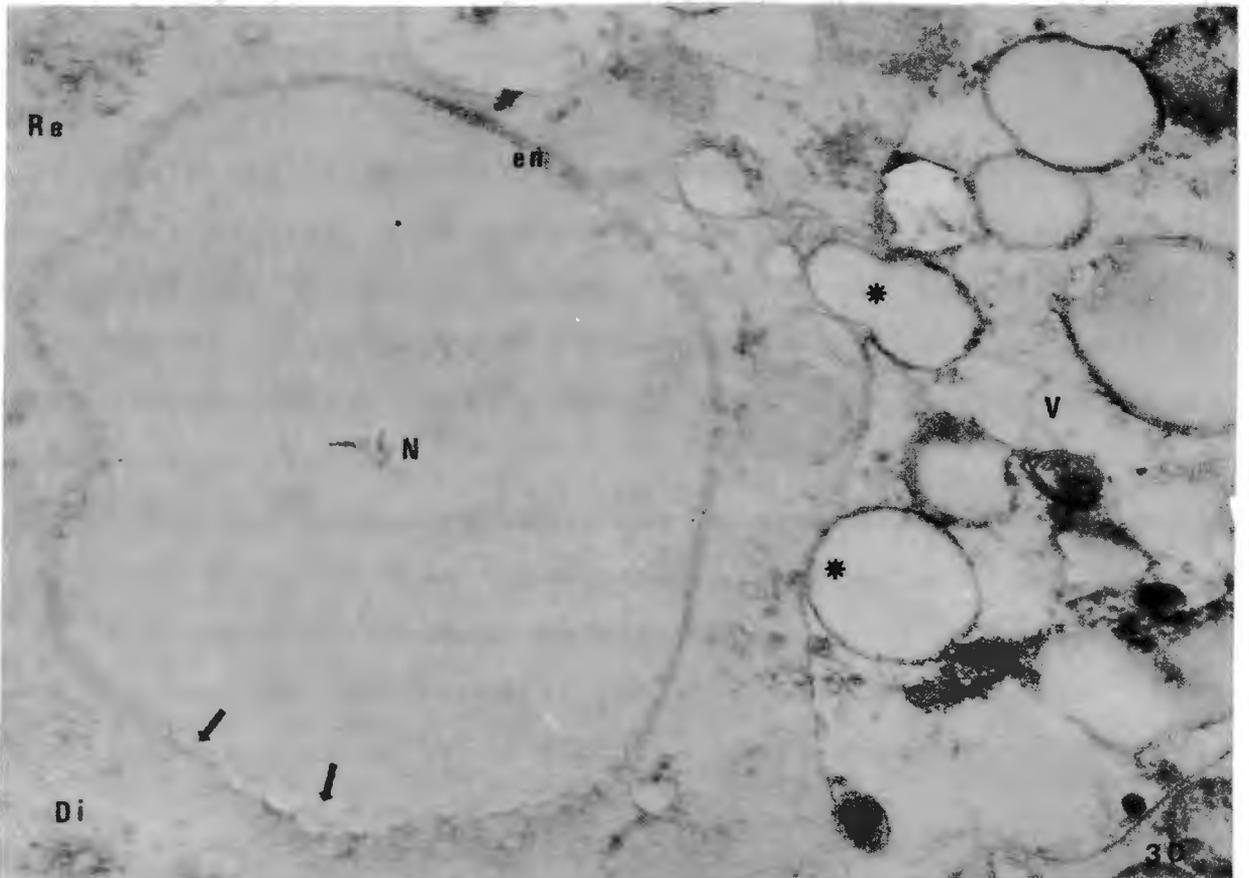
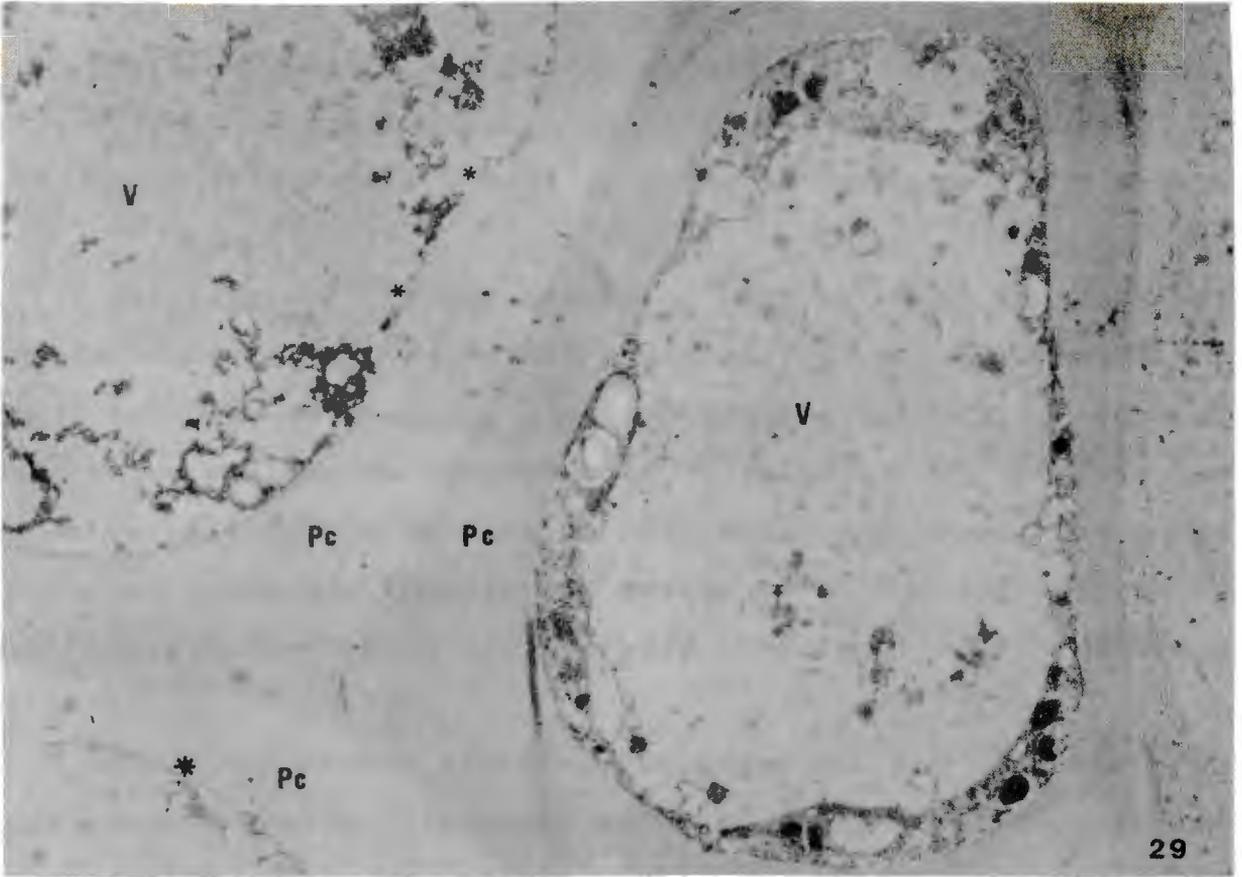


## L A M I N A IX

Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 29 y 30)  
Sesenta horas de imbibición.

Fig. 29 Células del primer estrato. Se observa: una de las células completamente degradada, con restos de citoplasma electrondensos incluidos en lo que fue la vacuola central (V); junto a la pared celular (Pc) se encuentra una membrana delgada (\*), la pared muy hidrolizada, que contrasta con la vecina, un poco más electrondensa, menos hidrolizada; esta célula presenta restos de citoplasma en forma de franja angosta periférica. 5400x

Fig. 30 Célula del primer estrato en estado avanzado de degradación en la que se observa: el núcleo (N) con la envoltura nuclear (en) con los espacios perinucleares (flechas) muy grandes, que le dan el aspecto de un conjunto de vesículas o cisternas concatenadas; una vacuola (V) que contiene numerosos cuerpos membranosos, algunos de los cuales apenas en proceso de penetración (\*); abundante retículo endoplásmico (Re) y dictiosomas (Di). 15400x



L A M I N A X

Postfijación con tetraóxido de osmio (Figuras 31 y 32)  
Extracción con hexano. Postfijación con tetraóxido de osmio (Figuras 33 y 34). Sesenta horas de imbibición.

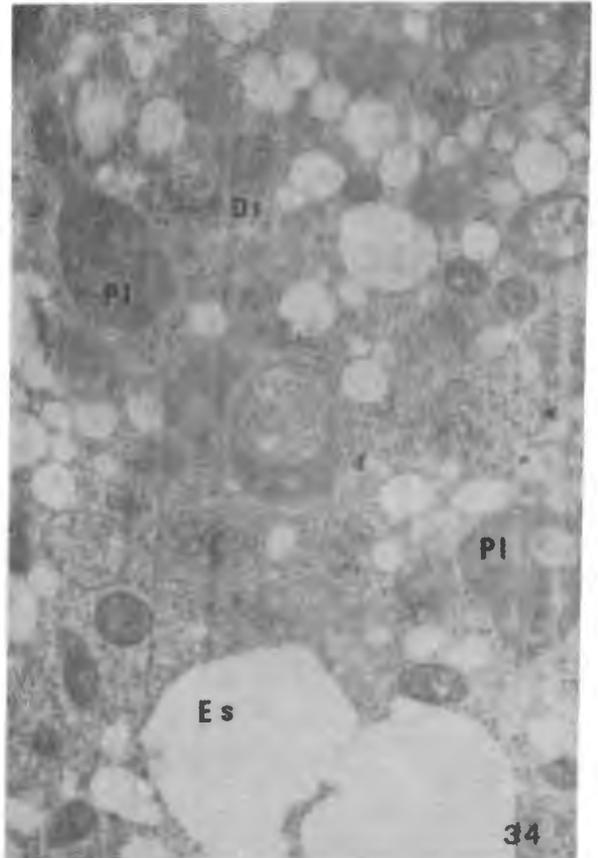
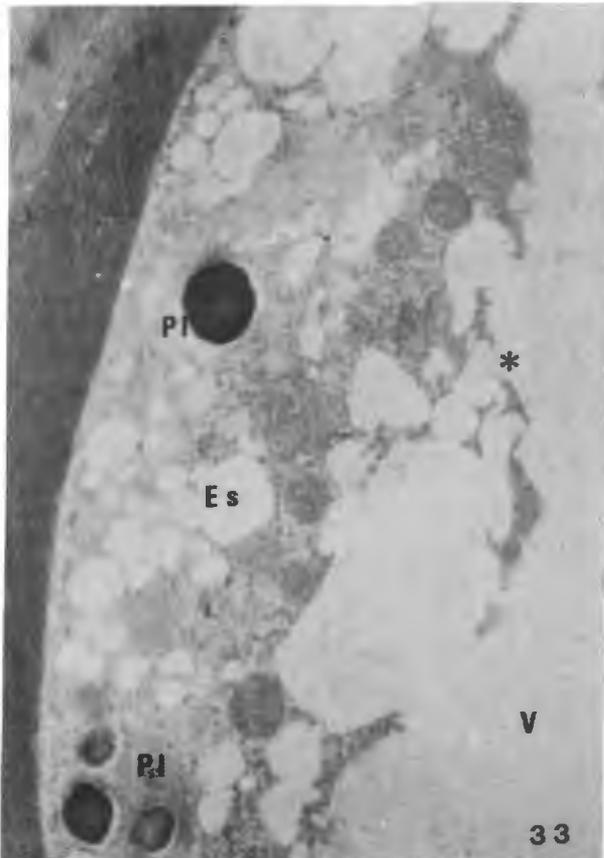
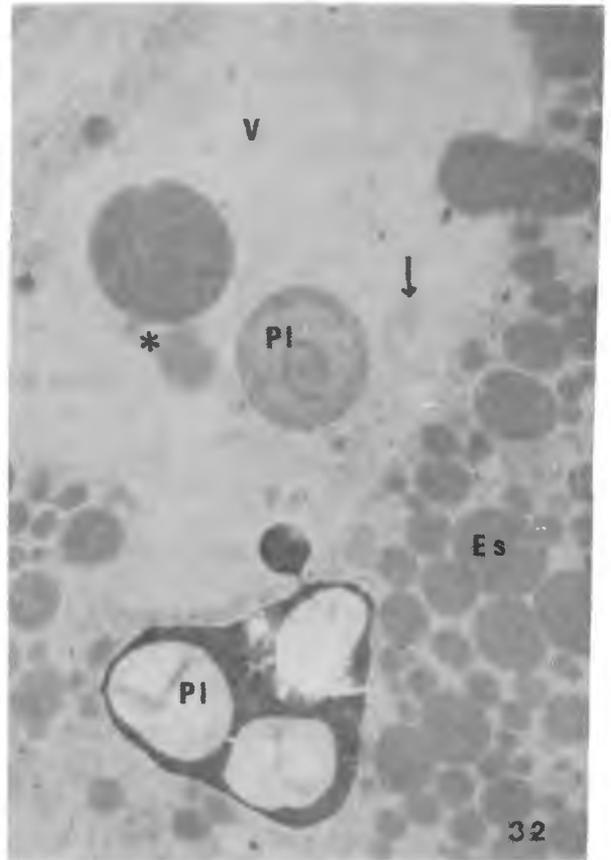
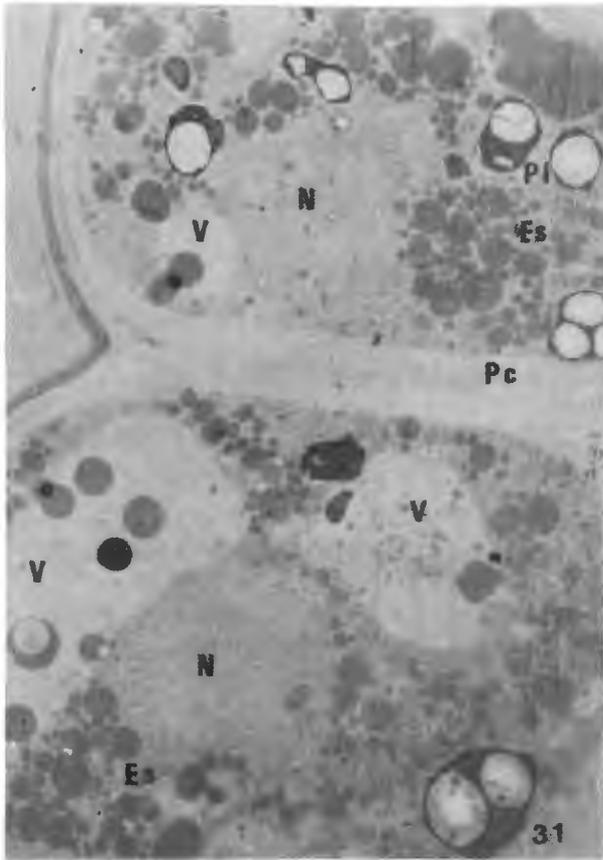
Fig. 31 Células del primer estrato en las que se observa: abundantes esferosomas (Es) electrondensos, circulares, pequeños y grandes; vacuolas (V) grandes o pequeñas que contienen esferosomas en diferentes estados de degradación y algunos en proceso de penetración (\*); restos de plastos (Pl) muy electrondensos, con una o varias zonas electronclaras; restos de núcleo (N) difuso y ligeramente electrondenso; las paredes celulares (Pc) difusas, electronclaras. 4100x

Fig. 32 Célula del primer estrato, que muestra: una vacuola (V) con restos membranales (flechas); esferosomas en diferentes etapas de degradación (\*); un plasto (Pl) en grado avanzado de degradación y otro que empieza a penetrar a la vacuola. 9200x

Fig. 33 Célula del primer estrato, en la que se nota una gran vacuola central (V) electronclara con zonas de proyección citoplásmica, que le dan un aspecto irregular al tonoplasto (\*); los esferosomas (Es) aparecen electronclaros con un material fibrilar electrondenso; los plastos (Pl) con inclusiones muy electrondensas. 9700x

Fig. 34 Célula del primer estrato, que presenta: varios plastos (Pl) en forma de clava con una zona electronclara de aspecto similar al citoplasma; abundantes ribosomas (r) y membranas que parecen restos de dictiosomas (Di); los esferosomas (Es) electronclaros con un material fibrilar electrondenso. 9700x

L A M I N A X



L A M I N A      X I

Endospermo acelular. Postfijación con permanganato de potasio (Figuras 35 a 38).

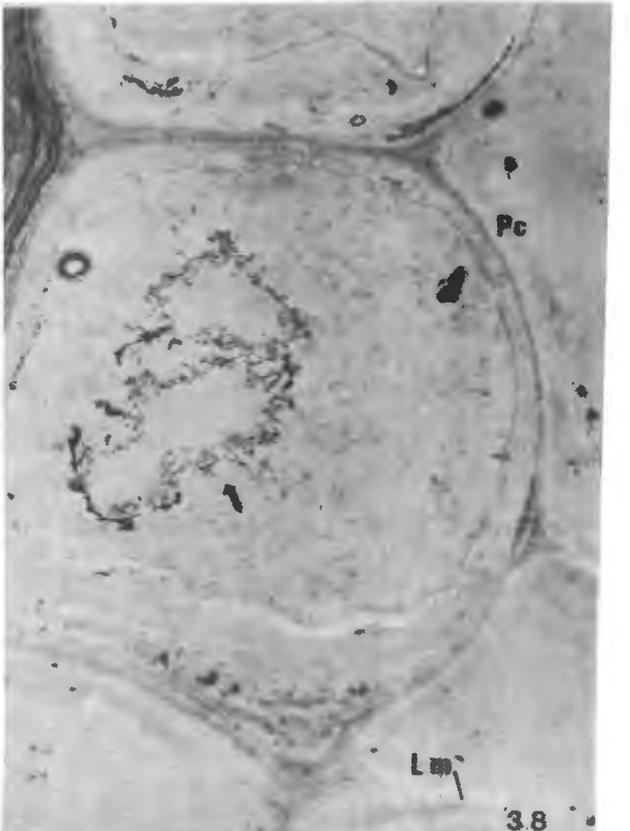
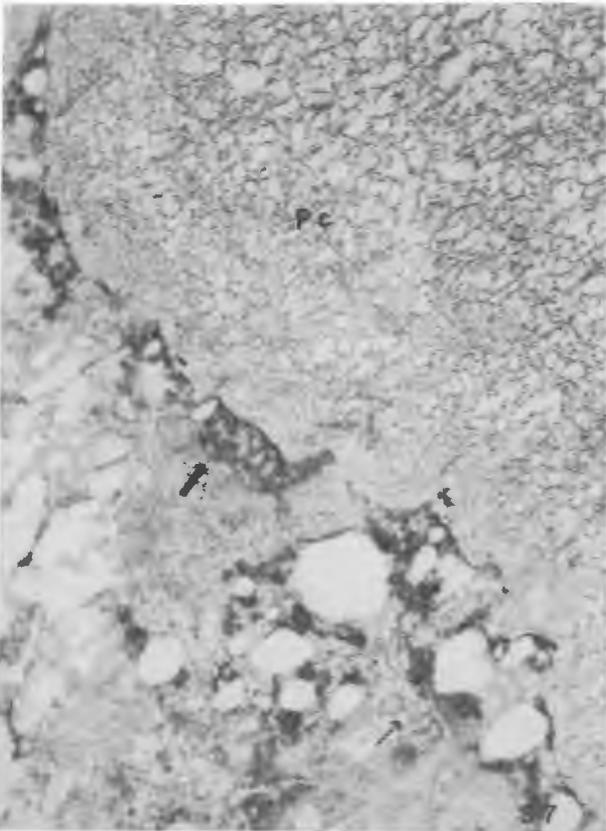
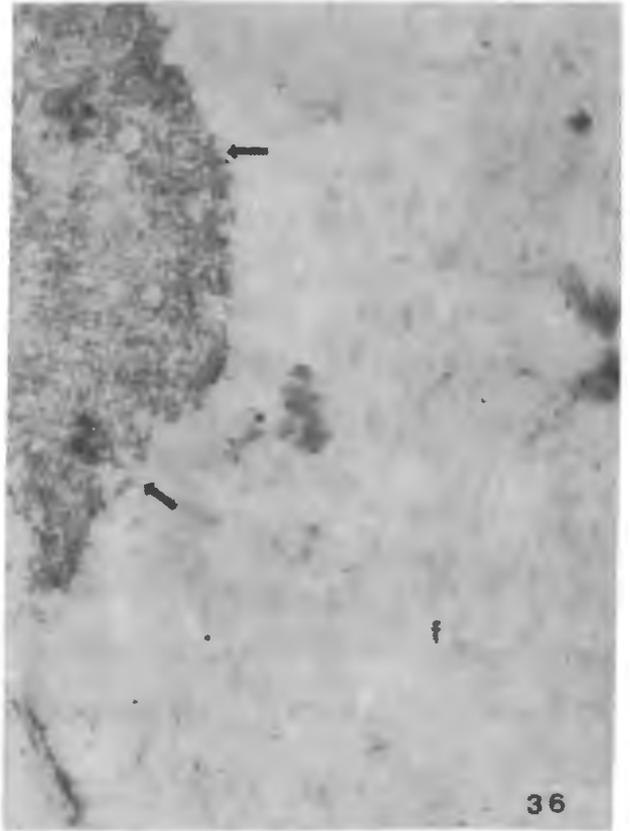
Fig. 35 Semilla embebida cuatro horas. Las zonas más electrondensas (flechas), parecen restos de citoplasma.  
4900x

Fig. 36 Semilla embebida ocho horas. Se observa un material fibrilar laxo (f) y restos de citoplasma (flecha). 4400x

Fig. 37 Semilla embebida veinticuatro horas. Se observan restos de citoplasma del último estrato de la capa de aleurona (flechas) y pared celular laxa (Pc). 13200x

Fig. 38 Semilla embebida setenta y dos horas. Se observa: restos de citoplasma de las células del primer estrato de la capa de aleurona (flechas) y restos de paredes celulares (Pc) del segundo estrato; la lámina media (Lm) muy delgada.  
4300x

L A M I N A    X I



L A M I N A      X I I

Prueba de fosfatasa ácida.

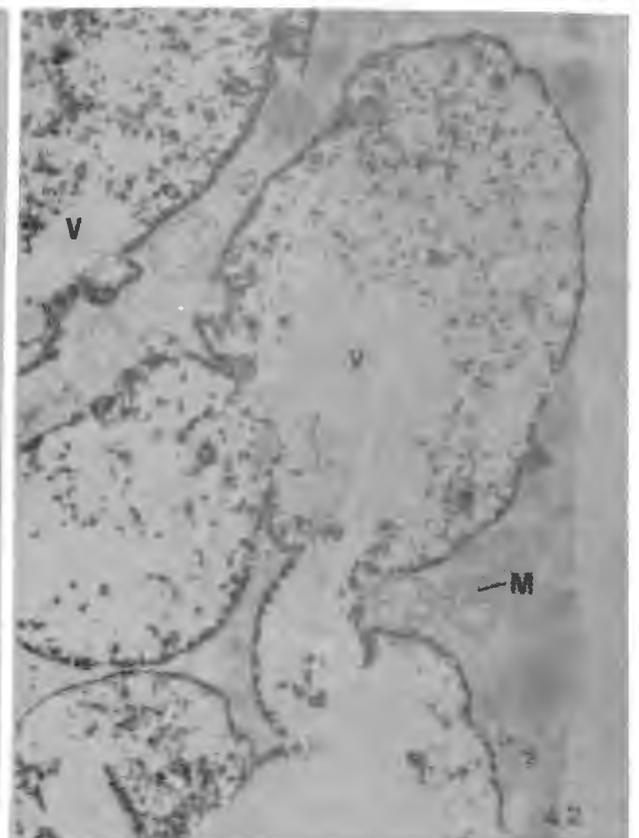
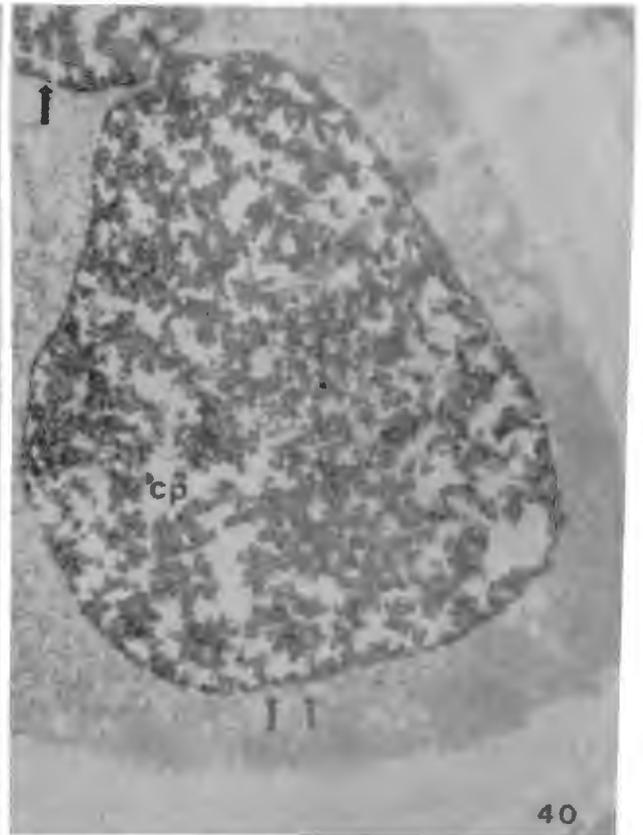
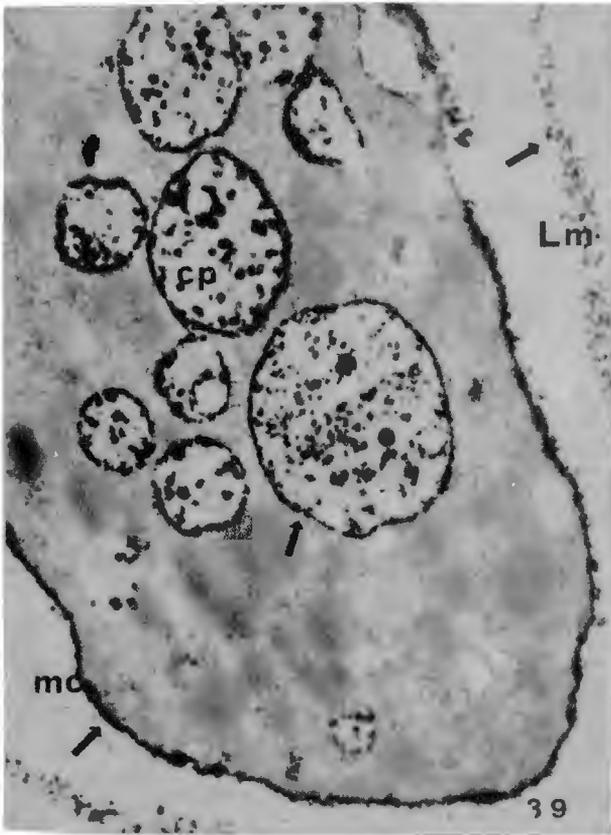
Fig. 39 Semilla embebida una hora. Se muestra una célula del primer estrato, que presenta reacción positiva (flechas) en lámina media (Lm), membrana celular (mc) y cuerpos proteicos (cp).      9700x

Fig. 40 Semilla embebida veinticuatro horas. Se muestra una célula del primer estrato, que presenta reacción positiva (flechas) en cuerpos proteicos (cp).      9700x

Fig. 41 Semilla embebida veinticuatro horas. Se observa el límite entre la capa de aleurona y el endospermo acelular, con reacción positiva (flechas) en pared celular (Pc).      16500x

Fig. 42 Semilla embebida cuarenta y ocho horas. Se observa una célula del primer estrato, que muestra una gran vacuola contorneada (V) con precipitado, que indica reacción positiva. También se localiza en mitocondrias (M), aparentemente en su membrana interna.      9700x

L A M I N A    X I I



L A M I N A      X I I I

Prueba de lipasa neutra

Fig. 43 Semilla con una hora de imbibición. Se observa una célula del primer estrato de la capa de aleurona, que presenta reacción positiva (flechas) en algunas zonas de retículo endoplásmico (Re) y membrana de cuerpos proteicos (cp) 17200x

Fig. 44 Semilla embebida cuarenta y ocho horas. Se observa una célula del primer estrato en la que se muestra con detalle la reacción positiva (flechas) en retículo endoplásmico que rodea a los esferosomas (Es) y en mitocondrias (M). 24000x

Fig. 45 Detalle de la reacción positiva (flechas) en esferosomas (Es) que se encuentran dentro de la vacuola (V). 21000x

L A M I N A   X I I I

