



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMINADO POR
BAC

“RELACION ENTRE VIABILIDAD DE GERMINACION Y SINTESIS DE DNA EN EMBRIONES DE MAIZ”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
MARGARITA GARCIA RENDON



México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

I N D I C E

I. INTRODUCCION.	
1.1 Breve información sobre el maíz.	1
1.2 Germinación, viabilidad y capacidad de crecimiento.	3
1.3 Cambios fisiológicos y/o ultraestructurales en células de semillas de plantas superiores, que han sido sometidas a diferentes tipos de stress.	5
1.3.1 Baja viabilidad, síntesis de proteínas y síntesis de RNA.	10
1.4 Integridad del DNA en semillas de plantas y la importancia de su reparación.	12
1.4.1 Integridad del DNA en semillas secas y su relación con la baja viabilidad.	14
1.4.2 Relación entre mutagénesis y reparación del DNA durante la germinación.	17
1.4.2.1 Evidencia de la reparación del DNA en semillas de plantas superiores.	19
1.4.3 Naturaleza del daño al DNA en semillas de baja viabilidad.	23
1.5 Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre síntesis de DNA en embriones de maíz con viabilidad de germinación.	26

II. OBJETIVO	28
III. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Materiales.	30
3.1.1 Material biológico.	30
3.1.2 Soluciones amortiguadoras y reactivos.	30
3.2 Métodos.	31
3.2.1 Curva de síntesis de DNA.	31
3.2.2 Determinación de los patrones de fragmentación del DNA.	33
3.2.2 Ensayo de difenilamina para la determinación de DNA.	35
IV. RESULTADOS.	
4.1 Determinación de viabilidad y capacidad de crecimiento.	36
4.2 Determinación de los patrones de fragmentación de las semillas sometidas a tratamientos con humedad y/o temperatura.	39
4.3 Determinación de la incorporación de ³ H-timidina a material insoluble en TCA (determinación de la síntesis de DNA)	48
4.4 Determinación de la integridad del DNA por electrofóresis.	55
V. DISCUSION.	59
VI. CONCLUSIONES.	63
VII. BIBLIOGRAFIA.	65

I. INTRODUCCION.

Sabemos que el maíz es un producto de importancia, ya que es básico en la alimentación, tanto de nuestro país - como en América Latina. Sin embargo, con frecuencia nos - encontramos con problemas en el rendimiento y calidad del maíz, debido entre otras causas a los cambios climatológicos a los que son expuestas las semillas antes de ser usadas en la siembra.

En la investigación experimental que llevo al cabo, se condicionan las semillas mediante tratamientos artificiales en función de parámetros tales como: temperatura, humedad y tiempo para poder apreciar cambios fisiológicos - y/o ultraestructurales, sí estos se presentaran. Además - se analiza la capacidad de germinación y crecimiento de - los embriones del maíz, (Zea mays criollo) explorando a la vez algunas de las alteraciones a nivel molecular.

1.1 Breve información sobre el maíz.

El maíz es una planta que pertenece a la familia de - las gramíneas, con tallo grueso, de uno a tres metros de altura, según la especie; hojas largas, lanceoladas, planas y puntiagudas, flores masculinas en racimos terminales

y las femeninas en espigas axilares, resguardadas por una vaina. Corresponde a la especie Zea mays. Las flores femeninas forman espigas y se insertan sobre un eje esponjoso, que al madurar el grano se le llama zuro u olote; la hoja o bráctea que la envuelve se denomina chala, tusa o joloché.

Usos del maíz.- El maíz tiene muchos usos, y sus productos secundarios son aún más numerosos. En México se consume principalmente en forma de tortillas, pozole, entre otros. Del maíz se produce una bebida llamada chicha, que se elabora por fermentación; también se hace del maíz una harina. El maíz es rico en almidón y se considera como un alimento muy completo, pues proporciona proteínas, calorías, grasas y fierro; por ello su gran demanda en la alimentación. También se hace un jarabe del almidón de maíz, del cual se obtiene azúcar de maíz o glucosa. El almidón calentado y pulverizado se convierte en dextrina, en esta forma se emplea para preparar pastas adherentes y mucilagos.

De los granos germinados se separan los gérmenes de donde se extrae el aceite de maíz, el cual además de utilizarse como alimento, es empleado en la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales, jabones y el re

siduo sirve aún como forraje.

El alcohol de maíz se emplea en la fabricación del caucho artificial. De las tusas de la mazorca se extrae el -furfural, importante en la elaboración de resinas, disolventes e insecticidas. La pulpa de la caña del maíz se emplea en la fabricación del papel.

Cosecha y almacenamiento.- No se debe cosechar el maíz hasta que su contenido de humedad se reduzca a un 20 ó 30%. las mazorcas no pueden ser almacenadas sin peligro, si -- contienen más del 30% de humedad. Para que el almacenamiento pueda durar un año aproximadamente, la humedad debe ser del 12.5% o inferior.

La solidez estructural y la ventilación, son los dos principales requisitos que debe reunir el sitio de almacenamiento de las semillas.

1.2 Germinación, viabilidad y capacidad de crecimiento.

Se considera que la germinación es un conjunto de fenómenos, que se producen en una semilla, al pasar del estado de vida latente a la vida activa para producir una planta semejante a aquella de la cual proviene. Para que puedan germinar las semillas, es necesario que reunan -- ciertas condiciones propias de la semilla o intrínsecas y

que además ocurran otras dependientes del medio en que se hallan o condiciones extrínsecas. Por las primeras la semilla debe estar sana y bien conformada, y haber alcanzado la madurez fisiológica; es decir, que pueda secretar las diastatas necesarias para transformar las materias que necesita para su primer desarrollo. En las gramíneas precede la madurez fisiológica a la morfológica, mientras que muchos frutales de semilla, alcanzan la madurez fisiológica al año de la recolección. La facultad germinativa se conserva durante cierto tiempo, el cual es muy breve en algunas semillas, como por ejemplo las semillas del café, y otras tienen una capacidad germinativa que se prolonga por más tiempo como en las amiláceas, por ejemplo: el trigo.

Las condiciones extrínsecas más importantes son: el agua, el aire y la temperatura. El agua es indispensable para romper los tegumentos, facilitar la salida del embrión y también para las reacciones químicas de este proceso. El aire les es necesario para su respiración, como lo es para la planta, pues en atmósfera carente de oxígeno no germinan. Según la especie hay una temperatura mínima, debajo de la cual la semilla no puede germinar, y una máxima, pasada la cual peligrá el embrión; entre ambos límites se encuentra la temperatura favorable para el desa-

rollo del embrión. En el trigo la mínima es de 0°C , la máxima de 45°C y la óptima de 28°C ; en el maíz la mínima es de 9°C , la óptima de 33°C y la máxima de 43°C . El proceso de germinación comienza con un aumento de volumen a consecuencia del agua absorbida, aparición al exterior de la raicilla; momento en el que el período de germinación ha terminado y después aparece el talluelo con los cotiledones y la gémula o plúmula, la cual desarrollándose produce las primeras hojas.

Hasta este momento la nueva planta vive de sus reservas y cuando éstas se agotan se nutre ahora de los recursos ambientales.

Las semillas son resistentes y pueden mantener su capacidad de germinación o viabilidad, si se les proporciona el medio adecuado para su reactivación.

La capacidad de crecimiento de una semilla es la condición en la que la semilla alcanza el máximo de sus capacidades potenciales, para germinar satisfactoriamente en un rango amplio de condiciones ambientales, utilizando -- sus reservas para originar una nueva planta.

1.3 Cambios fisiológicos y/o ultraestructurales en células de semillas de plantas superiores, que han sido sometidas a diferentes tipos de stress.

Crevecoeur, et. al. (1982) en su estudio de los efectos de la temperatura submínima en la fisiología y ultraestructura de los embriones de maíz durante la germinación, señalan que la exposición a bajas temperaturas de las semillas de maíz durante la germinación, provoca varias alteraciones estructurales en las células de la raíz. Estos cambios se presentan en propláستidos, mitocondrias y nucleolos. Sus resultados indican que los mismos sitios citopláسمicos y nucleares son afectados en las células de la raíz, cuando las semillas se exponen a bajas temperaturas durante la germinación, y que todos los cambios observables son reversibles después de la exposición a 4°C durante 8 ó 10 días, pero se vuelven irreversibles cuando el período de enfriamiento se prolonga por más de 20 días. En cuanto a cambios fisiológicos, reportan que las semillas germinadas por 72 horas a 16°C y posteriormente sometidas a 4°C por períodos de 6 a 8 días, para nuevamente ser incubadas a 16°C, muestran una recuperación de su desarrollo, en todos los embriones, pero cuando el período a 4°C se prolonga por más de 8 días, se observa un fuerte decremento en el porcentaje de embriones que recuperan su desarrollo, y éste es proporcional al período de exposición. Después de 26 días ó más a 4°C, todos los embriones mueren.

Baszczynski, et. al. (1983) realizan un estudio sobre la regulación de la expresión genética en maíz por shock con calor, donde reportan que la respuesta de las plántulas del maíz al shock con calor involucra una nueva síntesis y/o su incremento, de un grupo de polipéptidos o proteínas, llamadas proteínas de choque térmico (HSP) análogas a aquellas encontradas en células animales y otros sistemas de plantas superiores, que han sido sometidas a un stress térmico. Sin embargo, se ha reportado que solo en algunos casos, el cambio en el patrón de polipéptidos sintetizados después de un shock con calor, es el resultado de una nueva transcripción (Ashburner, M. y Bonner, J. J. (1979); Key, et. al. (1981); Kruger y Beneche (1981))

En algunos casos los cambios en los tipos de proteínas sintetizadas en respuesta al shock con calor, han mostrado involucrar alteraciones en la transcripción de RNA, así como una asociación selectiva de RNAs mensajeros particulares, con polisomas. In vitro, la traducción de RNA aislado de tejido control y de tejidos que han sido sometidos a shock con calor, dan peso a la idea de que la respuesta al shock con calor involucra una nueva transcripción v/o un incremento de la misma (Kelley, P.M., et. al. (1980); Schoffl, F. y Key, J.L. (1982)).

Edward, et. al. (1981) reportan como resultado de su-

estudio sobre el efecto de la temperatura, en la composición de lípidos y en la respiración en células de la raíz de trigo, que la composición en ácidos grasos de la raíz de plántulas de trigo cambia en respuesta a la temperatura, el nivel del ácido linolénico (en particular) se incrementa, mientras que el ácido linoléico disminuye. La distribución de las diferentes clases de fosfolípidos, no es influenciada por la temperatura.

El efecto en la respiración de las células de la raíz de trigo, se midió bajo diferentes rangos de temperatura y la velocidad de respiración decae conforme la temperatura disminuye.

Kelley, et.al. (1980); Schoff y Key (1982); y Fleck, et. al. (1982) realizan un estudio del patrón protéico, en protoplastos de Nicotiana sylvestris, sometidos a un shock osmótico, y reportan que la mayoría de las proteínas sintetizadas normalmente en células en medio isotónico, no son sintetizadas en éstos protoplastos; en particular la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa esta ausente. Sin embargo, se observa la presencia de algunas nuevas proteínas. Ellos demostraron previamente que estos cambios en la expresión genética, en los protoplastos aislados, ocurren a nivel de transcripción.

En el análisis del patrón protéico de protoplastos, se

detectó la presencia de un grupo de proteínas de elevado-peso molecular, las cuales no se presentan en células cultivadas en medio isotónico e hipertónico, ésto indica que éstas proteínas son específicas del estado de los proto - plastos y parecen relacionarse con la síntesis de la pared celular. Por otra parte, se observó la presencia de un gru po de proteínas común al patrón protéico de protoplastos- y de células en medio hipertónico, lo que indica que éstas proteínas están relacionadas directamente con la alta -- fuerza osmótica, dada la condición de un medio hipertóni- co para mantener la viabilidad de los protoplastos y ade- más, que éste grupo de proteínas no está presente en célu las cultivadas en medio isotónico.

Morris, et. al. (1981) realizan un estudio de la adap tación de la soya al stress con agua a través de estados- selectos de desarrollo.

Plantas de soya desarrolladas en suelos arenosos, con humedad proveniente solo del agua de lluvia, o con irriga ción suplementaria, muestran cambios en su desarrollo fi- siológico, en respuesta a la atmósfera de humedad en la - que son desarrolladas. Las plantas desarrolladas en condi ciones de alta humedad desarrollan más extensamente su -- sistema radicular, mientras que las plantas con irrigación natural desarrollan grandes tallos y pequeños sistemas ra

diculares. La apertura máxima del estoma fue observada al inicio de cada fotoperíodo. El estoma de las plantas en atmósfera de alta humedad permanece abierto por un período más prolongado que el de aquellas plantas con irrigación natural.

Reducciones significativas en la fijación neta de carbono, generalmente se presenta con un decremento en la apertura del estoma el cual coincide con períodos de elevadas temperaturas, baja humedad relativa, máxima radiación solar y stress con agua.

1.3.1 Baja viabilidad, síntesis de proteínas y síntesis de RNA.

Estudios en embriones de trigo, extraídos de semillas almacenadas por largo tiempo, han mostrado una gran declinación en la síntesis de proteínas, lenta germinación y baja viabilidad (Roberts, 1972).

Diversos estudios a nivel bioquímico de semillas de baja viabilidad se han realizado, para tratar de encontrar la razón de la caída en la síntesis de proteínas, ya sea por efecto directo sobre el proceso de traducción, o bien, como una consecuencia de algún daño producido a otro nivel y según su relación con la baja viabilidad.

Abu-Shakra y Ching (1967) sugieren que la baja viabili

dad de semillas envejecidas es una consecuencia de la baja actividad mitocondrial.

Lakon (1949) asocia la baja viabilidad de las semillas con la baja actividad de enzimas participantes en el sistema respiratorio.

Berjak y Villiers (1970-72) y Hallam, et. al. (1972a-b) señalan que una serie de alteraciones en diferentes clases de membranas en la célula, conducen a una baja viabilidad de las semillas.

Chung (1973) asocia éstas alteraciones a cambios celulares a nivel estructural.

Se menciona entonces que ésta serie de alteraciones son factores contribuyentes a la caída de la viabilidad en semillas almacenadas, pudiendo llegar a causar una inhibición total del sistema de síntesis de proteínas.

Osborne y Roberts (1973) señalan que tanto RNA ribosomal 25S como 18S exhiben una fragmentación progresiva, -- asociada a la baja viabilidad de semillas de centeno.

Estas mismas observaciones se han hecho en ejes embrionarios no viables de semillas de chícharo (Bray y Chow, et. al. 1976).

Osborne (1976) concluye que los embriones con baja viabilidad, muestran también una baja capacidad en la incorporación de precursores dentro del RNA y las proteínas.

Este decremento en la incorporación puede ser relacionado con el bajo valor de germinación de embriones de baja viabilidad.

Estos mismos síntomas también son típicos en semillas que han sido tratadas con irradiaciones gamma durante las primeras horas de imbibición (Osborne, 1977).

Osborne (1977) señala que lesiones no reparables en el DNA, podrían afectar la síntesis de RNA codificado por el locus que ha sido dañado.

Si la actividad de cualquier enzima reparativa es atenuada durante el período de almacenamiento de las semillas y el daño al DNA afecta a aquellos cistrones que codifican para las proteínas con función enzimática reparativa (particularmente si éstas enzimas son codificadas por genes - únicos), un programa de deterioro irreversible se habrá iniciado. Sugiere además que el daño en la función enzimática para la reparación del DNA, puede ocurrir durante el almacenamiento de las semillas y puede ser un factor de gran influencia en la disminución de la actividad metabólica sintética y la baja germinación de las semillas al ser puestas en imbibición.

1.4 Integridad del DNA en semillas de plantas y la importancia de su reparación.

Es sabido que la molécula del DNA es relativamente frágil, que se lesiona con facilidad. La integridad de la información contenida en ésta molécula esta protegida por un sistema enzimático, capaz de reparar los daños causados ya sea por agentes físicos o químicos; pero a la vez, la capacidad de éste sistema se encuentra restringida por la gravedad de la lesión producida en una de las cadenas del DNA y podrá repararse siempre que se mantenga la integridad de la cadena complementaria.

En términos generales, la participación de este sistema consiste en la detección del daño, su eliminación, síntesis de la fracción ya corregida y finalmente la inserción de este nuevo fragmento dentro de la molécula remanente.- De ésta manera se logra evitar en algunos casos el que una lesión se convierta en una mutación, protegiendo la integridad del genóma de los defectos y cambios mutagénicos.- Sin embargo, éste sistema puede verse afectado en su capacidad funcional, lo que conduciría a una modificación del genóma sin que éste pueda ser re-establecido, dando lugar a que las lesiones producidas terminen convirtiéndose en una serie de mutaciones hereditarias.

En las plantas superiores las evidencias bioquímicas para la reparación de las lesiones causadas al DNA se encuentran en desarrollo, y se tiene solo escasa informa --

ción al respecto.

Para iniciar el estudio del comportamiento de los mecanismos reparativos en respuesta a cambios ambientales en plantas superiores, es importante considerar que las condiciones de desarrollo varían para cada especie y variedad de plantas y que están determinadas por las condiciones que prevalecieron durante la formación de la semilla, y por la información hereditaria almacenada en las mismas. Entre las condiciones requeridas para que una semilla germine, se pueden mencionar: humedad, temperatura, luz y atmósfera gaseosa adecuada; luego entonces, alteraciones en alguno o algunos de éstos factores, pueden provocar una disminución en la capacidad de germinación de las semillas, probablemente por cambios en el material genético, que podrían ser de dos tipos: a) a nivel molecular, lo que originaría mutaciones genéticas, o bien b) a cambios que alteren el número de genes o su localización.

1.4.1 Integridad del DNA en semillas secas y su relación con baja viabilidad.

Cuando una lesión producida al DNA de semillas se convierte en una mutación, ésta es reflejada por una serie de variaciones morfológicas en las plantas originadas por estas semillas. Estas alteraciones han sido detectadas --

con frecuencia en plantas de semillas que han sido almacenadas en estado seco por tiempo prolongado, en relación con aquellas plantas originadas por semillas recién cosechadas, como lo reporto De Vries ya desde 1901.

Cheah y Osborne (1978) encontraron que tanto el envejecimiento natural como las irradiaciones gamma de las semillas, producen un incremento en la fragmentación del DNA. Ellas analizaron por autorradiografía, después de cuantificar la incorporación de ^3H -dCTP dentro de los núcleos de cortes de embriones de centeno en presencia de la 3'-OH deoxinucleotidil transferasa terminal de timo de ternera, el alto número de fragmentos de cadena sencilla detectables en el DNA nuclear, en preparaciones fijas de secciones de embriones de semillas con un largo período de almacenamiento, cuya capacidad de germinación correspondía a un 0%. También realizaron preparaciones de embriones frescos, con un 95% de germinación y de embriones con una capacidad de germinación del 95% después de haber sido irradiados (radiaciones-gamma-50kR) en estado seco.

Las diferencias en la integridad del DNA se pueden demostrar también por fraccionamiento electrofóretico. Los resultados mostraron que el DNA de los embriones con una capacidad de germinación del 95% es predominantemente de elevado peso molecular, con solo unos cuantos fragmentos-

de bajo peso molecular, mientras que una gran proporción de éstos últimos, fueron detectados en el DNA de semillas no viables.

Una observación de gran interés es el hecho de que -- existe un incremento en la degradación del DNA, cuando -- los embriones no viables son imbibidos en agua por 18 horas, antes del aislamiento de los núcleos.

Un análisis en el densitómetro de Feulgen de preparaciones de secciones de embriones, refleja que la cantidad total de DNA por núcleo durante las 18 horas de imbibición permanece constante, entonces la fragmentación progresiva del DNA con el tiempo, es atribuible a una continua actividad de endodesoxirribonucleasas asociadas a la cromatina.

En semillas, durante la maduración del embrión, la fragmentación del DNA nuclear y la activación de las DNAsas ocurre in vivo. Esta disminución en la integridad del DNA, puede ser la fuente de las aberraciones cromosomales y el daño observado en la transcripción, cuando las semillas de baja viabilidad germinan (Cheah y Osborne, 1978).

Investigaciones en semillas de chícharo, haba y cebada, tratadas con humedad y temperatura en diferentes rangos, han mostrado pérdida de la viabilidad de las semillas en diferentes grados y acumulación de aberraciones cromosomales.

sómicas durante las primeras divisiones de los meristemas de las raíces, siendo durante la anafase más fácil de observar el daño causado a los cromosomas.

De Vries (1901) fue el primero en relacionar los bajos porcentajes de germinación de las semillas de baja viabilidad de Genothera lamarckiana, con el gran número de alteraciones fenotípicas de las plantas y con los cambios en el DNA.

1.4.2 Relación entre mutagénesis y reparación del DNA durante la germinación.

La integridad de la información contenida en el DNA se encuentra protegida en gran parte, por enzimas capaces de reparar con exactitud ciertos tipos de desperfectos en una de las dos hebras del DNA. Estas enzimas actuarán en la corrección de éstos defectos, siempre que la información de la cadena complementaria este intacta.

In vivo el DNA puede experimentar diferentes tipos de lesiones: 1) se pueden perder bases púricas como resultado del cambio en el pH local, 2) se pueden producir fracturas de una hebra o de la doble hebra como consecuencia de fuerzas de cizalla o doblado, 3) determinados agentes químicos del entorno pueden modificar una o más bases, 4) los rayos X ó la luz ultravioleta provocan con frecuencia

la dimerización de dos residuos de timina adyacentes, produciendo un dímero de timina.

Existen tres tipos principales de mecanismos de reparación: el primero, la fotoreactivación enzimática; el segundo llamado proceso de reparación por recombinación. Estos mecanismos se presentan en organismos procariontes. - Un tercer tipo, es la reparación por excisión, el cual se efectúa gracias a la acción secuencial de cuatro actividades enzimáticas. Por ejemplo, si el defecto es un dímero de timina, éste es detectado por una endonucleasa provocando una incisión en el costado 5' del defecto: entonces el segmento defectuoso es sustituido por el par de bases correcto por acción de la DNA polimerasa, previa excisión del segmento defectuoso. Después, la nueva hebra se une por su extremo 3' al extremo 5' del extremo remanente, por acción de la DNA ligasa; mecanismo al que se le ha denominado proceso de "corte, parcheo y soldadura".

En embriones de semillas viejas considerando que el DNA ha sufrido algún daño, la excisión, reparación y ligamiento de bases correctas para corregir una de las cadenas dañadas, podrá efectuarse dependiendo de la actividad de las DNA polimerasas y de la disponibilidad de ATP, lo que se detectará por medio de niveles elevados en la incorporación temprana de timina radioactiva (Osborne, 1982).

Una posible explicación a la presencia de DNA con cortes durante la germinación de semillas viejas, podría ser que la polinucleótido ligasa es dañada funcionalmente durante el almacenamiento, tanto que, los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de desoxirribonucleótidos adyacentes a cada sitio de rompimiento, no sean debidamente unidos (Osborne, 1982). Pauling y Hamm (1969) muestran que en mutantes de E. coli con solo un 4% de la actividad normal de ligasa, la abertura producida por rompimiento de una de las cadenas permanece así por más tiempo de lo normal, originando una alta frecuencia de anomalías en la post-replicación y recombinación.

Cuando la actividad del proceso reparativo es total, la lesión que provoca el rompimiento en una de las cadenas puede entonces ser reparado y continuarse la germinación con una probabilidad muy baja de que pueda presentar alguna mutación.

1.4.2.1 Evidencia de la reparación del DNA en semillas de plantas superiores.

Se tienen referencias de que tanto en semillas viejas, como en aquellas que han sido cosechadas recientemente se lleva a cabo un proceso reparativo durante la germinación temprana, previo a la replicación del DNA, el cual se re-

fleja como un aumento en la incorporación de timina tritida dentro del DNA no replicativo. Esto sucede en semillas de diferentes especies. Estos resultados son aún más claros cuando las semillas han sido irradiadas o tratadas con agentes químicos mutagénicos (Soyfer y Ciemenis 1974; Yamaguchi y Naito 1975).

Mory (1972) sugiere que existe una fase de activación de los procesos bioquímicos relacionados con la síntesis de DNA y que éstos procesos incluyen: eliminación de posibles inhibidores, síntesis y/o activación de enzimas participantes, tanto en la replicación del DNA, como en el proceso de reparación que proporcione un molde activo y eficiente.

Tano y Yamaguchi (1977) señalan en su estudio del DNA de núcleos aislados de embriones irradiados, que éste sufre un cambio que va desde predominancia de DNA de bajo peso molecular en general, a un peso molecular mayor durante el período pre-replicativo del DNA, indicando que debe ocurrir un proceso de reparación de las rupturas sufridas en el DNA antes del estado replicativo.

Resultados similares han sido obtenidos por Villers y Edgcumbe (1973) en semillas secas de lechuga que fueron irradiadas y después sometidas a imbibición pero no a germinación.

Gudkov y Grodzinsky (1977) usando técnicas autorradiográficas, reportan que existe un incremento en los niveles de síntesis de DNA, que no corresponden a la replicación del mismo, por no asociarse esa síntesis con la mitosis en los núcleos de semillas de chícharo en germinación, las cuales han sido tratadas con irradiaciones gamma en diferentes dosis en estado seco.

Dell'Aquila y Osborne (1977) en su estudio sobre semillas de centeno, indican que la síntesis temprana de DNA, no replicativa, ocurre de manera normal tanto en embriones frescos con un 95% de germinación como en embriones de semillas envejecidas con un 52% de germinación y que ésta síntesis es inicialmente significativamente alta.

Valeminsky y Gichner (1978) señalan que los embriones de semillas poseen un sistema reparativo activo del DNA.- Cuando el DNA de semillas secas ha sido dañado por agentes físicos o químicos, los sistemas de reparación actúan solo cuando los embriones han sido re-hidratados.

En tejidos de plantas superiores, hidratadas y por tanto activas metabólicamente, los mecanismos de reparación parecen estar en contínua operación, por ejemplo, protoplastos de zanahoria expuestos a irradiación gamma, la reparación de fragmentos de cadena sencilla en el DNA, analizados por gradientes alcalinos de sacarosa, muestran

que el 50% del daño causado en una de las cadenas del DNA, es reparado en solo 5 minutos y la reparación total de la molécula del DNA, se alcanza después de 1 hora (Howland,-Hart y Yette 1985):

Que el mecanismo de reparación no es totalmente efectivo en semillas viejas se hace evidente, dado el alto nível de aberraciones cromosómicas observadas en puntas de raíz durante la germinación, y del gran número de anomalías presentes en las plantas originadas por éstas semillas. Una vez que las mutaciones pasan a línea germinal, se convierten en mutaciones heredables. Por otra parte, si el número de rompimientos ocurre en sitios próximos en una de las cadenas del DNA de semillas viejas, el daño puede entonces ser considerado de manera similar al daño que --provoca el rompimiento de las dos cadenas. Esto, asociado a la actividad de ligasa afectada, aumenta la probabilidad de que ocurra una mutación. Mientras que el daño a cadena sencilla puede repararse con mayor fidelidad y menor riesgo a la ocurrencia de errores. Cortes cercanos producidos en cadenas opuestas pueden conducir a lesiones letales o a que la reparación tienda altamente a la posibilidad de que ocurra erróneamente (Osborne, 1982).

Puede entonces concluirse, que al no detectarse proceso sintético en semillas secas, cualquier daño o lesión--

al DNA que se acumule durante el estado seco, requerirá - de una reactivación de los procesos reparativos durante - la imbibición, antes de poder iniciar el proceso de repli - cación. La efectividad y fidelidad del proceso reparativo dependerá entonces de qué tan íntegras se encuentren las - enzimas reparativas después del almacenamiento, y de la - integridad general de la molécula del DNA.

1.4.3 Naturaleza del daño al DNA en semillas de baja via - bilidad.

Partiendo de la observación de que la disminución de - viabilidad es acelerada por altos grados de humedad y tem - peratura, se excluye la probabilidad de que el daño al DNA se pueda asociar a mecanismos al azar. Se cree que la ac - ción de nucleasas, es el camino más probable por el cual - el DNA se ha reducido a fragmentos de bajo peso molecular.

Realmente se ha demostrado una alta actividad de DNAsa en la fracción TCA-insoluble de extractos de embriones no viables, en comparación con los embriones viables. Sin em - bargo, tanto endo como exonucleasas pueden estar involu - cradas en la degradación del DNA.

Roberts y Osborne (1983) señalan que la degradación - por exonucleasas in vivo muestra ser mínima, comparada con el grado de fraccionamiento de la molécula del DNA que ocu - rre con la baja viabilidad.

El análisis electrofóretico del DNA en embriones no viables, indica las siguientes posibilidades como explicación de la fragmentación del DNA; a) la actividad sólo de exonucleasas, b) la combinación de endo y exonucleasas y c) la acción sólo de endonucleasas. Esto ocurre quizá en las regiones de la cromatina en las cuales la estructura del nucleosoma ha sido alterada.

Pruebas de nucleasas en embriones de centeno practicadas repetidamente muestran que la actividad de DNAsas sobrenadantes post-ribosomales de lotes de igual número de embriones, es más baja en embriones viables que en embriones no viables. Además, un análisis del contenido proteico en cada lote de embriones refleja una mayor cantidad de DNAsas en sobrenadantes post-ribosomales de embriones no viables que en sobrenadantes de embriones viables. La falta de evidencias de que ocurra síntesis de proteínas en embriones secos, conduce a suponer que de alguna manera está ocurriendo la activación de alguna enzima pre-existente en forma latente o de una estabilidad preferente de nucleasas en embriones no viables (Cheah, 1975).

Analizando la actividad durante el almacenamiento de las semillas, de DNAsas en sobrenadantes post-ribosomales, tanto de embriones viables como no viables, al actuar sobre DNA como sustrato se observó que la actividad de DNA-

sa en embriones no viables, es mayor dado el incremento en la degradación del DNA. Por ésto se sugiere que no existe activación de DNAsa durante la imbibición y que el daño - causado al DNA ocurre por acción continua de éstas enzi - mas durante el almacenamiento en seco de las semillas (Cheah y Osborne, 1977).

Para dos lotes de embriones viables y no viables, empleados durante el análisis de la actividad de endo y exo nucleasas, la actividad de DNAsa en sobrenadantes de embriones no viables se reduce en un 50% por adición de una alícuota de sobrenadante post-ribosomal de embriones viables bajo condiciones en que las proteínas estaban en concentración similar a la que se detectó cuando se determinó la actividad de nucleasas. Sobrenadantes de otros lotes de semillas viables, también reducen la actividad de nucleasas de sobrenadantes de embriones no viables en experimentos mixtos; sin embargo, no se logra una inhibición total de DNAsa de embriones no viables, y la propiedad inhibitoria de los sobrenadantes de los embriones viables se puede destruir por calentamiento.

Fraccionamientos en Sephadex G25, han indicado que la diferencia de actividades de DNAsas entre embriones viables y no viables es debida a la presencia de un inhibidor de alto peso molecular, y no a uno de bajo peso molecular,

que se encuentra presente en embriones viables y ausente en embriones no viables (Cheah, 1975). Esta conducta ya ha sido reportada antes por Zamenhof y Chargaff (1949) quienes indican que en levaduras, tanto DNAsa como un inhibidor de la misma, están presentes en la fracción nuclear.

La actividad de DNAsas en los embriones de centeno es probable que se le localice en los núcleos, dado que el DNA de éstos embriones es fragmentado en estado seco en semillas almacenadas aún con un 10% de humedad.

De manera predictiva Williams, et. al. (1974) señalan que la acumulación de rompimientos en los embriones de las semillas secas, ha de ser un proceso lento y progresivo en contraste con lo observado en células hidratadas.

1.5 Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz con viabilidad de germinación.

Miranda Ham, L. (1984) en su tesis de licenciatura, reporta que en ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad, se observa una serie de rompimientos o fragmentaciones del DNA a nivel molecular, lo que también fue observable en ejes embrionarios de semillas tratadas con luz ultravioleta, ya que a la vez éstas semillas reflejan una fuerte caída en su viabilidad. Esto sugiere que de alguna manera, el fraccionamiento de la molécula del DNA esta re

lacionada con la baja viabilidad de las semillas de maíz.

Por otra parte, se sugiere que antes de iniciarse el proceso replicativo del DNA, tanto en ejes embrionarios - de semillas de baja viabilidad como en aquellos en que se ha inducido el daño al DNA, debería presentarse un proceso de tipo reparativo durante las primeras horas de imbibición, de modo que se pudiera continuar con el proceso germinativo.

Resultados del análisis de la incorporación de precursores radioactivos del DNA, muestran un incremento en la síntesis temprana del DNA y especula que dicha síntesis - probablemente corresponda a una de tipo reparativo, como consecuencia del daño que ha sufrido el DNA durante el almacenamiento de las semillas o bien debido a la irradiación por luz ultravioleta (Miranda Ham, L., 1984).

II. OBJETIVO.

El objetivo de éste trabajo es el de determinar el comportamiento de lotes de semillas sometidas a diferentes condiciones de temperatura y/o humedad en cuanto a su capacidad de germinación, considerando para ello los términos de viabilidad y capacidad de crecimiento; igualmente determinar la integridad del DNA y la capacidad de síntesis del mismo por las células, como una posible explicación de la disminución en la viabilidad de éstas semillas.

Al analizar la capacidad de síntesis de las células de ejes embrionarios de maíz, no se está determinando, si ésta síntesis es de tipo reparativo o replicativo, solo se considera que hay o no síntesis de DNA en base a la incorporación de un precursor marcado radioactivamente a la fracción TCA-insoluble, en ejes embrionarios.

Como base para el presente trabajo, se han considerado los estudios realizados por Osborne, et. al. (1975----1983) en semillas de centeno, en los que se relacionan --viabilidad, vigor, integridad del DNA, síntesis de DNA, RNA y proteínas. Se parte de la observación de que la baja viabilidad de semillas viejas que han sido almacenadas por períodos largos en estado seco, de alguna manera se relacionan con el daño producido en la integridad de su -

DNA, como lo reporta Osborne (1982), en su estudio con se millas de centeno.

Nosotros tratamos de determinar si se puede estable - cer éste tipo de relación en semillas deterioradas por mé todos artificiales.

Para el desarrollo de éste trabajo, se siguió la se - cuencia que se presenta a continuación:

A) Determinación de las condiciones de humedad y tempera - tura que reflejan un mayor efecto, en cuanto a capacidad - de germinación de las semillas.

B) Análisis del patrón de fragmentación del DNA para cada lote de semillas tratadas, mediante gradientes alcalinos - de sacarosa.

C) Análisis de la capacidad para efectuar síntesis de DNA en embriones de semillas, mediante la cuantificación del - material radioactivo incorporado durante diferentes tiem - pos de imbibición, a los ejes embrionarios de las semillas ya tratadas.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Materiales.

3.1.1 Material biológico.

Las semillas de maíz utilizadas durante el desarrollo de éste trabajo, corresponden a la clase de maíz llamado chalqueño, proporcionado al Departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, por la Productora Nacional de Semillas -- PRONASE, SARH.

3.1.2 Soluciones amortiguadoras y reactivos.

3.1.2.1 Solucion amortiguadora de imbibición.

KCl	50mM
MgCl ₂	10mM
Tris-HCl pH 7.6	50mM
Sacarosa	2%
Cloranfenicol	50µg/ml
³ H-timidina	5µCi/ml

3.1.2.2 Líquido de centelleo.

(1,4-bis(2-(5Feniloxazolinil)))Benceno(M ₂ POPOP)	0.1g
2,5 Difeniloxazol (PPO)	5.0g
Tolueno	1:1

3.1.2.3 Solución amortiguadora A

Sacarosa	0.3M
KCl	10mM
NaCl	15mM
2-mercaptoetanol	15mM
Tris-HCl pH 7.4	15mM
Espermina	0.15mM
Espermidina	0.5mM

3.1.2.4 Capa de lisis (pH 13)

EDTA	10mM
NaCl	0.4mM
NaOH	0.15mM

3.1.2.5 Solución para gradiente de sacarosa (pH 13)

NaOH	0.3mM
EDTA	10mM
NaCl	0.7mM

3.2 Métodos.

3.2.1 Curva de síntesis de DNA (Incorporación de timidina marcada a material TCA-insoluble en ejes embrionarios de semillas de maíz, durante diferentes períodos de imbibición).

3.2.1.1 Imbibición de los ejes embrionarios.

Se emplearon lotes de 10 ejes embrionarios para cada-

tiempo de incubación; éstos fueron pesados previamente y después se desinfectaron con NaClO (0.5%) por treinta segundos, después lavados extensivamente con agua destilada estéril.

Cada lote de 10 ejes embrionarios se colocó entonces entre dos discos de papel filtro estériles, en viales también estériles. Se humedecieron con 250ul de solución amortiguadora de imbibición (3.1.2.1). Posteriormente se incubaron a 27°C por diferentes períodos de tiempo. Después de cada período de incubación, los papeles filtro fueron removidos y los embriones se lavaron con 10ml de citrato de sodio (1%) que contenía timidina no radioactiva (20ug/ml) y después con etanol al 80% (10ml), que contenía también 20ug/ml de timidina no radioactiva.

Los ejes embrionarios fueron secados con vacío y nuevamente pesados.

Si las muestras no se procesaban inmediatamente, éstas eran guardadas en tubos de ensayo a -70°C.

3.2.1.2 Cuantificación del precursor marcado, incorporado a DNA.

Cada lote de ejes embrionarios fue colocado en morteros previamente enfriados y trabajando en baño de hielo, se homogeneizaron con etanol al 80% (2ml) que contenía ti

midina no radioactiva (20µg/ml). Después los homogenados obtenidos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante fue desechado y el sedimento fue re-suspendido con NaOH 1N (0.5ml) calentandose en baño Ma. a 92°C por 3 minutos. Las muestras se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente y posteriormente fueron colocadas en un baño de hielo, entonces se les añadió ácido-tricloroacético al 10% (2ml), se dejaron las muestras en el hielo por 15 minutos, después se centrifugaron a 600 rpm por 30 segundos y se filtraron a través de un sistema Millipore, utilizando filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio (2.4cm); se realizaron dos lavados, primero con TCA al 5% (5ml) y después con etanol al 96% (10ml).

Los filtros se secaron a 60°C por una hora y fueron transferidos entonces a viales que contenían líquido de centelleo (3.1.2.2) (5ml), y se determinaron las cuentas por minuto en un contador de centelleo líquido Packard-Tri Carb.

Los resultados presentan el promedio de varios experimentos similares.

3.2.2 Determinación de los patrones de fragmentación del DNA.

Lotes de 400mg de ejes embrionarios (80 ejes embriona

rios aprox.) fueron homogeneizados en morteros previamente enfriados, con 3ml de la solución amortiguadora A (3.1.2.3). Debe tenerse en cuenta que se está realizando la extracción de núcleos y que por tanto la homogeneización debe ser suavemente. El homogenado fue diluído posteriormente a 10ml con solución amortiguadora A (3.1.2.3); las muestras homogenadas se filtraron a través de tres capas de Miracloth. Se añadió entonces a los filtrados triton X-100-hasta 0.05% para la liberación de los núcleos; el filtrado se agitó suavemente y se centrifugó a 625 rpm por 6 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se resuspendió con 0.2ml de la solución amortiguadora A. Una vez-resuspendida la pastilla, se añadieron 0.8ml de la solu-ción de lisis pH 13 (3.1.2.4). Las muestras fueron colocadas en condiciones de oscuridad para su incubación, por un período no menor de dos horas.

Después del tiempo de incubación, el lisado fue colo-cado con una pipeta sobre un gradiente alcalino de sacarosa 5-20% en solución para gradientes (3.1.2.5). El gradiente se centrifugó en un rotor Beckman SW 25.1 a 12,000 rpm durante 14 $\frac{1}{2}$ horas.

Fracciones de 1.2ml aprox. fueron colectadas y poste-riormente se realizó el ensayo de difenilamina para la determinación de DNA.

3.2.3 Ensayo de difenilamina para la determinación de DNA (Giles y Myers 1965) (Se hicieron algunas modificaciones en lo referente a la cantidad de reactivos, tiempo de incubación y temperatura; en base a la experiencia en el Lab. por el Dr. Jorge Vázquez Ramos).

Se tomaron 0.6ml de muestra de cada fracción colectada y se les adicionó 0.6ml de una solución al 20% de ácido perclórico para alcanzar una concentración del 10% en la mezcla de reacción a la que se le añadió también 1.2ml de difenilamina al 4% en ácido acético glacial y 50ul de acetaldéhidó en ácido acético glacial (1.6g/ml). Las muestras se incubaron a 30°C durante toda la noche, después, fueron tomadas las lecturas de absorbancia a dos longitudes de onda: 595 nm y 700 nm para considerar finalmente la diferencia de absorbancias entre éstas dos longitudes de onda. Se tomó como blanco un tubo con los diferentes reactivos, pero sin muestra de DNA.

Los resultados muestran el promedio de varios experimentos similares.

IV. RESULTADOS.

4.1 Determinación de viabilidad y capacidad de crecimiento.

El almacenamiento de semillas de maíz chalqueño en condiciones de alta temperatura por diferentes tiempos y alta humedad, realizados en el laboratorio, han reflejado grandes cambios en la capacidad de germinación y de crecimiento de éstas semillas.

Para el tratamiento de semillas con altas temperaturas, éstas se colocaron en cajas petri y se incubaron en estado seco a diferentes temperaturas, por distintos períodos de tiempo.

El tratamiento con humedad consistió primeramente en desinfectar las semillas. Para ello cada lote fue lavado con una solución al 2% de NaClO por 5 minutos, después se enjuagaron varias veces con agua corriente y se secaron perfectamente, para posteriormente ser colocadas en estado seco en cajas petri y éstas en un recipiente con el fondo cubierto de agua para crear una atmósfera con una humedad relativa del 100%.

Después de cada tratamiento las semillas fueron colocadas en un recipiente que contenía agrolita (soporte inerte y suficiente para proporcionar las condiciones necesarias para la germinación) y se dejan germinar por 7 días,

regándolas diariamente. Al cabo de 7 días de germinación, se calculó el porcentaje de semillas que germinaron, considerando que una semilla ha germinado, cuando se observa macroscópicamente protrucción de radícula. También se consideró la capacidad de crecimiento de cada semilla y consistió en determinar la longitud promedio del tallo de las semillas que germinaron, así como los cambios en peso -- fresco y peso seco de los tallos.

De los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las semillas, se seleccionaron a aquellos que causaron un efecto detectable o muy marcado en la viabilidad y capacidad de crecimiento de las semillas.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No.1, en la que podemos observar el efecto sobre la viabilidad y capacidad de crecimiento de las semillas causado por el tratamiento a que fueron sometidas las semillas y encontramos que el efecto depende tanto de las condiciones de humedad y temperatura como del tiempo de duración del tratamiento.

Una observación general, es que en todos los casos -- primero se ven afectadas las semillas en su capacidad de crecimiento y posteriormente al prolongar el tiempo para un mismo tratamiento, el efecto se refleja como una disminución tanto en la capacidad de crecimiento como en la

viabilidad de las semillas.

Tabla No.1 Resultados de viabilidad y capacidad de crecimiento de diferentes lotes de semillas sometidas a condiciones de altas temperaturas y/o humedad, para posteriormente ser sometidas a condiciones de germinación por 7 días.

Tratamiento	Viabilidad (%)	Capacidad de crecimiento (%)
1 día a 60°C	90	81
2 días a 60°C	60	70
3 días a 50°C	80	74
3 días en humedad a 40°C	90	74
6 días en humedad a 40°C	56	59
3 días en humedad a temp. ambiente	92	84.3
6 días en humedad a temp. ambiente	71.4	69.7
Ninguno	+ 95	100

4.2 Determinación de los patrones de fragmentación de las semillas sometidas a tratamientos con humedad y/o temperatura.

Para tratar a las semillas de las que posteriormente se habría de analizar la integridad de su DNA y capacidad de síntesis de DNA, ésta última, medida como la incorporación de ^3H -timidina a material TCA-insoluble, se sigue el mismo procedimiento antes mencionado al inicio de éste capítulo, para los tratamientos con humedad y/o temperatura.

El propósito de analizar la integridad del DNA de las semillas en estudio, fue el tratar de demostrar que el tratamiento a que fueron sometidas, se produciría un defecto, el cual se manifestaría mediante la presencia de fragmentos de DNA de bajo peso molecular, al analizar el DNA mediante un gradiente alcalino de sacarosa de 5-20%. El DNA se extrajo de los ejes embrionarios aislados de semillas tratadas en estado seco; ésto es, sin ser sometidas a condiciones de germinación. Se trata de relacionar el grado del efecto producido con el tratamiento recibido.

Para obtener el DNA cromosomal, se realizó la extracción de los núcleos de células de ejes embrionarios. Los núcleos fueron aislados y después de la extracción del DNA y su corrimiento en un gradiente, éste fue cuantificado por medio del ensayo de difenilamina.

Para tener una base de comparación, se hizo primero la determinación de patrones de fragmentación de un lote de semillas de alta viabilidad. En éste caso (fig. No.1) se pudieron observar dos picos, uno de ellos localizado entre las fracciones 17-18, que corresponde a DNA de alto peso molecular, extraído de semillas con alta viabilidad y un segundo pico que se observa en la fracción 22 y que correspondería a DNA de bajo peso molecular, lo que nos podría sugerir que el DNA de éstas semillas muestra una ligera fragmentación de su molécula, aún sin ser sometidas las semillas a tratamiento alguno.

También el patrón de fragmentación de las semillas tratadas con temperatura por 1 día a 60°C se muestra en la figura No. 1. En ella observamos que se presentan dos picos, uno de ellos en la fracción 18 que corresponde a DNA de alto peso molecular y un ligero pico en la fracción 21 que indica que existe también DNA de bajo peso molecular. Por presentar éstas semillas un comportamiento similar al lote control (representado en la misma figura); podría considerarse que el tratamiento al cual fueron sometidas, aparentemente no tiene efecto alguno sobre la integridad del DNA. Por otra parte, se puede observar en la tabla No.1 que principalmente la capacidad de crecimiento de éstas semillas, se encuentra disminuída con respecto a

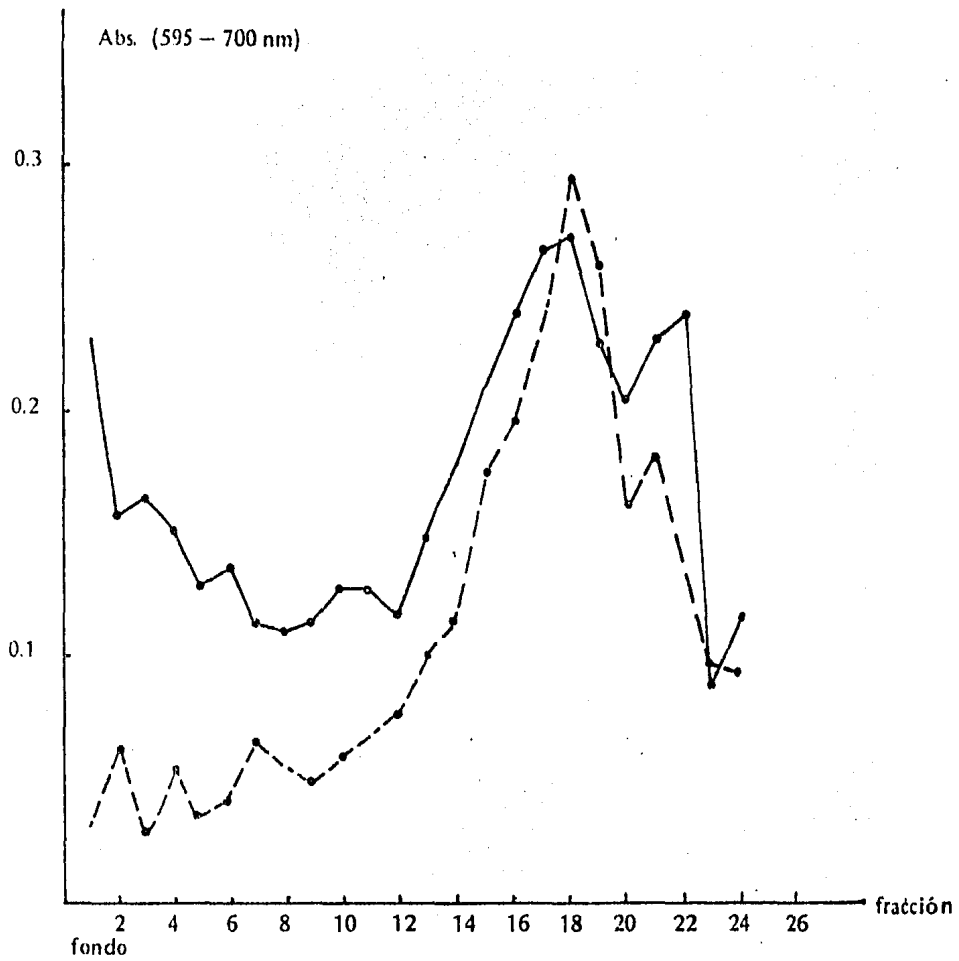


Fig. No. 1 Patrón de fragmentación de la molécula del DNA

1) Embriones de alta viabilidad

control

2) Embriones de semillas tratadas 1 día a 60°C

Lote	Abs.	Fracción
1	0.264	18
2	0.287	18

un lote control (semillas de alta viabilidad), comparando simultaneamente con los otros tratamientos en los que la caída de viabilidad y capacidad de crecimiento son más notorios. Podemos, entonces observar que el tratamiento a 60°C por un día ha tenido poco efecto tanto en la integridad molecular del DNA como en la viabilidad de las semillas.

Para las semillas tratadas a 60°C por dos días, el resultado se presenta en la fig. No. 2 donde podemos observar que la fracción donde se tiene la mayor cantidad de DNA se le localiza en una región de menor peso molecular, esto es entre las fracciones 19 y 22, comparado con el DNA de las semillas control, que se muestran en la misma figura y donde el DNA de alto peso molecular es detectado en la fracción 18. Por ello se puede mencionar que al prolongar el tratamiento a 60°C por dos días, se está produciendo de alguna manera que la molécula del DNA sea fragmentada y por otra parte también la viabilidad y capacidad de crecimiento han sido notablemente afectadas como se puede observar en la tabla No.1 para las semillas tratadas dos días a 60°C .

En la fig. No.3 se muestra el resultado para las semillas tratadas 3 días a 50°C , donde tenemos que su DNA corresponde a DNA de bajo peso molecular, pico 23 comparado con el DNA de las semillas de alta viabilidad. Por tanto-

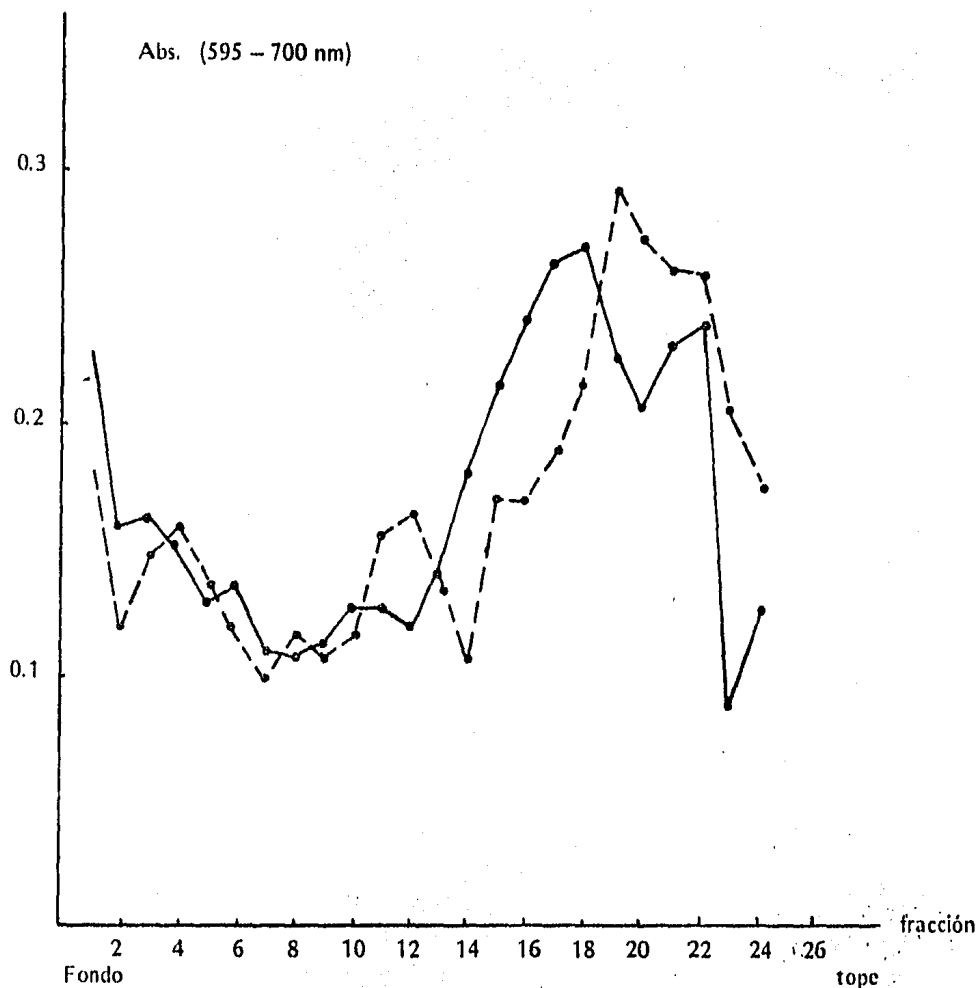


Fig. No. 2 Patrón de fragmentación de la molécula del DNA

1) Embriones de alta viabilidad

control ———

2) Embriones de semillas tratadas 2 días a 60°C

Lote	Abs.	Facción
1	0.264	18
2	0.290	19

se puede pensar que se ha producido fragmentación de la molécula. Sin embargo no podemos asegurar de que haya realmente fragmentación molecular, dado que el experimento no pudo realizarse repetidamente, puesto que se tuvo que dar de baja el rotor que se había venido utilizando y no se contaba con otro que cubriera las necesidades requeridas.

Por otra parte los resultados reportados en la tabla No.1 nos muestran que el tratamiento ha afectado tanto la viabilidad como capacidad de crecimiento de éstas semillas, siendo mayormente afectada la capacidad de crecimiento.

De acuerdo a los resultados observados para las semillas que han recibido diferentes tratamientos al de las semillas tratadas 3 días a 50°C, quizá podamos especular que la molécula del DNA ha sido fragmentada, dada la disminución en la viabilidad y capacidad de crecimiento que muestran éstas semillas. Sin poder determinar el grado de ruptura de la molécula.

El deterioro causado a las semillas tratadas a 40°C. con una humedad relativa del 100%, podría deberse a las condiciones de humedad, o más bien que el daño producido fuera el resultado de ambos factores; humedad y temperatura, que al aplicarse simultáneamente, se tiene un mayor efecto sobre la viabilidad y capacidad de crecimiento de éstas semillas. Esta suposición surge del hecho de que --

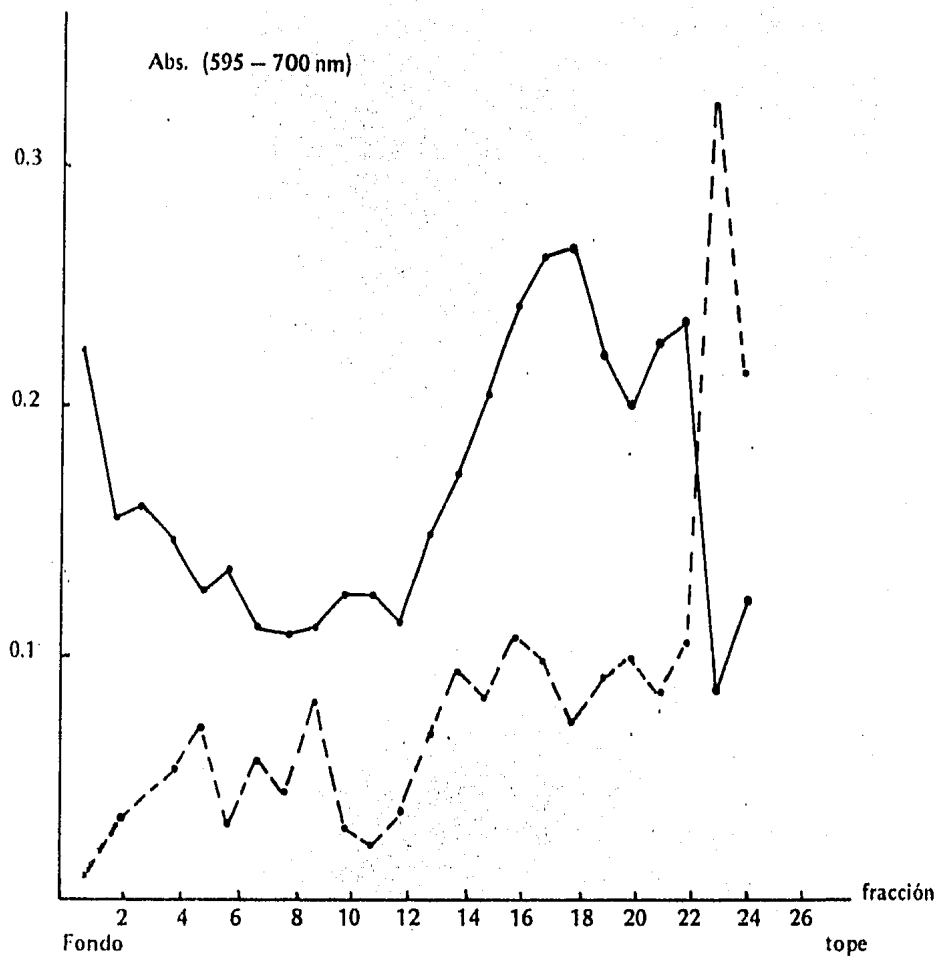


Fig. No. 3 Patrón de fragmentación de la molécula del DNA

1) Embriones de alta viabilidad

control ———

2) Embriones de semillas tratadas 3 días a 50°C

Lote	Abs.	Fracción
1	0.264	18
2	0.330	23

los resultados de viabilidad y capacidad de crecimiento de las semillas tratadas a 40°C sin humedad, reflejan que el tratamiento parece no tener efecto alguno sobre estos parámetros, (resultado no reportado).

Por otra parte al analizar la integridad molecular del DNA de las semillas tratadas a 40°C y humedad relativa del 100% por un período de 6 días, se identifica un pico en la fracción 20 que corresponde a DNA de bajo peso molecular, en comparación con el DNA de las semillas control, cuyo DNA que es de alto peso molecular, se le ha encontrado en la fracción 17-18.

El análisis de la integridad del DNA para éstas semillas se muestra en la fig. No.4 donde encontramos el resultado para las semillas tratadas por 6 días en humedad a 40°C. También se extrajo los ejes embrionarios de semillas tratadas por 3 días en humedad a 40°C, pero los resultados encontrados reflejan que la aplicación de éste tratamiento por 3 días, parece no tener efecto sobre la integridad molecular del DNA, (resultado no reportado).

Un tratamiento más consistió en someter a las semillas a una atmósfera relativa del 100% y a temperatura ambiente.

Aquí resulta conveniente mencionar que estas semillas fueron sometidas a temperatura constante de 24-25°C duran

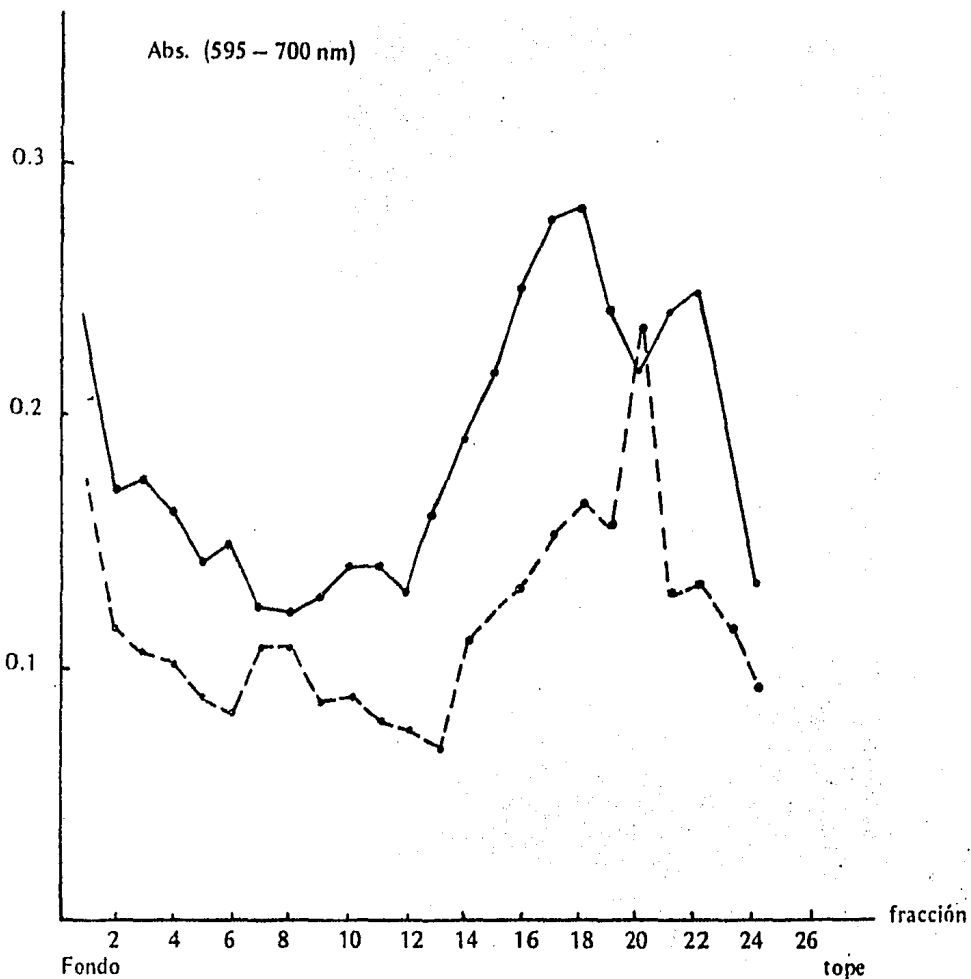


Fig. No.4 Patrón de fragmentación de la molécula del DNA

- 1) Embriones de alta viabilidad control
 - 2) Embriones de semillas tratadas 6 días
 en humedad a 40°C
- | Lote | Abs. | Fracción |
|------|-------|----------|
| 1 | 0.264 | 18 |
| 2 | 0.225 | 20 |

te el tiempo del tratamiento. Los resultados para éstas - semillas se pueden observar en la fig. No.5 donde encontramos un pico en la fracción 18, que corresponde a DNA de alto peso molecular, dado que el resultado para las semillas control muestra también el DNA de alto peso molecular en la fracción 17-18, lo que indica que el efecto del tratamiento no ha sido sobre la integridad del DNA de éstas semillas. A la vez al analizar la viabilidad y capacidad de crecimiento de éstas semillas, encontramos que el efecto producido por el tratamiento a temperatura ambiente y una humedad relativa del 100%, se detecta muy ligeramente sobre los parámetros de viabilidad y capacidad de crecimiento tanto al aplicarse el tratamiento por 3 días como por 6 días.

En lo que se refiere a la integridad molecular del DNA los resultados indican que no se tiene ruptura del DNA, puesto que se tiene el DNA de alto peso molecular en la misma fracción que las semillas de alta viabilidad. Los resultados se muestran solo para las semillas tratadas 3 días en humedad a temp. ambiente en la fig. No.5

4.3 Determinación de la incorporación de ^3H -timidina a material insoluble en TCA, (determinación de la síntesis de DNA).

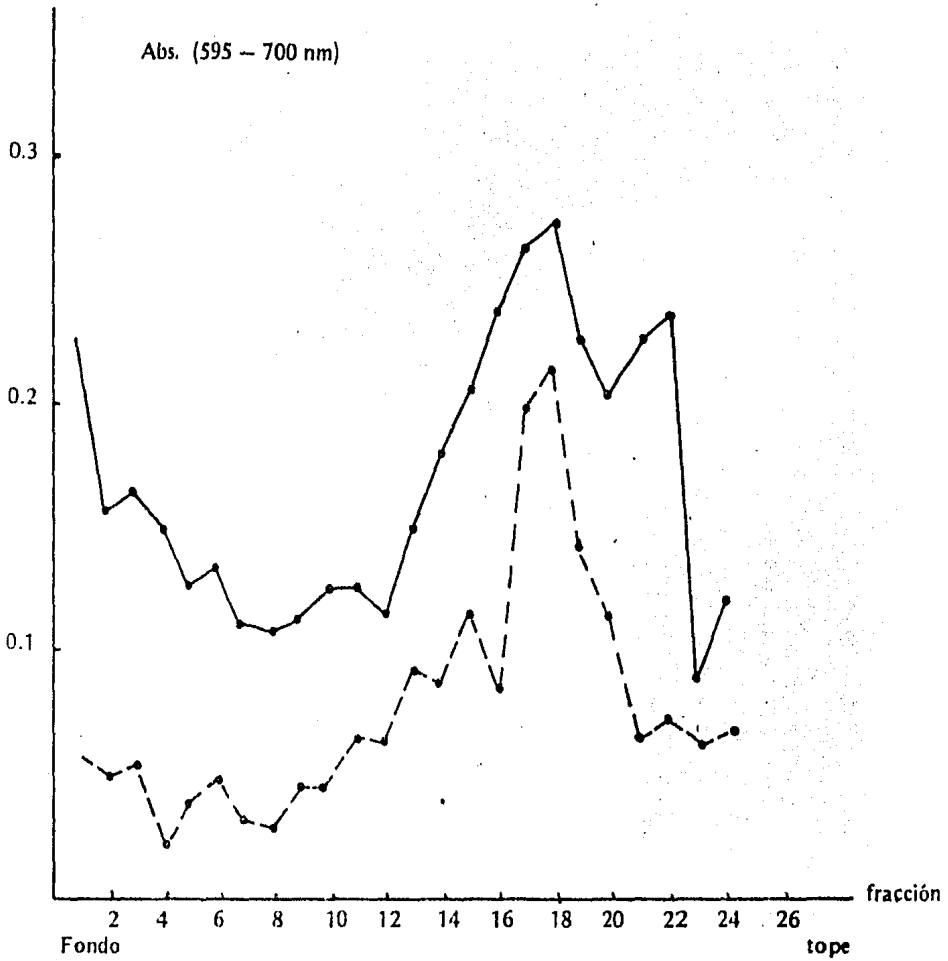


Fig. No. 5 Patrón de fragmentación de la molécula del DNA

1) Embriones de alta viabilidad

control ———

2) Embriones de semillas tratadas 3 días

en humedad a temp. ambiente

Lote	Abs.	Fracción
1	0.264	18
2	0.215	18

Se determinó la capacidad de síntesis de DNA, mediante la cuantificación de la incorporación de ^3H -timidina a material TCA-insoluble, durante la imbibición de los ejes embrionarios a diferentes períodos de tiempo, de las semillas tratadas 1 y 2 días a 60°C , 3 días a 50°C , 3 y 6 días en humedad a 40°C , 3 y 6 días en humedad a temp. ambiente. Esto se hace con el propósito de tratar de asociar el daño al DNA con la capacidad de síntesis del mismo en las semillas tratadas y con el efecto en viabilidad y capacidad de crecimiento.

Los períodos de tiempo a los que se analizó la cantidad de ^3H -timidina incorporada, fueron: 0,5,10 y 15 horas de imbibición.

Para los ejes embrionarios de las semillas control, encontramos que se tiene un constante incremento en la incorporación de timidina marcada desde el tiempo 0 hasta las 15 horas de imbibición. Estos resultados se muestran en la fig. No.6 donde además se reportan los resultados encontrados para las semillas tratadas 1 y 2 días a 60°C .

Como se puede observar, la incorporación de timidina-marcada en las semillas tratadas 1 día a 60°C , comienza lentamente incrementandose la incorporación después de las 10 horas, sin alcanzar, no obstante los niveles obtenidos para las semillas control. Por otro lado, el tratamiento-

Incorporación de Timidina - (^3H) (cpm $\times 10^2$)

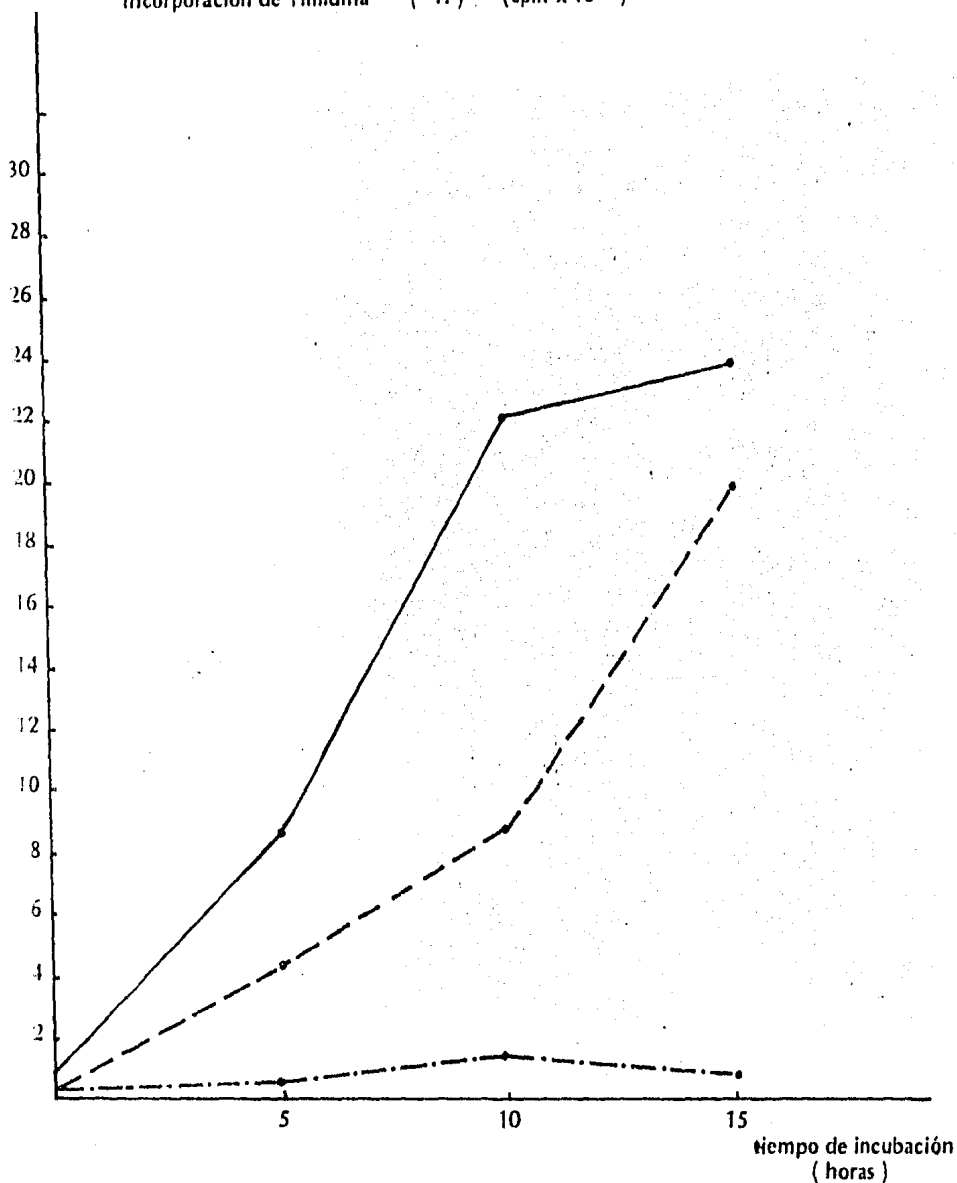


Fig. No. 6 Curva de síntesis de DNA

Embryones de semillas de alta viabilidad

Embryones de semillas tratadas 1 y 2 días a 60°C

control

Respectivamente



por 2 días a 60°C, produce una gran disminución en la capacidad de incorporación de ³H-timidina a material TCA-insoluble de éstas semillas. De hecho, se podría decir que los ejes embrionarios de éstas semillas son incapaces de sintetizar DNA durante el período estudiado.

En la fig. No.7 se reporta el resultado para las semillas tratadas 3 días a 50°C, presentandose una cinética - similar al lote control hasta las 5 horas; después parece presentarse una disminución en la cinética de incorporación del material radioactivo entre las 5 y 10 horas, -- comparando con el incremento observado en las primeras 5 horas, para posteriormente presentarse un aumento hasta - alcanzar casi los niveles de las semillas control. Esta - gráfica nos señala que si no existe una cinética igual entre las semillas control y las semillas tratadas, sí parece haber una recuperación en la capacidad de síntesis de éstas semillas.

Para las semillas tratadas con humedad a 40°C por 3 y 6 días, se tiene una total inhibición en la incorporación de timidina marcada, durante las 15 horas de imbibición, - sin mostrar en ningún momento de éste período, recuperación alguna en dicha capacidad, fig. No.8

Los resultados obtenidos en ejes embrionarios en condiciones de humedad a temp. ambiente, al ser analizados, -

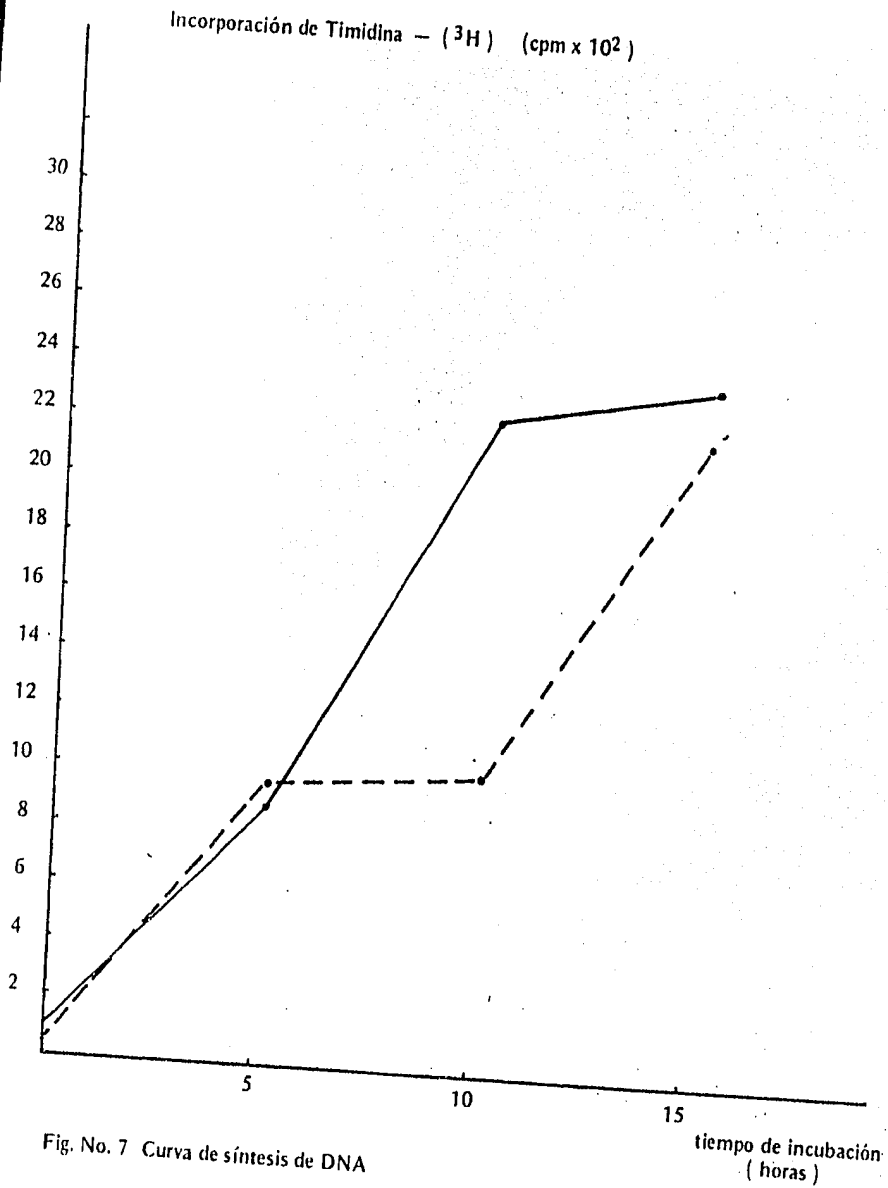
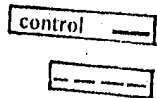


Fig. No. 7 Curva de síntesis de DNA

Embriones de semillas de alta viabilidad

Embriones de semillas tratadas 3 días a 50°C



Incorporación de Timidina - (3H) (cpm x 10^2)

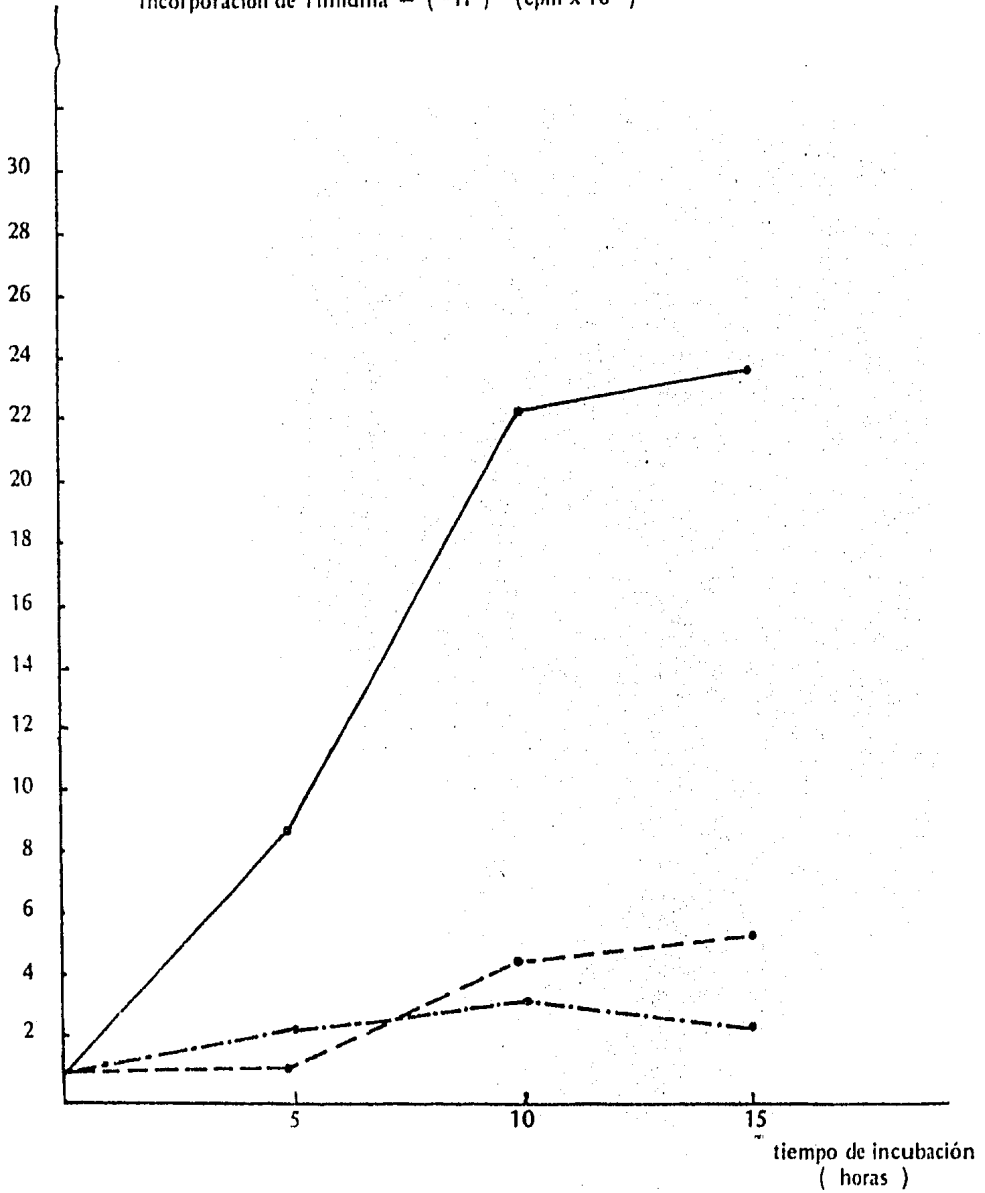


Fig. No. 8 Curva de síntesis de DNA

Embriones de semillas de alta viabilidad

control —

Embriones de semillas tratadas 3 y 6 días

en humedad a $40^{\circ}C$

-.-.-

Respectivamente

nos muestran que el efecto producido sobre la capacidad de síntesis de DNA, no es significativo, ya que se tienen cinéticas muy similares para los tres lotes de semillas; - control, 3 y 6 días en humedad, resultados que se muestran en la fig. No.9.

4.4 Determinación de la integridad del DNA por electrofóresis,

Análisis de la integridad molecular del DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C y 6 días en humedad a 40°C por corrimiento electrofóretico, fueron realizados por Sergio López M. Los resultados revelaron que éstos tratamientos a los que fueron sometidas las semillas tienen gran efecto sobre la integridad del DNA, produciendo una serie de fragmentaciones que se manifiestan como un barrido observable en geles de agarosa. Este barrido es significativo de las rupturas sufridas por el DNA de semillas tratadas. El DNA de semillas control, por otro lado, se muestra como una banda intensa que escasamente se mueve del punto de aplicación. Este resultado puede observarse en la fig. No.10. En ella encontramos que el barrido fue mayor para el DNA de semillas tratadas 6 días en humedad a 40°C, lo que sugiere que el número de fragmentaciones de la molécula

Incorporación de Timidina - (^3H) (cpm $\times 10^2$)

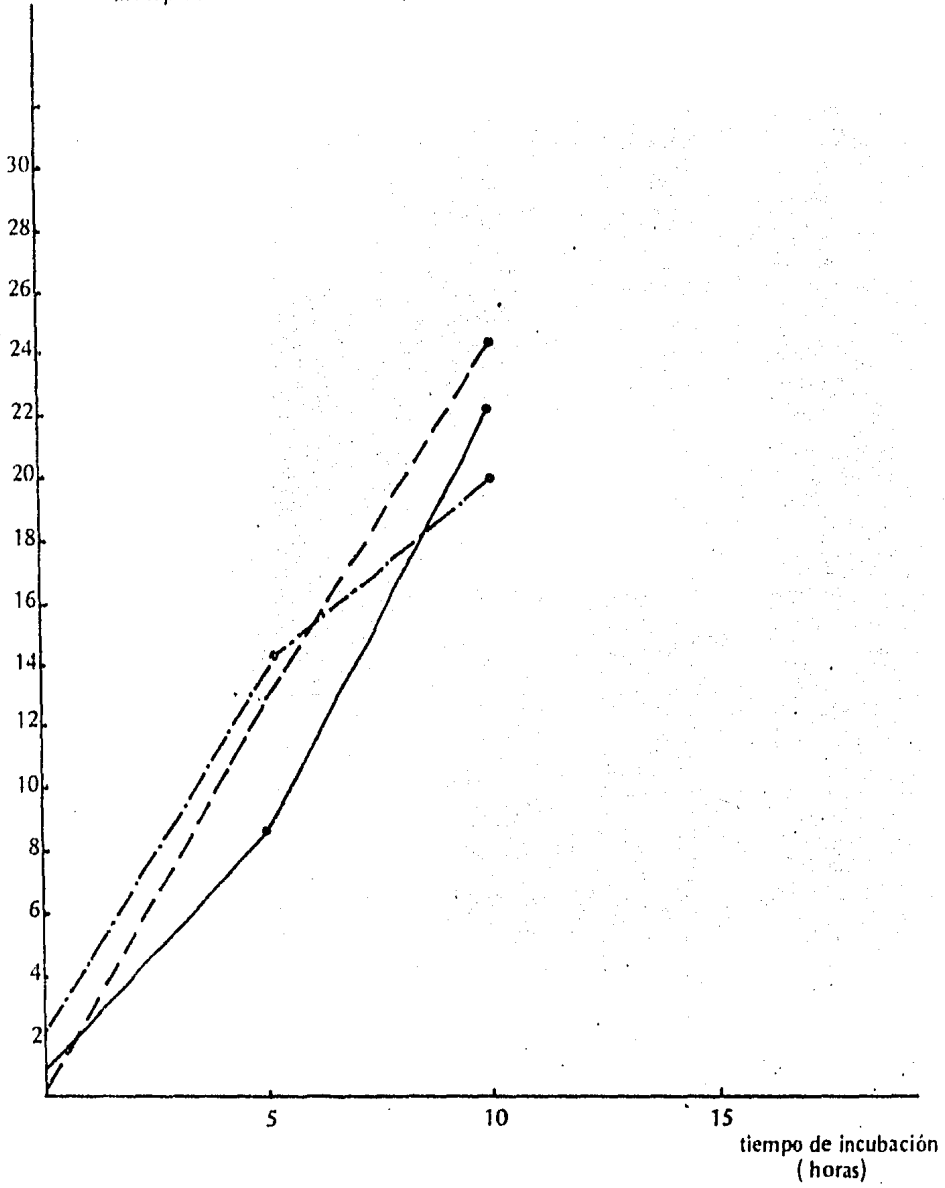


Fig. No. 9 Curva de síntesis de DNA

Embriones de semillas de alta viabilidad

control —

Embriones de semillas tratadas 3 y 6 días

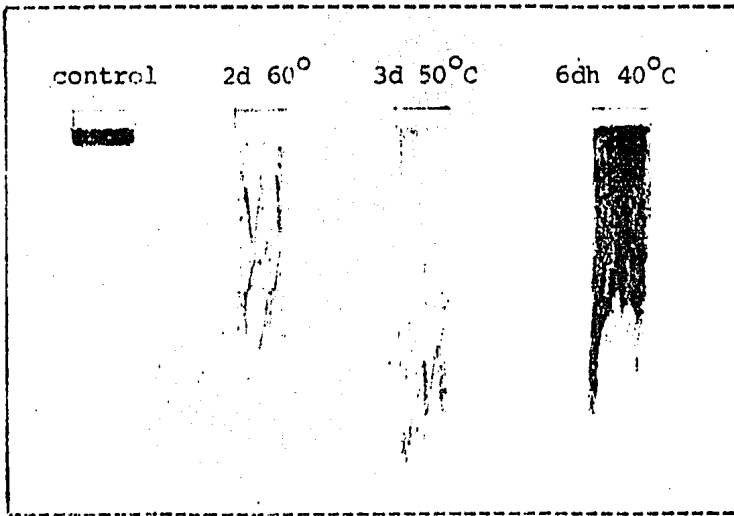
en humedad a temp. ambiente

- · - · -

Respectivamente

del DNA es mayor en éstas semillas, que en aquellas tratadas 2 días a 60°C.

Fig. No.10 Resultado de análisis de la integridad molecular del DNA de semillas control y de semillas tratadas 2 días a 60°C y 6 días en humedad a 40°C, por corrimiento electrofóretico en geles de agarosa.



La técnica a seguir para éste análisis, consistió primeramente en la extracción de los núcleos de ejes embrionarios de lotes de semillas secas, que habían sido tratadas dos días a 60°C, 3 días a 50°C y 6 días en humedad a 40°C.

La metodología seguida hasta la extracción de núcleos, se realizó como se describe en el capítulo de materiales y métodos en la sección (3.2.2). Posteriormente a la extracción de núcleos se continuó con la digestión alcalina por 2 ó 3 horas, aislamiento y resuspensión del DNA en buffer de citratos (pH 7.6). Enseguida se efectuó una desproteinización por extracciones repetidas con una mezcla de solventes: cloroformo-isopropanol (24:1) para remover a las proteínas y posteriormente diálisis del material obtenido.

Para la electrofóresis se utilizaron geles de agarosa al 0.4%. Después de un corrimiento por 2 a 2½ horas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y las bandas de DNA se revelaron con luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos por Sergio López, corroboran los obtenidos y reportados en ésta tesis, en lo referente a la fragmentación molecular del DNA para las semillas tratadas: 2 días a 60°C, 3 días a 50°C y 6 días en humedad a 40°C.

V. DISCUSION.

Los resultados que se observaron en la tabla No. 1 se puede analizar tratando de relacionarlos con los resultados obtenidos en los estudios tanto de la integridad del DNA, como de la capacidad de incorporación de timidina ra dioactiva en el DNA de los ejes embrionarios de semillas-tratadas.

Aparentemente, la disminución en la capacidad de creci miento de las semillas no tiene efecto alguno en la integridad del DNA. Esto se observa tanto por gradientes de -sacarosa, como por geles de agarosa como lo muestran las-semillas que fueron tratadas 2 días a 60°C y 6 días en hu medad a 40°C. Sin embargo, cuando aparte de la disminu --ción en la capacidad de crecimiento, se disminuye también la viabilidad, se puede observar que el DNA obtenido de -los ejes embrionarios de éstas semillas posee un menor pe so molecular que el DNA de las semillas no tratadas. Se -podría entonces establecer una relación entre la disminu-ción en la viabilidad de las semillas tratadas bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad, y la integri-dad del DNA de éstas semillas. Una conclusión semejante -ha sido establecida por Cheah y Osborne (1978) en su estu dio de la relación entre envejecimiento de semillas de cen

teno, baja capacidad de germinación y daño al DNA.

Mecanísticamente, se podría sugerir que el daño producido al DNA durante los tratamientos utilizados tendría - que ser reparado en las etapas iniciales de la germinación de las semillas. Si por algun motivo, como por ejemplo excesivo daño o reparación deficiente, la reparación no se lleva a cabo, los procesos que dependen del DNA como la - transcripción y por tanto traducción, podrían tambien ver se afectados y en consecuencia la germinación en general - podría verse reducida.

En el caso de las semillas tratadas por 2 días a 60°C, la síntesis de DNA muestra una fuerte caída, que nos hace suponer que el fraccionamiento de la molécula del DNA no ha sido reparado, lo cual podría deberse de alguna manera a que las enzimas encargadas de la reparación han sido - afectadas, por alteración en el proceso de transcripción - y en consecuencia en la traducción de éstas enzimas.

La evidencia actual aumenta en cuanto a que una enzima esencial para la reparación del DNA como lo es la DNA-ligasa, está deficiente en semillas envejecidas (Osborne, 1982).

Por otra parte debemos considerar que además del sistema enzimático reparativo también estuviese dañada alguna - de las enzimas participantes en la replicación del DNA y -

por ello no estuviese ocurriendo incorporación de ^3H -timidina a la molécula del DNA remanente.

De manera similar podrían interpretarse los resultados para las semillas tratadas 3 y 6 días con humedad a 40°C . Sin embargo, la síntesis de DNA no puede especificarse si es de tipo reparativo o replicativo y solo se considera, para el análisis de los resultados, el sí existe o no incorporación de material radioactivo.

La relación existente entre disminución de capacidad de crecimiento o de viabilidad y la incorporación de timidina radioactiva (síntesis de DNA) es menos clara. Algunos tratamientos que solo dañan la capacidad de crecimiento, como 3 días en humedad a 40°C , también dañan profundamente a la capacidad inicial de síntesis de DNA, mientras que otras que también disminuyen la viabilidad como 3 días a 50°C , tienen poco efecto sobre la capacidad sintética temprana. En general, sin embargo, podría decirse que la mayoría de los tratamientos que tienen algún efecto sobre viabilidad y/o capacidad de crecimiento afectan en mayor o menor escala la capacidad inicial de síntesis de DNA. Podría sugerirse que existiera un retardo general en la cronología del proceso germinativo y que por esto la síntesis de DNA también se ve retardada.

Por otra parte no se cree que exista una relación fuer

te o directa entre daño a la integridad del DNA y daño a la capacidad de síntesis de DNA.

Podemos concluir que: Todo tratamiento que afecte la integridad de la molécula del DNA va a producir simultáneamente disminución en la capacidad de crecimiento de las plántulas originadas por las semillas tratadas y disminución de la viabilidad de las semillas.

Por otra parte la disminución en la capacidad de síntesis de DNA durante la germinación temprana de éstas semillas, no siempre se relaciona con la disminución en la capacidad de crecimiento y viabilidad.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se demostró que al someter a las semillas de maíz a diferentes tratamientos con temperatura y/o humedad, se produce algún deterioro en las semillas que se refleja primeramente en la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas.
2. El grado del daño producido depende tanto del tratamiento a que fueron sometidas las semillas, así como del tiempo de aplicación del tratamiento.
3. Al analizar la integridad molecular del DNA de cada lote de semillas tratadas, se encontró que de manera general cuando el daño al DNA es poco significativo o no hay daño, las semillas afectadas presentan primeramente una disminución en su capacidad de crecimiento. Pero cuando hay ruptura de la molécula del DNA el daño se refleja mediante la disminución tanto de la capacidad de crecimiento, como de la viabilidad de las semillas.
4. No se pudo establecer una relación evidente entre el daño a la molécula del DNA y la capacidad de -

síntesis del mismo; ya que se encontro que algunas semillas con molécula de DNA fragmentada por el tratamiento recibido, aún son capaces de sintetizar DNA al ser puestas en imbibición.

5. Para algunas semillas, particularmente las tratadas 2 días a 60°C y 6 días en humedad a 40°C, se presenta una caída total en la incorporación de material radioactivo desde las primeras horas de la germinación, lo que podría sugerir que además de existir fragmentación molecular del DNA por el tratamiento, de alguna manera ha sido afectado también el aparato encargado de la síntesis de DNA, el cual no presenta recuperación alguna durante las primeras 15 horas de germinación.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Abu-Shakra, S.S. and Ching, T.M. (1967) *Crop Scie* 73, 115-118. (mencionado en la referencia # 42)
2. Aldrich, S.R. y Leng, E.R. (1974) *Produccion Moderna-del Maiz*, la. Edicion, Ed. Hemisferio Sur.
3. Ashburner, M. and Bonner, J.J. (1979) The Induction - of gene Activity in *Drosophila* by Heat Shock. *Cell* 17, 241-254.
4. Baszczynski, L.C. and Walden, D.B. (1983) Regulation- of the expresion in Maize for "Heat-Shock" Analysis - in vitro of RNAs of seedlings for Shock-Heat. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 61.
5. Bewley, D.J. and Black, M. (1978) *Physiology and Bio-chemistry of Seeds in Relation to Germination*, Springer Verlag. pp. 1,2,7-13.
6. Berjak, P. and Villiers, T.A. (1970-72) *New Phytol.* - 69, 919-938. and *New Phytol.* 71, 135-144. (mencionado en la referencia # 42)

7. Bray, C.M. and Chow, T.Y. (1976a-b) *Biochim. Biophys Acta* 442, 1-13 y 14-23. (mencionado en la referencia # 42)
8. Bray, C.M. and Dasgupta, J. (1976) Ribonucleic Acid - Synthesis and Loss of Viability in Pea Seed. *Plant* -- 132, 103-108.
9. Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. (1978) Characterization of the Early Synthesis DNA in Germinating Triticum aestivum embryos. *Photochemistry* 17, -1481-1484.
10. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. Analysis of Nucleosomal Acid in a Higher Plant. *Biochem. J.* 163, 141-144 (1977).
11. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978) DNA lesions - occur with loss of viability in embryos of ageing rye seeds. *Nature (Lond)* 272, 593-599.
12. Chen, D. and Osborne, D.J. (1970) Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryos. *Nature* 225, 336-340.

13. Ching, T.M. (1973) *Sec. Technol.* 1, 73-88 (mencionado en la referencia # 42).
14. Crevecoeur, M., Deltour, R. and Bronchart (1983) --- Effects of subminimal temperature on physiology and ultraestructure of Zea mays embryo during germination. *Can. J. Bot.* 61, 1117-1125.
15. Dell'Aquila, A., Lioi, L. and Scarascia, I. (1980) - Deoxyribonucleic acid synthesis and deoxyribonucleic acid polymerase activity during early germination of wheat embryos at high and low viability. *Biologia -- Plantarum (PRAHA)* 22, 287-293.
16. Deltour, R., and Jacquard (1974) Relation between - water stress and DNA synthesis during germination of Zea mays. *L. Ann. Bot. (London)* 38, 529-534.
17. Deltour, R., Gautier, A. and Fakan, J. (1979) Ultra-estructural cytochemistry of the nucleus in Zea mays embryos during germination. *J. Cell Sci.* 40, 43-62.
18. De Vries, H. (1901-1903) "Die Mutations Theorie" Band 1 and 2. Leipzig: Von Veit and Comp. (mencionado en

la referencia # 11)

19. Edward, N.A., Merly, N.C., Patterson, W. and Judith, B St. (1981) Effect of temperature and BASF 13, 338- on the lipid composition and Respiration of Wheat -- Roots. Plant Physiol. 67, 711-715.
20. Fleck, J., Durr, M.C. Lett and Hirt, L. (1979) Changes in protein synthesis during the initial stage of live of tobacco protoplasts. Planta 145, 279-285.
21. Fleck, J., Durr, A., Fritsch, C., Lett, M.C. and Hirt, L. (1980) Comparison of proteins Synthesized In Vivo and In Vitro by mRNA from isolated protoplasts. Planta 148, 453-454.
22. Fleck, J., Durr, A., Fritsch, C., Vernet, T., and -- Hirt, L. (1980) Osmotic-Shock "Stress Proteins" in Protoplasts of Nicotiana sylvestris. Plant Science - Letters 26, 159-165.
23. Giles, K.A. and Myers, A. (1965) An improved diphenyl lamina method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 206, 9.

24. Gudkov, I.N., Grodzinsky, D.M. (1976) Induction by radiation of DNA synthesis in radicle cells of germinating seeds of Pisum sativum L. Int J. Radiat Biol. 29, 455-462.
25. Heydecker, W. (1972) Vigour in: Viability of Seeds, - E.H. Roberts (ed.), Syracuse University Press. pp. - 209-252.
26. Howland, P. (1975) Dark-repair of ultraviolet-induced pyrimidine dimers in the DNA of wild carrot protoplasts. Nature 254, 160-161.
27. Kelley, P.M., et. al. (1980); Schoffl, F. and Key, J. L. (1982) (mencionados en la referencia # 4)
28. Kornberg, R.D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Science 184, 868-871 (1974).
29. Krüger, C., and Bernd, B.J. (1981) In vitro translation of Drosophila Heat and Non Heat-Shock mRNAs in heterologus and homologus cell-free system. Cell 23, 595-606.

30. Lakon, G. (1949) Plant Physiol. 24, 389-394 (mencionado en la referencia # 42)
31. Lett, M.C., Fleck, J., Fritsch, C., Durr, A. and -- Hirth, L. Suitable conditions for characterization,-- identification and isolation of the mRNA of the small subunit of ribulosa-1,2-bisphosphate carboxylase -- from Nicotiana sylvestris. Planta 148, 211-216 (1980)
32. Morris, G.H., Ishikara, K., Curt, M. Peterson, and Ta dakiro Mshijima (1981) Soybean Adaptation to Water - Stress at Selected Stages of Growth. Plant Physiol. 68.
33. Navashin, M.S. (1933) Origin of spontaneous mutations. Nature (london) 131, 436.
34. Navashin, M.S. (1933) Ageing of seeds is a cause of- chromosome mutations. Planta 20, 233-243.
35. Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. (1980-81) Studies on DNA integrity and DNA repair in germina-- ting embryos of rye (Sevale cereale). Israel J. of - Botany 29, 259-272.

36. Osborne, D.J. DNA Integrity in Plant Embryos and the Importance of DNA Repair. Embryonic Development, Part B: Cellular Aspects, pp 577-592.
37. Roberts, B.E. and Osborne, D.J. (1973) Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescence. Biochem. J. 135, 405-410.
38. Roberts, B.E., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973)- Protein synthesis and the viability of rye grains. -- Loss of activity of protein-synthesizing system in vitro associated with a loss of viability. Biochem. J. 131, 275-286.
39. Roberts, E.H. and Abdalla, F.H. (1968) The influence of temperature, moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. Ann. Bot. 32, 97-117.
40. Sacks, M.M., Freeling, M. and Okimako, R. (1980) The anaerobic proteins of maize. Cell 20, 761-767.

41. Sen, S. and Osborne, D.J. (1975) Early Ribonucleic Acid Synthesis during the germination of Rye (Secale cereale) Embryos and the Relation ship to Early Protein Synthesis. Biochem. J. 148, 381-387.
42. Sen, S. and Osborne, D.J. (1977) Decline in ribonucleic acid protein synthesis whit loss of viability-during the early hours of imbibition of rye (Secale-cereale) embryos. Biochem. J. 166, 33-38.
43. Soyfer, V.N., Ciemenis, K.G.K. (1974) Dark repair in higher plants. Proc. Acad. Sci URSS 215, 1261-1264.
44. Tanos, Yamaguchi H. (1977) Repair of radiation-induced single-strand breaks in DNA of barley embryo. Mutation Res. 42, 71-78.
45. Villiers, T.A. (1974) Seed aging: Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. Plant Physiol 53, 875-878.
46. Villiers, T.A. and Edgecumbe, D. (1975) On the cause of seed deterioration in dry storage. Seed Sci. Technol. 3, 761-774.

47. Williams, J.R., Little, J.B. and Shipley, W.V. Nature 252, 754-755 (mencionado en la referencia # 11)